

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

Том 24, № 4. С. 653-864

2022

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

МЕДИЦИНСКАЯ ИММУНОЛОГИЯ



Санкт-Петербургское региональное
отделение Всероссийской Общественной
Организации – Ассоциации
Аллергологов и Клинических
Иммунологов

**XVII ВСЕРОССИЙСКИЙ НАУЧНЫЙ ФОРУМ
С МЕЖДУНАРОДНЫМ УЧАСТИЕМ
ИМЕНИ АКАДЕМИКА В.И. ИОФФЕ**

ДНИ ИММУНОЛОГИИ В САНКТ-ПЕТЕРБУРГЕ

22 – 25 мая 2023 года

Основные даты:

1 марта – срок подачи тезисов
1 апреля – ранняя регистрация
1 апреля – бронирование гостиницы

ОРГАНИЗАТОРЫ ФОРУМА:

Министерство здравоохранения РФ
Федеральная служба по надзору в сфере защиты
прав потребителей и благополучия человека
Санкт-Петербургский НИИ эпидемиологии
и микробиологии имени Пастера
Первый Санкт-Петербургский государственный
медицинский университет им. акад. И.П. Павлова
Институт экспериментальной медицины
Всероссийское научно-практическое общество
эпидемиологов, микробиологов и паразитологов

Российская Академия Наук
Комитет по науке и высшей школе
Правительства Санкт-Петербурга
Комитет по здравоохранению Правительства
Санкт-Петербурга
Российская Ассоциация Аллергологов
и Клинических Иммунологов
Российское научное общество Иммунологов
Ассоциация специалистов
и организаций лабораторной службы
«Федерация лабораторной медицины»

КОНТАКТЫ:

**Председатель СПб РО РААКИ,
д.м.н., профессор, академик РАН Тотолян Арег Артемович**
197101, Санкт-Петербург, ул. Мира, 14,
Санкт-Петербургский НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера
Тел.: (812) 232-00-66, e-mail: totolian@spbraaci.ru

Секретариат:

Ракитянская Наталья Владимировна
Тел./факс: (812) 233-08-58,
e-mail: imdays@spbraaci.ru

АДРЕС ДЛЯ КОРРЕСПОНДЕНЦИИ:

197101, Санкт-Петербург, а/я 130,
СПб РО РААКИ

www.immundays.spbraaci.ru



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

МЕДИЦИНСКАЯ ИММУНОЛОГИЯ

июль-август

2022, том 24

№ 4

Основан в марте 1999 года

Главный редактор

Фрейдли Ири 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 04.07.2022 г. Формат 60 x 90 1/8. Печать офсетная.

Усл. печ. л. 26,5. Тираж 2000 экз. (1-й завод – 1000 экз.) Заказ № 034

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

July-August

2022, volume 24

No. 4

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 04.07.2022. Print format 60 x 90 1/8. Offset printing.

Printed sheets 26.5. 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

Саидов М.З.

АУТОФАГИЯ, АПОПТОЗ, НЕКРОПТОЗ, ПИРОПТОЗ И НЕТОЗ В ПАТОГЕНЕЗЕ ИММУНОВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ РЕВМАТИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ 659

Уразов С.П., Чернов А.Н., Черкас А.В., Бойков А.В., Глотов О.С., Апалько С.В., Сушенцева Н.Н., Полковникова И.А., Смирнов В.В., Щербак С.Г.

СЕКРЕТОРНАЯ ФОСФОЛИПАЗА A2: БИОМАРКЕР ВОСПАЛЕНИЯ АУТОИММУННЫХ, БАКТЕРИАЛЬНЫХ И ВИРУСНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ 705

Оригинальные статьи

Давуд Али А., Ясим Б.И., Рияд-аль-Джалили О.

ИДЕНТИФИКАЦИЯ МУТАЦИЙ ПОВЕРХНОСТНОГО ГЛИКОПРОТЕИНА SARS-CoV-2 В ШТАММАХ, ИЗОЛИРОВАННЫХ В ИРАКЕ 729

Клюева С.Н., Кравцов А.Л., Бугоркова С.А.

МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА КЛЕТОК КРОВИ У РЕКОНВАЛЕСЦЕНТОВ ПОСЛЕ ПЕРЕНЕСЕННОГО COVID-19 741

Татаркова Е.А., Тугуз А.Р., Шумилов Д.С., Муженя Д.В., Руденко К.А., Смольков И.В.

SNP ГЕНОВ МЕДИАТОРОВ ИММУННОГО ОТВЕТА И ПРЕДРАСПОЛОЖЕННОСТЬ К РАЗВИТИЮ СОЦИАЛЬНО ЗНАЧИМЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ 751

Глушков А.Н., Поленок Е.Г., Гордеева Л.А., Мун С.А., Костянко М.В., Антонов А.В., Вержбицкая Н.Е., Воронина Е.Н., Колпинский Г.И.

ИММУНОЛОГИЧЕСКИЙ ДИСБАЛАНС, ГЕНЕТИЧЕСКИЙ ПОЛИМОРФИЗМ ФЕРМЕНТОВ БИОТРАНСФОРМАЦИИ И РЕЦЕПТОРЫ СТЕРОИДНЫХ ГОРМОНОВ В ОПУХОЛИ У БОЛЬНЫХ РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ 765

Тырнова Е.В., Алешина Г.М., Янов Ю.К.

ОЦЕНКА ЭКСПРЕССИИ ГЕНА β -ДЕФЕНСИН-3 ЧЕЛОВЕКА В СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКЕ ЛОР-ОРГАНОВ 779

Лев И.В., Азарков Н.М.

ИНТЕРЛЕЙКИНЫ СЛЕЗНОЙ ЖИДКОСТИ И ДИАБЕТИЧЕСКАЯ РЕТИНОПАТИЯ 793

Барило А.А., Смирнова С.В.

РОЛЬ АЛЛЕРГИИ В РАЗВИТИИ ОЧАГОВОЙ АЛОПЕЦИИ 799

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

ВЗАИМОСВЯЗИ МЕЖДУ СЫВОРОТОЧНОЙ КОНЦЕНТРАЦИЕЙ HMGB1 И СУБПОПУЛЯЦИОННЫМ СОСТАВОМ ЦИРКУЛИРУЮЩИХ МОНОЦИТОВ У ПАЦИЕНТОВ С СУБКЛИНИЧЕСКИМ АТЕРОСКЛЕРОЗОМ 807

Новиков П.С., Черевко Н.А., Климов В.В., Кондаков С.Э., Розенштейн М.Ю., Розенштейн А.З., Мотлохова Е.А., Загрешенко Д.С.

ВЛИЯНИЕ РАЦИОНА ПИТАНИЯ НА РЕОЛОГИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ КРОВИ, КОНЦЕНТРАЦИЮ ЦИТОКИНОВ И РАЗВИТИЕ МЕТАБОЛИЧЕСКИХ НАРУШЕНИЙ У ЛИЦ С ПОВЫШЕННЫМ ИНДЕКСОМ МАССЫ ТЕЛА 821

Краткие сообщения

Агарков Н.М., Макконен К.Ф., Титов А.А., Бельчикова Д.Н., Колпина Л.В.

ИММУННЫЙ ПЛЕЙОТРОПНЫЙ ЭФФЕКТ ТЕЛМИСАРТАНА ПРИ АРТЕРИАЛЬНОЙ ГИПЕРТЕНЗИИ 831

Годовалов А.П., Асташина Н.Б., Бажин А.А., Дрокина Т.А.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ ПОЛИМЕРНЫХ КОНСТРУКЦИОННЫХ МАТЕРИАЛОВ: АКРИЛОВОЙ ПЛАСТМАССЫ И КОМПОЗИЦИОННОГО МАТЕРИАЛА НА ОСНОВЕ СТЕКЛОВОЛОКНА НА ПРОДУКЦИЮ ЦИТОКИНОВ 837

Шаравьева И.Л., Гейн С.В.

ВЛИЯНИЕ ОСТРОГО ХОЛОДОВОГО СТРЕССА НА СЕКРЕЦИЮ IL-2, IL-4, IFN γ , IL-12 СПЛЕНОЦИТАМИ МЫШИ *IN VIVO* 843

Малышева И.Е., Топчиева Л.В., Тихонович Э.Л.

ИССЛЕДОВАНИЕ АССОЦИИАЦИИ ПОЛИМОРФИЗМА Arg753Gln (rs574308) ГЕНА TOLL-ПОДОБНОГО РЕЦЕПТОРА 2 (TLR2) С РИСКОМ РАЗВИТИЯ САРКОИДОЗА ЛЕГКИХ (НА ПРИМЕРЕ ЖИТЕЛЕЙ КАРЕЛИИ) 849

Демченко Е.Н., Гаврилова Е.Д., Гойман Е.В., Вольский Н.Н., Колесникова О.П., Козлов В.А.

ВНЕКЛЕТОЧНАЯ ДНК В КРОВИ КАК ПОКАЗАТЕЛЬ ВОСПАЛИТЕЛЬНОЙ РЕАКЦИИ *IN VIVO* 853

Правила для авторов 861

Авторский указатель 864

Предметный указатель 864

CONTENTS

Reviews

Saidov M.Z.

AUTOPHAGY, APOPTOSIS, NECROPTOSIS, PYROPTOSIS AND NETOSIS IN PATHOGENESIS OF IMMUNE-INFLAMMATORY RHEUMATIC DISEASES	659
---	-----

Urazov S.P., Chernov A.N., Cherkas A.V., Boikov A.V., Glotov O.S., Apalko S.V., Sushentseva N.N., Polkovnikova I.A., Smirnov V.V., Shcherbak S.G.

SECRETORY PHOSPHOLIPASE A2: A BIOMARKER OF INFLAMMATION IN AUTOIMMUNE, BACTERIAL AND VIRAL DISEASES	705
---	-----

Original articles

Ali Adel Dawood, Bassam Ismael Jasim, Omar Riyadh Al-Jalily

IDENTIFICATION OF SURFACE GLYCOPROTEIN MUTATIONS OF SARS-CoV-2 IN ISOLATED STRAINS FROM IRAQ	729
--	-----

Klyueva S.N., Kravtsov A.L., Bugorkova S.A.

MORPHOFUNCTIONAL CHARACTERISTICS OF BLOOD CELLS IN RECONVALESCENTS AFTER SUFFERING COVID-19	741
---	-----

Tatarkova E.A., Tuguz A.R., Shumilov D.S., Muzhenya D.V., Rudenko K.A., Smolkov I.V.

SNP GENES OF IMMUNE RESPONSE MEDIATORS AND PREDISPOSITION TO DEVELOPMENT OF SOCIALLY SIGNIFICANT DISEASES	751
---	-----

Glushkov A.N., Polenok E.G., Gordeeva L.A., Mun S.A., Kostyanko M.V., Antonov A.V., Verzhbitskaya N.E., Voronina E.N., Kolpinskiy G.I.

IMMUNOLOGICAL IMBALANCE, GENE POLYMORPHISM OF BIOTRANSFORMATION ENZYMES, AND STEROID HORMONE RECEPTORS IN TUMORS IN BREAST CANCER PATIENTS	765
--	-----

Tyrnova E.V., Aleshina G.M., Yanov Yu.K.

HUMAN β -DEFENSIN-3 GENE EXPRESSION IN MUCOSA OF ORL ORGANS	779
---	-----

Lev I.V., Agarkov N.M.

INTERLEUKINS IN LACRIMAL FLUID AND DIABETIC RETINOPATHY	793
---	-----

Barilo A.A., Smirnova S.V.

ROLE OF ALLERGY IN THE DEVELOPMENT OF ALOPECIA AREATA	799
---	-----

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

RELATIONSHIPS BETWEEN SERUM HMGB1 CONCENTRATION AND SUBPOPULATION COMPOSITION OF CIRCULATING MONOCYTES IN PATIENTS WITH SUBCLINICAL ATHEROSCLEROSIS	807
---	-----

Novikov P.S., Cherevko N.A., Klimov V.V., Kondakov S.E., Rozenshteyn M.Yu., Rozenshteyn A.Z., Motlokhova E.A., Zagreshenko D.S.

EFFECTS OF DIET ON BLOOD RHEOLOGICAL INDICES, CYTOKINE CONCENTRATIONS, AND EMERGENCE OF METABOLIC DISORDERS IN THE PERSONS WITH INCREASED BODY MASS INDEX.....	821
--	-----

Short communications

Agarkov N.M., Makkonen K.F., Titov A.A., Belchikova D.N., Korpina L.V.

IMMUNE PLEIOTROPIC EFFECT OF TELMISARTAN IN ARTERIAL HYPERTENSION	831
---	-----

Godovalov A.P., Astashina N.B., Bazhin A.A., Drokina T.A.

EXPERIMENTAL EVALUATION OF POLYMER CONSTRUCTION MATERIALS: EFFECTS OF ACRYLIC RESIN AND A FIBERGLASS-BASED COMPOSITE UPON CYTOKINE PRODUCTION	837
---	-----

Sharavyeva I.L., Gein S.V.

INFLUENCE OF ACUTE COLD STRESS ON THE SECRETION OF IL-2, IL-4, IFN γ , IL-12 IN VIVO BY MOUSE SPLENOCYTES	843
--	-----

Malysheva I.E., Topchieva L.V., Tikhonovich E.L.

ASSOCIATION BETWEEN Arg753Gln (rs574308) POLYMORPHISM OF THE TOLL-LIKE RECEPTOR 2 (TLR2) GENE AND THE RISK OF PULMONARY SARCOIDOSIS AMONG THE RESIDENTS OF KARELIA	849
--	-----

Demchenko E.N., Gavrilova E.D., Goiman E.V., Volsky N.N., Kolesnikova O.P., Kozlov V.A.

EXTRACELLULAR DNA IN BLOOD: AN INDEX OF IN VIVO INFLAMMATORY RESPONSE	853
---	-----

Instructions to Authors	861
-------------------------------	-----

Author index	864
--------------------	-----

Subject index	864
---------------------	-----

АУТОФАГИЯ, АПОПТОЗ, НЕКРОПТОЗ, ПИРОПТОЗ И НЕТОЗ В ПАТОГЕНЕЗЕ ИММУНОВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ РЕВМАТИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

Саидов М.З.

ФГБОУ ВО «Дагестанский государственный медицинский университет», г. Махачкала, Республика Дагестан, Россия

Резюме. При иммуновоспалительных ревматических заболеваниях организованными формами клеточного инфильтрата являются эктопические фолликулоподобные лимфоидные структуры и ГЗТ-гранулемы, неорганизованными формами — диффузный клеточный воспалительный инфильтрат. Неотъемлемым компонентом патогенетической динамики этих видов клеточного инфильтрата являются программируемые варианты гибели клеток, из которых наиболее значимыми являются аутофагия, апоптоз, некроптоз, пироптоз и нетоз. Существует тесная взаимосвязь между указанными формами клеточной гибели. Эта взаимосвязь сформировалась в процессе биологической эволюции, отличается выраженным консерватизмом и подчиняется общебиологическим закономерностям молекулярно-клеточных процессов в клетке. Высвобождающиеся в процессе гибели клеток «сигналы опасности» (DAMPs) индуцируют состояние аутореактивности, обусловленной в том числе модуляцией процессов гибели клеток с помощью PRR-рецепторов клеток врожденной иммунной системы. На основании анализа процесса эндоцитоза, сигнальных путей, адапторных молекул, транскрипционных факторов, свойственных каждой из указанных форм гибели клеток, представлена патогенетическая значимость изменений мембранных структур и молекулярных путей реализации программируемой клеточной гибели при иммуновоспалительных ревматических заболеваниях. В этом отношении фундаментальными являются мембран-ассоциированные клеточные процессы, формирование различных видов внутриклеточных инфламасом, процессы кросс-презентации МНС-рестриктированных продуктов дезорганизации рыхлой волокнистой соединительной ткани и индукция аутореактивности врожденной и адаптивной иммунных систем. Причинно-следственные взаимоотношения молекулярных путей реализации указанных форм клеточной гибели позволяют идентифицировать целевые молекулярные мишени с целью модуляции продуктивного воспаления.

Ключевые слова: воспаление, ревматические болезни, аутофагия, апоптоз, некроптоз, пироптоз, нетоз, аутореактивность, МНС I класса, МНС II класса

Адрес для переписки:

Саидов Марат Зиявдинович
ФГБОУ ВО «Дагестанский государственный
медицинский университет»
367000, Россия, Республика Дагестан,
г. Махачкала, пл. Ленина, 1.
Тел.: 8 (988) 300-90-45.
E-mail: marat.saidov.55@mail.ru

Address for correspondence:

Saidov Marat Z.
Dagestan State Medical University
367000, Russian Federation, Republic of Dagestan,
Makhachkala, Lenin Square, 1.
Phone: 7 (988) 300-90-45.
E-mail: marat.saidov.55@mail.ru

Образец цитирования:

М.З. Саидов «Аутофагия, апоптоз, некроптоз, пироптоз и нетоз в патогенезе иммуновоспалительных ревматических заболеваний» // Медицинская иммунология, 2022. Т. 24, № 4. С. 659-704.
doi: 10.15789/1563-0625-AAN-2482
© Саидов М.З., 2022

For citation:

M.Z. Saidov "Autophagy, apoptosis, necroptosis, pyroptosis and netosis in pathogenesis of immune-inflammatory rheumatic diseases", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2022, Vol. 24, no. 4, pp. 659-704.
doi: 10.15789/1563-0625-AAN-2482
DOI: 10.15789/1563-0625-AAN-2482

AUTOPHAGY, APOPTOSIS, NECROPTOSIS, PYROPTOSIS AND NETOSIS IN PATHOGENESIS OF IMMUNE-INFLAMMATORY RHEUMATIC DISEASES

Saidov M.Z.

Dagestan State Medical University, Makhachkala, Republic of Dagestan, Russian Federation

Abstract. There are organized forms of cellular infiltrate observed in immune-inflammatory rheumatic diseases, i.e., ectopic follicle-like lymphoid structures and delayed-type response granulomas, whereas diffuse cellular inflammatory infiltrates represent non-organized forms. In these types of cellular infiltration, an integral pathogenetic link includes programmable cell death variants, with autophagy, apoptosis, necroptosis, pyroptosis and netosis being the most significant. There is a close relationship between these forms of cell death. This relationship occurred in the process of biological evolution, being characterized by pronounced conservatism, and it follows general biological laws of molecular cellular processes. The “danger signals” (DAMPs) released during cell death induce a state of autoreactivity caused, e.g., by modulation of cell death processes using cellular PRR receptors of the innate immune system. When analyzing the processes of endocytosis, signaling pathways, adaptive molecules, transcription factors involved into these modes of cell death, we discuss pathogenetic role of changing membrane structures and molecular pathways of programmed cell death in immune-inflammatory rheumatic diseases. In this regard, there are fundamental membrane-associated cellular processes, genesis of various types of intracellular inflammasomes, cross-presentation of MHC-restricted products of disorganized loose fibrous connective tissue, and induction of innate and adaptive immune autoreactivity. Causal relationships of the molecular pathways for initiation of these forms of cell death, thus enabling identification of the molecular targets, in order to modulate productive inflammation.

Keywords: inflammation, rheumatic diseases, autophagy, apoptosis, necroptosis, pyroptosis, netosis, autoaggression, MHC I class, MHC II class

Введение

Иммуновоспалительные ревматические заболевания (ИВРЗ) представляют собой уникальную группу болезней человека, патогенетической основой которых является системный иммуновоспалительный процесс в рыхлой волокнистой неоформленной соединительной ткани. Важным свойством ИВРЗ является гиперреактивность иммунной системы, моногенная и/или полигенная генетическая предрасположенность, многофакторность происхождения, при этом на модуляцию фенотипа заболевания сильное влияние оказывают факторы окружающей среды [94].

При интерпретации патогенеза ИВРЗ доминирующими являются представления о нарушениях регуляции врожденной иммунной системы, обуславливающих индукцию системных аутовоспалительных процессов и о нарушениях функций адаптивной иммунной системы, ассоциированных с появлением системных аутоиммунных заболеваний [2, 16].

Триггерами активации врожденной и адаптивной систем иммунитета при ИВРЗ являются молекулярные паттерны, ассоциированные с дезорганизацией рыхлой волокнистой неоформленной соединительной ткани — DAMP,

называемые также «сигналами опасности» или аларминами. При системных аутовоспалительных процессах DAMP взаимодействуют с мембранными и цитоплазматическими рецепторами распознавания образов — PRR-рецепторами, экспрессирующихся на антиген-презентирующих клетках (АПК) — фолликулярных и плазматцитоидных дендритных клетках (фДК и пДК) с последующей активацией сигнальных путей, приводящих к гиперпродукции, в частности IL-1 β . IL-1 β является одной из основных эффекторных молекул, стимулирующих аутовоспалительные процессы. Этот цитокин также действует и на эффекторные клетки адаптивной иммунной системы, способствуя экспансии аутореактивных Th1- и Th17-лимфоцитов и ингибируя активность регуляторных Т-лимфоцитов (Treg). IL-1 β в этой ситуации выступает в качестве важного фактора патогенетической взаимосвязи между адаптивным и врожденным иммунитетом. Аналогичные функции выполняют и интерфероновые цитокины. Также врожденная иммунная система играет определенную роль в активации адаптивной иммунной системы с помощью АПК, активация которых обуславливает последующий реактивный ответ В- и Т-клеток. Таким образом, кратко-

срочная или длительная активация врожденного иммунитета может привести к аутоиммунным заболеваниям [112].

Ключевой характеристикой системных аутоиммунных процессов является обнаруживаемая аутореактивность В- и Т-клеток, проявляющаяся в виде продукции цитопатогенных аутоантител и аутореактивных Т-клеток широкой специфичности, тканевой и органной тропности. Во всех этих случаях DAMP выступают в роли ауто-АГ.

Хотя существуют обоснованные различия между аутовоспалительными и аутоиммунными заболеваниями, тем не менее они имеют много общего. В обеих группах заболеваний лежащие в их основе иммунопатологические процессы направлены против АГ собственного организма. Эти заболевания носят системный характер, при этом поражается опорно-двигательный аппарат и паренхиматозные органы. Этиологические и патогенетические характеристики позволяют отнести их к группе мультифакториальных заболеваний [121].

В этом контексте модель континуума ИВРЗ подразумевает тесную взаимосвязь хронического продуктивного воспаления (ХПВ), гиперреактивности иммунной системы, причинно-следственных взаимосвязей механизмов врожденного и адаптивного иммунитета и полиорганности поражения. Важнейшей и универсальной характеристикой ХПВ при аутовоспалительных и аутоиммунных заболеваниях, является формирование клеточного воспалительного инфильтрата (КВИ).

В предыдущем обзоре [4] были представлены материалы, свидетельствующие о том, что плацдармом ИВРЗ является рыхлая волокнистая неоформленная соединительная ткань. Уникальность ее реактивности состоит в том, что воздействие различных флогенов сопровождается однотипной реакцией этой ткани, в каких бы органах она не располагалась. Морфологическим субстратом ХПВ при ИВРЗ является КВИ. В процессе хронического воспаления КВИ приобретает разные морфологически идентифицируемые формы. Организованными формами КВИ при ИВРЗ являются эктопические фолликулоподобные лимфоидные структуры (ELS) и ГЗТ-гранулемы, неорганизованными формами — диффузный клеточный воспалительный инфильтрат. Фолликулоподобные структуры и ГЗТ-гранулемы имеют морфо-функциональное сходство с периферическими органами иммунной системы — лимфатическими узлами, пейеровыми бляшками, селезенкой, что создает возможность индукции иммунного ответа на ауто-АГ в очаге воспаления (*locus morbi*). КВИ является динамичной структурой, отражающей

этапность, рецидивирующее течение и исход ИВРЗ. Динамика состава КВИ является отражением конкретного этапа иммуновоспалительного процесса [4].

Неотъемлемым компонентом патофизиологической динамики ELS, ГЗТ-гранулем и диффузного клеточного воспалительного инфильтрата при ИВРЗ является та или иная форма гибели клеток. Причем гибель клеток при ХПВ не является простым исчезновением последних, но является важным фактором поддержания и прогрессирования воспаления. Содержание этого уникального феномена состоит в том, что потеря целостности клеточной мембраны и высвобождение внутриклеточного содержимого обуславливают организацию цитопатогенного аутовоспаления и аутоиммунного ответа на DAMP, имеющих все характеристики ауто-АГ.

В целом биологической закономерностью является то, что одним из важнейших факторов поддержания гомеостаза организма является баланс между выживанием клеток и их гибелью. При этом мобилизуются определенные, эволюционно сформированные механизмы утилизации клеточного детрита (речь идет, прежде всего, о фагоцитозе этого материала), в большинстве случаев связанные с процессами воспаления и иммуногенеза. Важно отметить, что, с одной стороны, различные формы гибели клеток, сопровождающиеся выделением DAMP, оказывают особое влияние на иммунную реактивность (аутореактивность), а с другой стороны, модуляцию процессов гибели клеток с помощью PRR-рецепторов клеток врожденной иммунной системы можно считать важной функциональной особенностью последней [25].

Формы гибели клеток крайне разнообразны. Их классификация не окончательна и подвергается регулярному пересмотру. В соответствии с рекомендациями Комитета по номенклатуре клеточной смерти (NCDD) в основу классификации клеточной гибели положены, прежде всего, генетически запрограммированные механизмы для целенаправленного устранения избыточных, необратимо поврежденных и/или потенциально опасных клеток. Эти механизмы обуславливают регулируемую гибель клеток (РГК). К случайным формам гибели клеток можно отнести мгновенную гибель клеток, подвергшихся серьезным воздействиям факторов физической природы (например, высокое давление, температура или осмотическое давление), химической природы (например экстремальные колебания pH) или механические воздействия. В свою очередь РГК задействовано в двух диаметрально противоположных направлениях. Первое — когда РГК может возникнуть в отсутствие каких-либо экзо-

генных воздействий окружающей микросреды и в этих случаях доминирующими являются генетические механизмы клеточной гибели. Второе — когда гибель клеток возникает в результате слишком интенсивных или длительных воздействий факторов внутриклеточной или внеклеточной микросреды, когда адаптационные механизмы не справляются со стрессом и клетка не в состоянии восстановить свой гомеостаз. В этих случаях в качестве стрессоров могут выступать также и DAMP [62].

Цитологические изменения положены в основу классификации следующих форм гибели клеток: гибель клеток I типа, или апоптоз; гибель клеток II типа, или аутофагия и гибель клеток III типа, или некроз [96].

Результаты изучения сигнальных каскадов, адапторных молекул и транскрипционных факторов, задействованных в клеточной гибели, свидетельствуют о том, что в подавляющем большинстве случаев программы гибели клеток не являются ни изолированными, ни взаимоисключающими. Чаще всего молекулярные пути, способствующие выживанию, задействованы наряду с индукцией сигналов клеточной смерти. Более того, сами по себе стрессовые факторы могут привести к активации не только адаптационных механизмов, но и множества механизмов смерти клеток, которые могут иметь различную степень совпадения. Поэтому считается, что перекрест между путями, способствующими выживанию, и путями, способствующими смерти, определяют, погибнет ли клетка в конечном итоге и с помощью какой генетической программы.

На основании изложенного выше, группа авторов во главе с Galluzzi L. et al., 2012 предложила следующую классификацию регулируемой клеточной гибели:

- аноиксис (вариант апоптоза)
- аутофагия
- каспаз-зависимый внутренний апоптоз
- каспаз-независимый внутренний апоптоз
- корнификация
- энтозис
- внешний апоптоз, обусловленный рецепторами смерти
- митотическая катастрофа
- некроптоз
- нетоз
- партанатоз
- пироптоз

Представленные варианты гибели клеток, в свою очередь, авторы разделяют на запрограммированные формы гибели клеток, задействованные в эмбриональном/постэмбриональном периодах развития и тканевого гомеостаза, регулируемые формы гибели клеток, опосредован-

ные специализированными молекулярными механизмами и случайные формы гибели клеток в виде некроза [61].

Как видим, гибель клеток — это многообразный и сложный процесс, не до конца изученный и являющийся весьма перспективной областью молекулярно-генетических исследований. Соответственно классификация форм гибели клеток строится на постоянно обновляющемся потоке научной информации и по этой причине является достаточно вариативной. В контексте предмета настоящего обзора наибольшее патогенетическое значение при ИВРЗ имеют аутофагия, апоптоз, некроптоз, пироптоз и нетоз.

Во всех этих случаях гибель клеток обусловлена реализацией соответствующих генетических программ. Реализация этих программ связана с универсальными, эволюционно закрепленными внутриклеточными процессами, затрагивающими структурно-функциональное состояние плазмалеммы, внутриклеточных органелл и цитозоля. Речь идет, прежде всего, об эндоцитозе. При эндоцитозе определенный участок плазмалеммы захватывает и обволакивает внеклеточный материал, который таким образом попадает внутрь клетки. Этот материал заключен в эндосому, образованную из фрагментов плазмалеммы, затем эндосома отрывается от плазмалеммы и поступает в цитозоль. Образованию эндосом предшествует формирование так называемых удлиненных эндоцитозных каналов.

Выделяют три вида эндоцитоза: фагоцитоз, специфический эндоцитоз и пиноцитоз. При ИВРЗ наибольшее значение имеют первые два. Эндоцитоз активируется в присутствии поврежденных или отмерших клеток, в том числе и DAMP. Важно заметить, что одной из ключевых особенностей эндоцитоза является его селективность. Селективность эндоцитоза обусловлена активацией и функционированием адаптерных белков (адаптерных комплексов), в частности семейства AP (AP1, AP2, AP3, AP4).

В процессе трансформации захваченного материала важная роль принадлежит внутриклеточным органеллам — аппарату Гольджи, эндоплазматическому ретикулуму (ER) и лизосомам, именуемой системой ГЭРЛ. Любой участок плазмалеммы участвует в неспецифическом эндоцитозе, а локальные изменения клеточной мембраны являются сигналом для инициации фагоцитоза.

Сформированные эндосомы, сливаясь друг с другом, а также с лизосомами, преобразуются в эндоцитозные вакуоли. В случаях, когда эндоцитозные вакуоли сливаются с первичными лизосомами, образуются вторичные лизосомы, имеющие кислый pH, содержащие широкий набор

гидролаз и других ферментов, где обеспечивается распад поглощенных клеткой экзогенных и эндогенных веществ. Этот процесс определяется, как гетерофагия. В случаях, когда в лизосомах происходит утилизация только внутриклеточного материала, этот процесс определяется как аутофагия. Важно заметить, что известные механизмы эндоцитоза позволяют рассматривать последний как аналог активного транспорта веществ через клеточную мембрану.

Во всех описанных процессах есть общая черта, а именно — участие в них всех видов мембран, что дает основание для их определения, как мембран-ассоциированные. Клеточная мембрана может спонтанно осциллировать, ундулировать, изгибаться, образовывать разнообразные инвагинации. При спонтанной осцилляции и инвагинации мембран может происходить случайный захват внеклеточного материала, в том числе и DAMP. Большое значение имеет явление рециклизации мембран. Под этим понятием подразумеваются процессы новообразования мембран, кругооборот материала мембран в ходе эндоцитоза, транспорт макромолекул (везикул) от плазмалеммы к системе ГЭРЛ. Рециклизация — основной путь обновления мембран, также рециклизация является фактором устойчивости и стабильности эндоцитоза. Выделяют три пути рециклизации мембран — безлизосомная рециклизация, лизосомная рециклизация и сочетание эндо- и экзоцитоза через аппарат Гольджи. Кроме этого, важное значение в клеточном гомеостазе имеет феномен транцитоза, при котором клетки, захватывая путем эндоцитоза вещества, в том числе и клеточный детрит, переносят их в эндосомах без какой-либо трансформации в цитоплазме к другой стороне клетки, где эндосома сливается с плазмалеммой и выбрасывает содержимое во внеклеточную среду. Таким образом транцитоз имеет отношение к межклеточному обмену макромолекул и транспорту веществ [1].

Описанные процессы являются универсальными для всех видов клеток, прежде всего фагоцитирующих, и являются основой реализации указанных выше основных форм гибели клеток, имеющих неоспоримое патогенетическое значение при ИВРЗ.

Значение аутофагии в воспалении и аутоиммунитете

К фундаментальным механизмам поддержания клеточного гомеостаза и жизнеспособности клеток относится феномен аутофагии. В соответствии с современными представлениями, аутофагия — это эволюционно консервативный, конститутивный, регулируемый катаболический процесс внутриклеточной лизосомальной дегра-

дации нежелательных цитоплазматических компонентов и переработки питательных веществ.

Термин «аутофагия», от греческого «поедание себя», был впервые использован Clark S.L. в 1957 г. и затем бельгийским ученым de Duve C. и соавт. в 1967 г. (автором открытия лизосом) на основании экспериментальных данных о том, что в гепатоцитах крыс увеличение размера лизосом связано с образованием аутофагической вакуоли с последующей деградацией в ней митохондрий и других внутриклеточных структур [47].

Однако понимание фундаментального биологического смысла этого феномена пришло со времени открытия в 1992 г. японским ученым Yoshinori Ohsumi аутофагосом у дрожжей и 14 генов аутофагии — ATG генов. Работы Yoshinori Ohsumi и его школы объяснили механизмы, с помощью которого клетки устраняют изношенные белковые комплексы и органеллы, которые были слишком велики, чтобы их можно было разрушить другими способами. Накопление таких компонентов повреждает клетки и может привести к ее гибели. Аутофагия также является адаптивной реакцией для обеспечения питательными веществами и энергией при воздействии различных стрессоров [174].

Базальные уровни аутофагии принимают участие в физиологическом обмене белков и удалении старых или поврежденных органелл. Уровень аутофагии повышается в ответ на различные внеклеточные и внутриклеточные стрессовые воздействия, такие как нехватка питательных веществ и факторов роста, гипоксия, накопление белковых агрегатов, бактериальные и вирусные инфекции. Особенно важна аутофагия в процессах эмбриогенеза. При недостатке питательных веществ аутофагия является резервом для выживания клеток, когда разложение аутологических белков и органелл позволяет перерабатывать их компоненты и использовать их в основных метаболических процессах [129].

В случаях, когда резервы становятся недостаточными, аутофагия может привести к клеточной смерти от автоканнибализма. Важной функцией аутофагии является удаление поврежденных компонентов цитоплазмы.

С учетом различных путей, по которым внутриклеточные компоненты транспортируются в лизосомы, выделено три основных типа аутофагии — макроаутофагия, микроаутофагия и аутофагия, опосредованная шаперонами (СМА).

При макроаутофагии, называемой также аутофагией, часть цитоплазмы (0,5–1 мкм в диаметре), включающая в себя белки, органеллы или другие материалы, окружаются изолирующей мембраной, формируя так называемые «фагофоры». Фагофоры расширяются и закрываются двух-

мембранной структурой, образуя аутофагосомы. Аутофагосомы, транспортируясь в цитоплазме, сливаются с лизосомами и образуют аутолизосомы, что приводит к деградации содержимого аутофагосомы в кислой среде лизосомальными ферментами [128].

Аутофагосомы также могут сливаться с эндосомами, а также, что наиболее важно в контексте настоящего обзора, с загрузочными отсеками МНС II класса. Иными словами, аутофагия является важным компонентом процесса презентации экстрацеллюлярного антигенного материала МНС II класса, включая и DAMP [137, 164].

Показано, что эндоплазматический ретикулум (ER) имеет решающее значение для формирования аутофагосом. Цистерны ER имеют в своем составе субдомен, обогащенный фосфатидилинозитол-3-фосфатом (PI), напоминающий по своей морфологии греческую букву омега и названный омегасомой. Омегасомы принимают участие в формировании мембраны фагофоров и, в последующем, аутофагосом, являясь их частью. Также в формировании аутофагосом принимают участие митохондрии, плазмалемма и ядерная мембрана.

Необходимо отметить, что в образовании омегасом принимает участие один из ключевых регуляторных белков аутофагии — беклин-1. Кроме этого, беклин-1 является важным компонентом в процессах эндоцитоза и эндоцитозного транспорта. Беклин-1 представляет собой белок с двойными свойствами. В ситуации, когда он взаимодействует с таким регуляторным фактором, как активирующая молекула в регулируемой беклином-1 аутофагии (AMBRA1), процесс аутофагии запускается. В случаях взаимодействия беклина-1 с белками семейства Bcl-2 процесс аутофагии ингибируется. По этой причине белки семейства Bcl-2 являются не только антиапоптотическими, но и антиаутофагическими.

На протяжении всего процесса созревания аутофагосом важной составляющей аутофагосомальной мембраны является комплекс, состоящий из белков Atg5-Atg12, связанных с микротрубочками, и фосфатидилэтаноламином (PE), обозначенный как LC3-II. По этой причине LC3-II используется в качестве специфического маркера для мониторинга уровней аутофагии [130].

При микроаутофагии цитозольные компоненты, в частности макромолекулы, фрагменты клеточных мембран, поглощаются непосредственно самой лизосомой посредством инвагинации лизосомальной мембраны. Таким путем клетка способна переваривать аутобелки при нехватке строительного материала или энергии, что может происходить при голодании. Микроаутофагия встречается и в физиологических условиях [126].

Отметим, что при макроаутофагии и микроаутофагии задействованы как селективные, так и неизбирательные механизмы поглощения в том числе и больших внутриклеточных структур.

При СМА целевые белки транслоцируются через лизосомальную мембрану в комплексе с белками-шаперонами (такими как белки теплового шока, например, БТШ-70), которые распознаются лизосомально-ассоциированным мембранным протеином (LAMP)-2A, что приводит к их развертыванию и деградации. При этом происходит направленный транспорт частично денатурированных белков из цитоплазмы через мембрану лизосом в ее полость, где они и перевариваются. Этот тип аутофагии может индуцироваться голоданием, а также избыточными физическими нагрузками [106].

Все три типа аутофагии взаимосвязаны, в частности описана прямая перекрестная связь между макроаутофагией и СМА. В эксперименте блокирование макроаутофагии приводит к активации СМА, а блокирование СМА активирует макроаутофагию [83].

Аутофагия — это строго регулируемый процесс и ключевыми участниками этой регуляции являются белки, связанные с аутофагией — Atg-белки. Atg-белки кодируются ATG-генами. На сегодняшний день идентифицирован 41 ген ATG [194].

Белки Atg классифицируются по пяти функциональным группам и из них центральная роль принадлежит белку Atg5. Atg5 необходим для образования аутофагосом. Ингибирование Atg5 приводит к снижению или полной отмене аутофагии. Экспрессия гена ATG5 является неоспоримым маркером запуска процесса аутофагии. Белок Atg5 выполняет и другие функции, в частности участвует в восстановлении митохондрий после окислительного повреждения, в негативной регуляции врожденного противовирусного иммунного ответа, в пролиферации и дифференцировке лимфоцитов, в презентации антигена комплексом МНС II, в дифференцировке адипоцитов и апоптозе. Повышенная экспрессия Atg5 в Т-клетках может способствовать воспалительной демиелинизации при рассеянном склерозе, а также иммуно-опосредованным повреждениям миелина у экспериментальных мышей с аутоиммунным энцефаломиелитом и при СКВ [146].

Результаты полногеномного поиска ассоциаций (GWAS-исследования) свидетельствуют о статистически значимых ассоциациях гена ATG5 с аутоиммунными заболеваниями. Несколько исследований GWAS подтвердили генетические ассоциации между генетическими вариантами ATG5 и СКВ у кавказцев и азиатов. Аналогичные ассоциации были выявлены при других аутоиммунных заболеваниях, включая ревматоидный

артрит, системный склероз, болезнь Крона, сахарный диабет 2-го типа и множественную миелому. В других работах представлены данные, свидетельствующие о том, что несколько генов, связанных с аутофагией, коррелируют с восприимчивостью к СКВ, включая ATG5, CDKN1B, DRAM1, CLEC16A и ATG16L2 [120, 127, 200].

ATG5 регулирует аутофагическую активность, изменяя поляризацию макрофагов, в провоспалительные M1 или противовоспалительные M2, изменяя тем самым степень воспаления [133].

Кроме этого, имеются сведения о следующих функциях ATG5. Экспрессия ATG5 опосредованно активирует нейтрофилы. Регулирующая функция ATG5 включает в себя влияние на секрецию провоспалительных цитокинов — IL-1 α , IL-1 β , IFN γ . Нокаут гена ATG5 ингибирует пролиферативную активность CD4⁺ и CD8⁺T-клеток, вызывая также и их гибель [148, 195]. Важную роль в регуляции аутофагии играет так называемая серин-треониновая протеинкиназа млекопитающих — мишень рапамицина — mTOR (от англ. mammalian target of rapamycin (mTOR)). В клетках mTOR существует как субъединица внутриклеточных мультимолекулярных сигнальных комплексов mTORC1 и mTORC2, регулирующих клеточный рост и выживание. Особенностью mTOR является чувствительность к ингибирующему действию антибиотика стрептомицинового ряда — рапамицину, отсюда и название: мишень рапамицина — mTOR. Основным свойством mTOR в отношении аутофагии является его ингибирующий эффект. В настоящее время принята следующая схема реализации этого эффекта.

В норме комплекс mTORC1 ингибирует аутофагию путем интеграции сигналов от питательных веществ, которые генерируются аминокислотами, факторами роста (инсулиноподобные факторы роста), энергетических сигналов и различных стрессоров, включая гипоксию и повреждение ДНК. Регуляция mTORC2 осуществляется только факторами роста. mTORC1 включает в себя комплекс ULK1, куда входят ключевые белки аутофагии (Atg). При голодании, воздействии стрессовых факторов или в ответ на лечение рапамицином, mTORC1 диссоциирует, отделяя комплекс ULK1 от себя, что приводит к активации ULK1. ULK1 — это серин-пролиновая киназа, участвующая в аутофагии, особенно в условиях дефицита аминокислот. Активированная ULK1 инициирует аутофагию путем фосфорилирования белков аутофагии Atg13 и FIP200. Напротив, при избытке аминокислот и факторов роста mTORC1 также диссоциирует, но в этих условиях освободившаяся ее субъединица mTOR уже ингибирует активность ULK1, подавляет аутофагию и способствует росту клеток [124, 203].

Аутофагия играет важную роль в гомеостазе иммунных клеток. Существует сложная взаимосвязь между белками аутофагии, аутоиммунитетом и воспалением. Упомянутые выше белки аутофагии функционируют, как индукторы аутофагии, так и в качестве ингибиторов иммуновоспалительных реакций [104].

Процесс фагоцитоза, индуцированный активацией TLR-рецепторов с последующим формированием фагосом, связан с мобилизацией белков аутофагии — беклина-1, LC3, Atg5 и Atg7 [186].

Дифференцировка и пролиферация Т-лимфоцитов зависят от аутофагии. Показано, что Т-лимфоциты с дефицитом Atg5 проходят все этапы дифференцировки, но количество общих тимоцитов и периферических лимфоцитов снижается. В периферической циркуляции уровень аутофагической гибели Atg5⁺CD8⁺Т-лимфоцитов был резко увеличен. Одновременно Atg5⁺CD4⁺Т-клетки и Atg5⁺CD8⁺Т-клетки теряли способность пролиферировать после стимуляции Т-клеточного рецептора (TCR) [149].

Митохондрии и ER были расширены в Т-клетках с дефицитом Atg3. Этот же дефицит Atg3 ингибирует аутофагию в Т-лимфоцитах, что приводит к нарушению регуляции гомеостаза митохондрий и ER, накоплению дефектов этих внутриклеточных структур в Т-лимфоцитах и снижению выживаемости этих клеток. Однако имеются данные о том, что аутофагия необходима и для выживания Т-лимфоцитов. Таким образом, аутофагия, вероятно, принимает участие как в гибели Т-лимфоцитов, так и в выживании их [93].

Аналогичная картина определяется и в отношении В-лимфоцитов. Показано, что аутофагия способствует выживанию В-лимфоцитов, а также развитию ранних предшественников В-лимфоцитов. С другой стороны, аутофагия, по-видимому, является альтернативным путем смерти этих клеток, поскольку стимуляция антигенных рецепторов В-лимфоцитов (BCR) в отсутствие костимуляции вызывает мощную аутофагическую гибель клеток. Элиминация аутореактивных В-лимфоцитов путем индуцирования аутофагии может способствовать снижению аутоиммунного воспаления при ИВРЗ [122]. Ключевой аутофагический белок беклин-1 необходим для поддержания популяций недифференцированных предшественников В- и Т-лимфоцитов.

Весьма важным качеством аутофагии является ее участие в феномене кросс-презентации. Напомним, что в комплекс МНС-I встраиваются внутриклеточные пептиды, включая инфекционные АГ и АГ погибших клеток, образующиеся в цитоплазме клетки в процессе ограниченного

протеолиза в специальных образованиях — протеасомах и распознающиеся CD8⁺ лимфоцитами. Пептиды, презентруемые в составе молекул МНС-II, имеют внеклеточное происхождение и взаимодействуют с CD4⁺ лимфоцитами. При этом в результате эндоцитоза формируются ранние эндосомы, содержащие интернализированные белки из межклеточного пространства. В ходе кросс-презентации молекулы МНС-I презентруют внеклеточные экзогенные АГ, которые обычно презентруются МНС-II. Такой способностью обладают МНС-I некоторых антиген-презентирующих клеток, в особенности, плазмацитоидные ДК. Отметим, что эти клетки способны процессировать ауто-АГ продуктов дезорганизации рыхлой волокнистой неоформленной соединительной ткани, являющихся патогенетическим базисом ИВРЗ. С другой стороны, внутриклеточные цитозольные АГ могут быть представлены молекулами МНС-II, и при этом, вероятно, процессы аутофагии являются доминирующими. В этом случае в кросс-презентацию вовлекаются два вида аутофагии — макроаутофагия и СМА. Также аутофагия может усиливать презентацию эндогенного АГ комплексом МНС-I CD8⁺ лимфоцитам. Феномен кросс-презентации особенно актуален при СКВ [136].

Есть еще одно важное качество кросс-презентации, осуществляемое ДК — это поддержание аутоотолерантности периферических CD8⁺Т-клеток. Фагоцитируя клеточный и тканевой детрит рыхлой волокнистой соединительной ткани при ИВРЗ, ДК, присутствующие в том числе в составе КВИ, посредством кросс-презентации аутоАГ комплексом МНС-II CD8⁺ клеткам индуцирует клональную делецию аутореактивных CD8⁺ клеток [102].

В контексте настоящего обзора важными являются результаты исследований, свидетельствующих о том, что в медуллярных эпителиальных клетках тимуса аутофагия способствует комплексованию МНС-II с ауто-АГ, что способствует отрицательному отбору аутореактивных CD4⁺Т-клеток. Нарушение аутофагии может способствовать, соответственно, отмене центральной аутоотолерантности и индукции аутоиммунного ответа на собственные АГ [9].

Аутофагия в лимфатических эндотелиальных клетках (LECs) влияет на активацию Т-клеток при экспериментальном артрите. В то время как генетическая отмена аутофагии в LECs не изменяет иммунный гомеостаз, она вызывает изменения популяции регуляторных Т-клеток (Treg-клеток) в лимфатических узлах у мышей с артритом, что может быть связано с МНС-II-презентацией антигена LECs-клетками. Кроме того, аутофагия в LECs, вызванная воспали-

ем, способствует деградации сфингозинкиназы 1 (SphK1), что приводит к снижению продукции сфингозин-1-фосфата S1P. Эти липиды способствуют выживанию наивных Т-клеток и выходу эффекторных Т-клеток из лимфатических узлов. По этой причине у мышей с артритом, у которых отсутствует аутофагия в LECs, усиливается миграция патогенных Th17-клеток в очаг воспаления, а также инфильтрация воспаленных суставов, что приводит к обострению артрита. Эти результаты подчеркивают значение аутофагии, как важного регулятора иммуномодулирующих функций LECs при воспалительных состояниях [68].

Аутофагия принимает участие во врожденном иммунитете, защищая цитозоль от инфицирования патогенными микробами (стрептококки, стафилококки, туберкулезная палочка, паразиты). С учетом важности подобных свойств аутофагии, была выделена отдельная ее форма, избирательно устраняющая внутриклеточные патогены, названная *ксенофагией*.

При ИВРЗ взаимодействия рецепторов врожденного иммунитета, (TLR-, NLR- и RIG-рецепторов) с молекулярными паттернами, связанными с дезорганизацией рыхлой волокнистой соединительной ткани при ИВРЗ (DAMP), такими как группа белков высокой подвижности box 1 (HMGB1), комплексы АТФ и ДНК, высвобождаемые из поврежденных клеток, способствует индукции аутоиммунного ответа на ауто-АГ. Активация рецептора В-лимфоцитов (BCR) переносит мембранный TLR9 в аутофагосомы, где TLR9, по-видимому, взаимодействует со своими лигандами (DAMP). Белки аутофагии — Atg5, Atg9 и Atg12 принимают участие в негативной регуляции продукции провоспалительных INF I типа [46].

Взаимосвязь аутофагии с врожденным иммунным ответом весьма демонстративно представлена в работе Xu Y. и соавт. [194]. В качестве индуктора аутофагии авторы использовали липополисахарид (LPS), полученный из *Escherichia coli*. LPS, являющийся составной частью клеточной стенки грамотрицательных бактерий, как известно, является лигандом для рецептора TLR4, экспрессирующегося на клетках макрофагально-моноцитарного ряда. Подобное связывание индуцирует в том числе внутриклеточные молекулярные процессы, описанные выше, приводящие к аутофагии. LPS-индуцированная аутофагия (100 нг/мл) в клеточной линии макрофагов мыши RAW264.7 и в альвеолярных макрофагах человека приводила к перераспределению в цитоплазме клеток ассоциированного с микротрубочками белка 1 легкой цепи 3 (LC3, также известного как аутофагический белок Atg8). Это перераспределение сопровождалось переходом

диффузного окрашивания к точечному, типичному для сформировавшейся аутофагосомы.

На рисунке 1 слева представлены контрольные клетки линии макрофагов мыши RAW264.7. Видно, что окрашивание Atg8 носит диффузный характер. В случае, когда клетки были проинкубированы с LPS в течение 8 часов зеленая флуоресценция Atg8 переходила в точечную, что свидетельствовало о формировании аутофагосом. Зеленая флуоресценция вызывалась антителами к Atg8, меченных зеленым красителем GFP.

На рисунке 2 представлена картина иммунофлуоресценции комплекса GFP с антителами к Atg8 в альвеолярных макрофагах человека.

Видно, что и в этом случае, интактные Мф окрашиваются диффузно, снимок слева. ЛПС-стимуляция альвеолярных макрофагов человека приводит к перераспределению иммунофлуоресценции от диффузной к точечной, что также свидетельствует о формировании аутофагосом, снимок справа. На этом же рисунке 2 (крайний справа снимок) представлены результаты ультраструктурного анализа LPS-индуцированной аутофагии методом просвечивающей электронной микроскопии в альвеолярных макрофагах человека, подтверждающие наличие маркера аутофагии, а именно — цитоплазматических аутофагических вакуолей.

Очевидно, что аутофагия во всех ее проявлениях и формах принимает активное патогенетическое участие при ИВРЗ. Подтверждением сказанного являются результаты следующих, наиболее демонстративных исследований. Показано, что при СКВ ключевым фактором аномальной активации лимфоцитов является передача

сигналов от mTOR. Кроме этого, подобной аномальной активации Т-лимфоцитов при СКВ способствует увеличение митохондриальной массы Т-лимфоцитов вследствие гиперполяризации митохондрий, связанной с аутофагией [140].

Также показано, что при СКВ апоптотические клетки накапливаются в зародышевых центрах лимфатических узлов и этот апоптотический материал связывается с поверхностью фолликулярных дендритных клеток (фДК). фДК презентуют ауто-АГ В-клеткам, которые дифференцируются в плазматические клетки, продуцируя ауто-АТ и В-клетки памяти. В этих процессах аутофагия в ДК может способствовать упаковке антигена для оптимальной кросс-презентации молекул МНС-II CD8⁺Т-клеткам [137].

Активация аутофагии, обнаруженная на ранних стадиях В-клеток у пациентов с СКВ, была необходима для развития плазмбластов, что свидетельствует о существенной роли аутофагии в выработке аутоантител при СКВ. Макроаутофагия также была повышена в Т-клетках, продуцирующих IFN γ , а процент клеток с признаками аутофагии положительно коррелировал с активностью заболевания [114]. Более того, в цитоплазме Т-клеток больных СКВ были обнаружены увеличенные аутофагические вакуоли, особенно в наивных CD4⁺Т-клетках [12]. Аутофагическая активация периферических Th17/Treg-клеток у пациентов с СКВ может привести к усилению провоспалительного ответа Th17-клеток и снижению функции Treg клеток [13].

Мутации гена ATG5 при СКВ ассоциированы с нарушением регуляции секреции провоспалительных цитокинов, клиренса умираю-

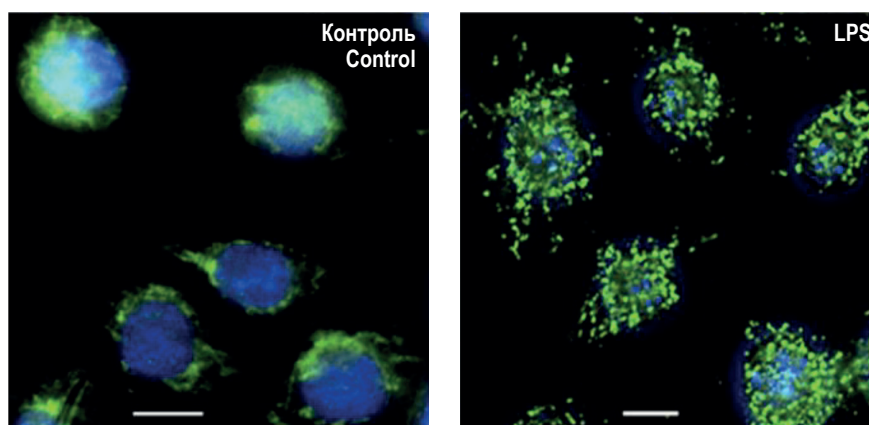


Рисунок 1. LPS-индуцированная аутофагия в клеточной линии макрофагов мыши RAW264.7

Примечание. Слева – интактные макрофаги, диффузно окрашенные комплексом антитела к Atg8, меченных зеленым красителем GFP; справа – LPS-индуцированная аутофагия, сопровождающаяся точечной зеленой флуоресценцией. Метод иммунофлуоресценции, по материалам [191].

Figure 1. LPS-induced autophagy in the mouse macrophage cell line RAW 264.7

Note. On the left, intact macrophages diffusely stained with Atg8 antibody complex labeled with green GFP dye; on the right, LPS-induced autophagy accompanied by spot green fluorescence. Immunofluorescence method, based on materials [191].

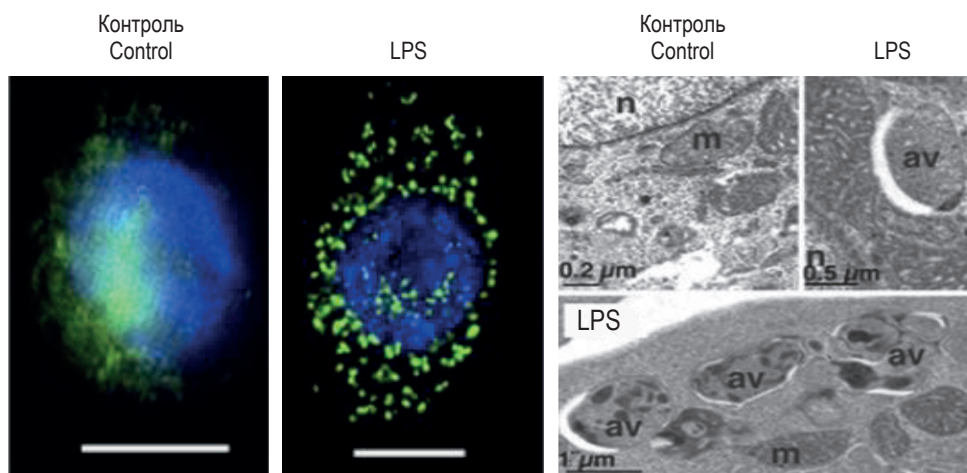


Рисунок 2. LPS-индуцированная аутофагия в альвеолярных Мф человека и ультраструктурная идентификация цитоплазматических аутофагических вакуолей

Примечание. Слева интактные альвеолярные Мф человека, окрашенные диффузно зеленым красителем GFP, конъюгированным с антителами к Atg8; справа – LPS-индуцированная аутофагия в альвеолярных Мф человека, сопровождающаяся точечной зеленой иммунофлуоресценцией. Крайний справа снимок – электронограмма LPS-стимулированных альвеолярных Мф человека. Четко видны цитоплазматические аутофагические вакуоли. av – аутофагическая вакуоль; n – ядро; m – митохондрии. Методы иммунофлуоресценции и просвечивающей электронной микроскопии, по материалам [191].

Figure 2. LPS-induced autophagy in human alveolar Mf and ultrastructural identification of cytoplasmic autophagic vacuoles
Note. On the left, intact human alveolar Mf stained with diffuse green GFP dye conjugated with antibodies to Atg8; on the right, LPS-induced autophagy in human alveolar Mf accompanied by spot green immunofluorescence. The picture on the far right is an electronogram of human LPS-stimulated alveolar Mf. Cytoplasmic autophagic vacuoles are clearly visible.
av, autophagic vacuole; n, nucleus; m, mitochondria. Methods of immunofluorescence and transmission electron microscopy, based on materials [191].

щих клеток и презентации ауто-АГ. Понимание функциональной значимости дефектов ATG5 и компенсаторных механизмов при всех формах аутофагии может привести к разработке новых вмешательств, направленных на модуляцию, в частности, ATG5 в терапевтических целях при СКВ.

Показана центральная патогенетическая роль аутофагии в процессах деструкции суставов при РА. При РА аутофагия была активирована в остеокластах, в которых определялась повышенная экспрессия беклина-1 и Atg7. В этих же клетках TNF α индуцировал экспрессию генов, связанных с аутофагией, влияя на дифференцировку остеокластов и этот эффект был связан с воспалительной резорбцией костной ткани. Также отмечено усиление аутофагии в синовиальной ткани при РА на основании сверхэкспрессии беклина-1 и LC3 [109].

Двоякая роль аутофагии при РА была продемонстрирована в работе Kato M. и соавт., 2014 [82]. Авторы показали, что уровень аутофагической гибели синовиальных фибробластов при РА, подвергнутых клеточному стрессу (точнее так называемому стрессу эндоплазматиче-

ского ретикулума – ER) был увеличен по сравнению с таковой в синовиальных фибробластах при остеоартрите. Однако эта же аутофагия в этих же клетках, но в которых индуцировался апоптоз, обусловленный ингибированием протеасом, играла защитную роль.

Высокая активность аутофагии, зарегистрированная по уровню мРНК белков аутофагии – беклина-1, Atg5 и LC3 в синовиальной ткани пациентов с РА, коррелировала с уровнями в сыворотке крови маркеров, связанных с активностью РА – С-реактивным белком, СОЭ, ревматоидным фактором и АТ к цитрулинированным пептидам. Возможно, что оценка уровня аутофагии в биоптатах синовиальной ткани может быть полезной при диагностике РА и оценке активности заболевания. Кроме этого, снижение уровня экспрессии генов, связанных с аутофагией, может стать терапевтической мишенью при активном РА [201].

Таким образом, актуальность изучения патогенетического значения всех типов аутофагии при ИВРЗ очевидна. Не менее очевидна взаимосвязь аутофагии с аутоиммунитетом. Механизм аутофагии позволил объяснить индукцию ци-

тотоксического иммунного ответа, основными эффекторами которого являются $CD8^+$ клетки, на внеклеточные АГ с участием молекул МНС-I. При ИВРЗ этот феномен кросс-презентации является основополагающим в отношении иммуногенности ауто-Г, или DAMP, при дезорганизации рыхлой волокнистой соединительной ткани. Особенно важна патогенетическая взаимосвязь аутофагии с апоптозом, некроптозом и пироптозом (см. ниже). При ИВРЗ указанные виды гибели клеток в составе КВИ являются доминирующими, и одновременно молекулярно-клеточные следствия этих процессов обуславливают формирование патогенетических звеньев при ИВРЗ. Понимание функционального баланса между патогенной и цитопротекторной аутофагией, возможностей модуляции этих процессов крайне важно в отношении патогенетической интерпретации аутофагии при ИВРЗ, что также расширяет спектр мишеней для их фармакологической коррекции.

Апоптоз при иммуновоспалительных ревматических заболеваниях

Апоптоз относится к важным биологическим процессам, регулирующим гомеостаз миллиардов клеток и являющийся необходимым условием существования многоклеточных организмов. Одной из основных функций апоптоза является элиминация поврежденных, мутантных, инфицированных клеток, а также участие в развитии и функционировании клеток иммунной системы на этапе негативной и позитивной селекции и морфогенезе лимфоидных органов.

Апоптоз представляет собой процесс программируемой клеточной гибели, развивающийся в течение 1-3 часов, сопровождающийся сморщиванием и уменьшением размеров клетки, уплотнением плазмолеммы, формированием

мембранных вздутий, конденсацией хроматина, уменьшением размера и фрагментацией ядра. Происходят разрывы ДНК и формирование нуклеосом. От клетки отделяются «апоптотические тельца» — фрагменты ядра, окруженные мембраной, которые подвергаются немедленно фагоцитозу Мф. Принципиальным элементом описанных процессов является ферментативная активность группы цистеиновых протеаз, расщепляющих полипептидную связь после остатков аспарагиновой кислоты, называемых каспазами. Эти протеазы нацелены на несколько сотен белков для ограниченного контролируемого протеолиза, что сводит к минимуму повреждения и разрушения соседних клеток и позволяет избежать высвобождения иммуностимулирующих молекул. В совокупности эти протеолитические события вызывают фенотипические изменения в клетке, характерные для апоптоза. При этом ключевая роль при апоптозе принадлежит каспазе-8, каспазе-9 и каспазе-3. Продукты апоптотического распада клеток не поступают в межклеточное пространство и не вызывают воспаления, в отличие от некроза клеток.

На рисунке 3 представлена цитоморфология апоптоза. Крайний слева снимок демонстрирует вид двух клеток HeLa, не подвергшихся апоптозу. Посередине эти же две клетки, подвергшиеся апоптозу после 12-часовой экспозиции с даунорубицином (10 мкмоль). Видны классические признаки апоптоза — сморщивание и уменьшение размеров клетки, уплотнение плазмолеммы, формирование обширных мембранных пузырьков. Крайний справа снимок показывает признаки апоптогенного распада клеточного ядра, индуцированного в данном случае обработкой актиномицином D (5 мкмоль) с последующим окрашиванием ядер синим красителем Hoechst.

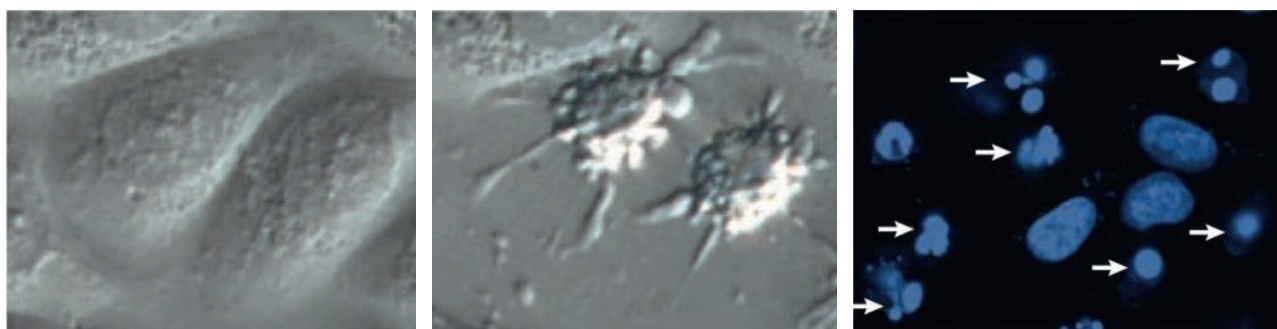


Рисунок 3. Цитологические признаки апоптоза

Примечание. Слева клетки HeLa, не подвергшиеся апоптозу, посередине эти же клетки, подвергшиеся апоптозу, справа апоптогенная фрагментация и конденсация ядер этих же клеток, по материалам [177].

Figure 3. Cytological signs of apoptosis

Note. On the left, HeLa cells that have not undergone apoptosis, in the middle, the same cells that have undergone apoptosis, on the right, apoptogenic fragmentation and condensation of the nuclei of the same cells, according to materials [177].

Четко видна фрагментация и конденсация ядер этих же клеток (показано стрелками).

Понятие «апоптоз» было впервые введено в научный обиход в 1972 г. австралийскими учеными Дж. Керром, А. Уайли и А. Карри [85]. В своей работе эти ученые впервые представили подробные цитологические характеристики апоптоза, которые используются до настоящего времени.

Выделяют три фазы развития апоптоза — включения пусковых механизмов (сигнальную), эффекторную (связанную с активацией каспаз) и завершающую фазу — фазу реализации гибели клетки.

Иницируется апоптоз при воздействии разнообразных внеклеточных и внутриклеточных факторов. При этом активируются два основных пути передачи апоптотического сигнала — это рецепторный и митохондриальный.

Рецепторный, или внешний, сигнальный путь начинается с взаимодействия апоптогенных внеклеточных лигандов с рецепторами клеточной гибели, экспрессированными на плазмалемме клеток-мишеней. Это, прежде всего, рецепторы семейства $TNF\alpha$ (TNFR), цитоплазматическая часть которых представлена доменами смерти (DD-домен), необходимые для трансдукции сигналов апоптоза. К ним относятся: Fas-рецептор (APO-1, CD95, DR2), TNFR1 (p55, CD120a, DR1) и рецепторы смерти (death receptors) — DR3, DR4, DR5 и DR6. Лигандами для Fas-рецептора являются Fas-лиганд (FasL, CD178), для TNFR1 — цитокин $TNF\alpha$, для DR4 и DR5 — TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand) и для DR3 и DR6 — молекула TL1A.

Взаимодействие указанных лигандов активируют апоптогенные рецепторы и обуславливают последующее взаимодействие с внутриклеточными адапторными белками. Для Fas-рецептора адапторным белком является FADD (Fas-associated death domain). Для рецепторов TNFR1, DR3 и DR6 адаптером является TRADD (TNFR1-associated death domain).

Адаптерные белки, ассоциированные с апоптогенными рецепторами смерти, вступают во взаимодействие с предшественниками эффекторных каспаз — прокаспазы и обуславливают ключевое событие на этом этапе апоптоза, а именно — формирование молекулярных комплексов, в которых происходит активация каспаз. Эти комплексы именуются апоптосомами. Примером апоптосомы может служить комплекс FasL-Fas-рецептор-FADD-прокаспазы-8. FADD, также как и TRADD, вызывают активацию каспазы-8 — ключевого апоптогенного фермента. Принципиальный механизм активации каспазы-10, вероятно, аналогичный.

Митохондриальный, или внутренний, сигнальный путь запуска апоптоза реализуется в результате выхода апоптогенных белков из митохондрий в цитоплазму клетки, вследствие разрыва митохондриальной мембраны или повышения проницаемости внешней мембраны митохондрий. При этом важная роль принадлежит белкам семейства Bcl-2. Их разделяют на проапоптотические (Bid, Bax, Bax-XS, Bak и др.) и антиапоптотические (Bcl-2, Bcl-XL, Mcl-1, Bcl-W и др.). Запуск сигналов к апоптозу связан с проапоптотическими Bcl-2-белками, прежде всего, Bax и Bak. Эти белки встраиваются в наружную мембрану митохондрий и олигомеризуются, нарушая целостность внешней мембраны митохондрий и формируя трансмембранные поры. В результате из межмембранного пространства митохондрий в цитозоль устремляются белки, участвующие в апоптозе — цитохром C, фактор Araf-1 (Apoptosis Protease Activating Factor-1), флавопротеин AIF, прокаспазы -2, -3 и -9. Araf-1 представляет собой многодоменный белок, состоящий из трех функциональных областей — это N-концевого домена рекрутирования каспазы (CARD), домена связывания нуклеотидов и олигомеризации (NOD, также называемый NB-ARC) и связанных повторов WD40 в C-концевой половине белка. Фактор Araf-1 и цитохром C образуют апоптосому с указанными прокаспазы и затем с помощью апоптосом происходит активация, в частности, каспазы-9 [139, 154].

Рецепторный и митохондриальный сигнальные пути апоптоза закономерно приводят к активации каспаз. Рецепторный путь приводит к активации эффекторных каспазы-8 и каспазы-3, митохондриальный — к активации эффекторной каспазы-9. Одна из основных функций эффекторных каспаз заключается в прямом и опосредованном разрушении клеточных структур. Протеолизу подвергаются белки клеточного ядра, цитоскелета. Эффекторные каспазы ингибируют антиапоптотические белки, такие как ингибитор DFF, CAD белок, антиапоптотические белки семейства Bcl-2, а также процессы репарации и репликации ДНК.

Сказанное иллюстрируется рисунком 4.

Как видно из рисунка 4 при апоптозе сходятся два различных апоптотических сигнальных пути. Рецепторный внешний путь, или путь фактора смерти, активируется такими факторами смерти, как FasL, $TNF\alpha$ и TRAIL. Связывание факторов смерти с рецепторами смерти (death receptors) вызывает процессинг прокаспазы-8 в зрелую активную каспазу-8. При митохондриальном внутреннем сигнальном пути активируются проапоптотические белки Bim, Bid, Bad, Bmf, Hrk, Puma и Noxa и через ингибирование

антиапоптотических белков группы Bcl-2 индуцируют Bax/Bak-олигомеризацию. В результате этого процесса из митохондрий высвобождается цитохром С и, после связывания с фактором Араф-1, этот комплекс превращает прокаспазу-9 в активную каспазу-9. Каспаза-8, активированная во внешнем пути, и каспаза-9, активированная во внутреннем пути, расщепляют прокаспазу-3 до зрелой каспазы-3, которая расщепляет более 1300 клеточных субстратов для осуществления апоптоза [139].

Изучены другие пути инициации апоптоза, в частности вследствие активации прокаспазы-12. Этот предшественник фермента локализован в эндоплазматическом ретикулуме. Так называемый стресс эндоплазматического ретикулума (ER-стресс) сопровождается высвобождением и активацией прокаспазы-12 и связанным с этим нарушениями внутриклеточного гомеостаза ионов кальция.

В завершающей фазе апоптотические клетки подвергаются немедленному фагоцитозу, чему способствует экспрессия на их поверхности молекул, служащих для фагоцитов источником сиг-

налов типа «съешь меня». К ним относятся фосфатидилсерин (PS), в норме локализующийся на внутренней поверхности плазмолеммы и оказывающийся экспонированным снаружи при апоптозе, благодаря каспазной активности, а также тромбоспондин и остатки мембранных гликоконъюгатов.

Ферментативная активность каспазы-8 в очаге воспаления способствует появлению DAMP, таких как кальретикулин (CRT), которые также функционируют как сигнал «съешь меня» для фагоцитирующих клеток [143].

Кроме этого, к аналогичным сигнальным молекулам относятся модифицированные окислением молекулы, а также фосфатидилсерин (PS), но локализованный уже на внешней листке плазмалеммы. PS функционирует как лиганд для молекулы TIM-4, которая экспрессируется на дендритных клетках и способствует поглощению апоптотических клеток [90].

Также было показано, что две другие молекулы, а именно: специфичный для мозга ингибитор ангиогенеза 1 (BAI1) и стабиллин-2 (мембранный рецептор для фосфатидилсерина) способствуют

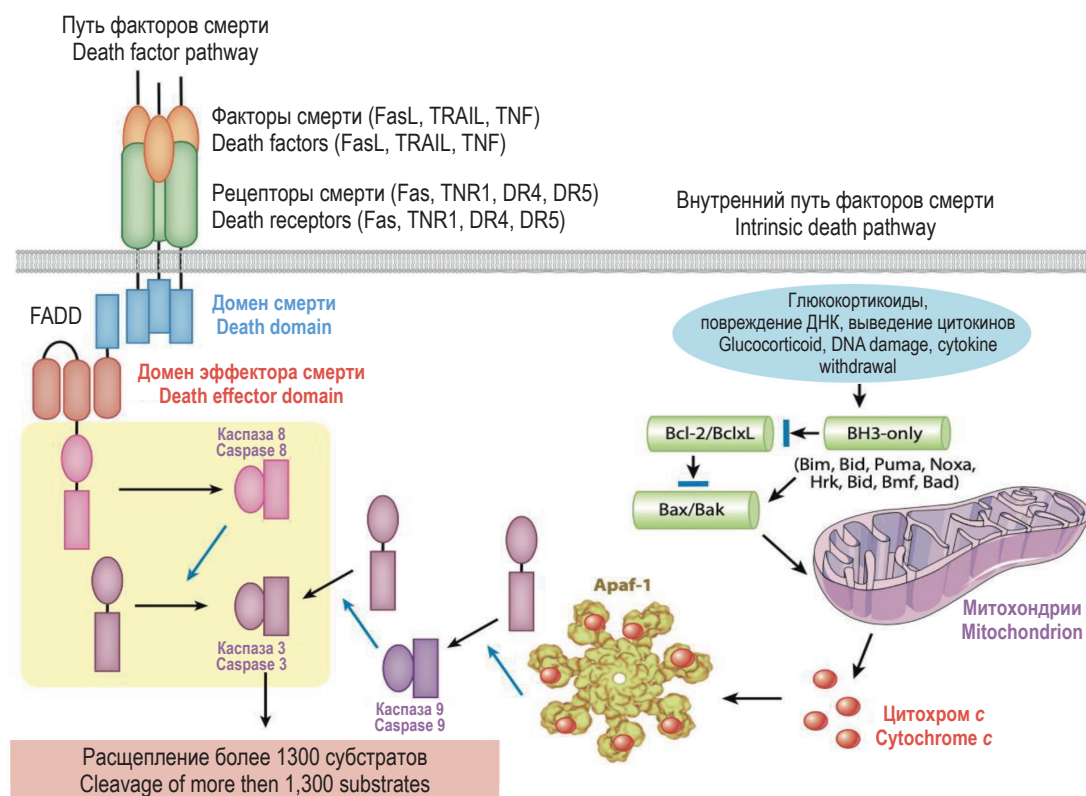


Рисунок 4. На схеме отражены основные этапы рецепторного (внешнего) и митохондриального (внутреннего) сигнальных путей апоптоза, приводящих к активации каспазы-3, каспазы-8 и каспазы-9

Примечание. Слева представлен рецепторный сигнальный путь, справа – митохондриальный сигнальный путь, по материалам [139].

Figure 4. Diagram shows the main stages of the receptor (external) and mitochondrial (internal) signaling pathways of apoptosis, leading to the activation of caspase-3, caspase-8 and caspase-9

Note. On the left is the receptor signaling pathway, on the right is the mitochondrial signaling pathway, according to materials [139].

поглощению продуктов апоптоза фагоцитирующими клетками посредством распознавания PS [144].

Некоторые исследователи выделяют еще один апоптогенный стимул фагоцитоза, а именно: сигнал «найди меня», имея в виду, что подобный сигнал стимулируют прежде всего хемотаксис Мф. К такого рода сигналам относится лизофосфатидилхолин (LPC), генерирующийся вследствие ферментативной активности фосфолипазы A2 (PLA2), которая в свою очередь активируется апоптогенными каспазами [100].

Также к таким сигналам относят высвобождение апоптотическими клетками аденозинтрифосфата (АТФ) и уридинтрифосфата (УТР).

Рецепторный аппарат Мф взаимодействует с указанными поверхностными молекулами, что обеспечивает быстрый фагоцитоз апоптотических клеток. Такое завершение апоптоза очень важно для организма, поскольку предотвращает поступление внутриклеточных компонентов, включая ДНК, в межклеточное пространство и последующее развитие воспаления и аутоиммунных процессов. Таким образом, фагоцитоз Мф апоптотических клеток несет в себе черты противовоспалительной реакции.

Этой же реакции способствует продукция фагоцитами, после поглощения апоптотических клеток, противовоспалительных цитокинов, образно названных цитокинами «толерантности ко мне». К таким цитокинам относятся известные TGF-β и IL-10. Одновременно снижается секреция *in situ* провоспалительных цитокинов (TNFα, IL-1 и IL-12) и таким образом указанные факторы активно создают противовоспалительную среду в местах гибели апоптотических клеток [134].

Однако избыточный фагоцитоз нуклеиновых кислот может быть источником МНС-презентации ауто-АГ, ведущим к развитию ИВРЗ, в частности СКВ. Уменьшению иммуногенности нуклеиновых кислот способствует активированная каспазой ДНКаза (называемая CAD) отвечающая за межнуклеосмальное расщепление геномной ДНК, которая обладает более слабыми иммуностимулирующими свойствами, чем высокомолекулярная ДНК [116].

В случаях, когда фагоцитарная активность Мф не обеспечивает полноценную элиминацию апоптотических клеток, эти клетки остаются потенциальными источниками ауто-АГ с последующей возможностью индукции аутоиммунного ответа.

Достаточно интересными являются данные, согласно которым пептиды, полученные из апоптотических клеток, поглощенные Мф и ДК, могут быть представлены на молекулах МНС I класса и использоваться для цитотоксических реакций

Т-лимфоцитов. Иными словами, налицо признаки кросс-презентации экстрацеллюлярного антигенного материала CD8⁺ цитотоксическим Т-лимфоцитам в процессе апоптоза. В индукции аутоиммунного ответа при ИВРЗ данному феномену отводится существенное патогенетическое значение [10].

Важным является вопрос взаимоотношений апоптоза и воспаления. Многие факторы и сигнальные пути, которые активируются воспалением, участвуют в регуляции апоптоза клеток. Ниже представлены некоторые экспериментальные данные, свидетельствующие о противовоспалительных качествах апоптоза и эти данные имеют непосредственное отношение к ИВРЗ.

Недавние исследования показали, что каспаза-3 ингибирует выработку интерферонов I типа путем расщепления cGAS (сенсор, обнаруживающий наличие ДНК в цитоплазме), тем самым подавляя апоптоз [141].

Кроме того, иммуносупрессивные цитокины, такие как TGF-β и IL-10, высвобождаются во время фагоцитоза апоптотических клеток [185].

Активация Т-клеток может быть подавлена апоптотическими клетками в эксперименте *in vitro*. Кроме этого, было показано, что отсутствие в клетках опухоли меланомы 2 (AIM2) внутриклеточных PRR-рецепторов активирует каспазу-3, параллельно с каспазой-1 [156].

Противоположный эффект наблюдался в случае, когда еще один член цитоплазматического PRR — NLRP3, после взаимодействия с бактериальным порообразующим токсином нигерицином, вызывал активацию апоптотических каспаз [150].

Показано также, что проапоптотические Bcl-2-белки (Bax, Bak и др.) ингибируют активацию NLRP3-инфламмосомы, предотвращая цитозольное высвобождение митохондриальной ДНК [50].

Представленные результаты экспериментальных исследований подтверждаются клиническими наблюдениями. В частности, недостаточная элиминация апоптотических макрофагов при хронической обструктивной болезни легких (ХОБЛ), фиброзе легких и муковисцидозе приводит к длительной воспалительной реакции [5, 70, 184].

Альвеолярные макрофаги у пациентов с тяжелой астмой, включая детей, не способны полностью элиминировать апоптотические клетки и в этой связи к лечению таких больных подключают средства, стимулирующие фагоцитарную активность Мф [58].

Также известно, что апоптотические клетки индуцируют синтез клетками макрофагально-моноцитарного ряда противовоспалительных

медиаторов, таких как TGF- β , простагландин E2 и фактор активации тромбоцитов (PAF).

В связи с представленными результатами была высказана точка зрения, что если некроз активно инициирует иммунный ответ на продукты клеточного распада и участвует в развитии воспаления, то апоптоз является доминирующей формой гибели клеток, индуцирующей иммунную толерантность. Однако чрезмерный, ускоренный апоптоз, возникающий при недостаточном удалении апоптотических клеток, например, при СКВ, может привести к массивному накоплению этих клеток, которые подвергаются вторичному некрозу [81].

Потеря целостности плазматической мембраны и высвобождение клеточного содержимого вторичными некротическими клетками, которые можно отнести к DAMP, могут спровоцировать иммунный ответ на ауто-АГ и способствовать развитию СКВ. При этом аутоантитела способствуют поглощению вторично некротизированного клеточного материала фагоцитами, что сопровождается секрецией большого количества провоспалительных цитокинов этими клетками [152].

Необходимо обратить внимание на следующий аспект патофизиологии апоптоза, касающийся аутоиммуногенности продуктов этого процесса. В работах [11, 160] показано, что незрелые ДК способны к фагоцитозу апоптотических клеток, хотя и не так эффективно, как макрофаги. Эти ДК могут перекрестно представлять вирусные, опухолевые и аутоантигены цитотоксическим CD8⁺Т-клеткам, активируя их аутоиммунные качества. Одновременно цитотоксические CD8⁺Т-клетки сами могут индуцировать апоптоз мишеневых клеток посредством Fas-рецепторного механизма.

Было высказано предположение, что апоптотические клетки способствуют созреванию ДК путем усиления экспрессии костимулирующих молекул и индуцирования высвобождения провоспалительных цитокинов, одновременно стимулируя ауто-АГ-презентирующую функцию этих клеток. Эти же апоптотические клетки способны индуцировать и специфические Т-клеточные реакции [76]. ДК обладают ограниченной способностью к лизосомальной деградации (протеолизу) апоптотического материала из-за низкого содержания лизосомальных протеаз. Медленный протеолиз приводит к накоплению сигналов опасности (DAMP), которые взаимодействуют с TLR- и NLR-рецепторами со всеми вытекающими из этого аутоиммунными и воспалительными последствиями [55].

Дополнительным фактором аутоиммунизации является то, что материал апоптоза сти-

мулирует дифференцировку В-лимфоцитов с Ig-рецепторами для апоптотических клеток в сторону продукции ауто-анти-апоптотических АГ. Соответственно, В-клетки, которые реагируют с апоптотическими клетками, могут нарушить баланс между толерантностью и аутоиммунитетом.

В свете представленных данных нашла обоснование следующая точка зрения относительно влияния аномального апоптоза на индукцию аутоиммунного ответа при ИВЗР (рис. 5). Согласно схеме, фагоцитоз апоптотических клеток Мф и ДК обычно сопровождается противовоспалительной реакцией и не связан с потерей толерантности. Однако неэффективное удаление апоптотических клеток влияет на образование ауто-АГ, презентация которых Мф и зрелыми ДК Т-клеткам может стимулировать выработку аутоантител.

Проиллюстрируем представленные выше принципиальные положения на примере СКВ. У пациентов с СКВ определяются повышенные показатели апоптоза, некроза и аутофагии в КВИ, а также снижение элиминации апоптотических и некротизированных клеток. Эти аномалии приводят к увеличению нагрузки ауто-АГ, модификациям этих антигенов, что усиливает воспалительные свойства ауто-АГ [40].

Подтверждением сказанного являются данные, согласно которым клубочковые апоптотические нуклеосомы были целью аутоантител против двухспиральной ДНК при волчаночном нефрите [80].

Макрофаги пациентов с СКВ имели нарушенную способность к фагоцитозу апоптотических клеток, что сопровождалось накоплением апоптотического материала в зародышевых центрах (GCS) лимфатических узлов. Фолликулярные ДК в герминативных центрах лимфоидных органов связываются с клеточным апоптотическим материалом *in situ* и это может служить сигналом для индукции аутореактивных В-клеток с последующей продукцией ауто-АГ [17]. Более того, снижение регуляции со стороны микро-РНК-98 индуцировало апоптоз в CD4⁺Т-клетках у пациентов с СКВ через активацию каспаз посредством Fas-рецептора [189].

Апоптотические Т-клетки увеличивались у пациентов с СКВ, что сопровождалось положительной корреляцией с индексом активности СКВ. В дополнение к Т-клеткам, чрезмерный апоптоз также наблюдался в фагоцитах, которые важны для удаления апоптотических клеток. Сыворотки СКВ могут индуцировать апоптоз в моноцитах и лимфоцитах, которые в свою очередь могут быть источником ауто-АГ [19]. Т-клетки при СКВ также могут индуцировать апоптоз моноцитов с помощью апоптотических лигандов.

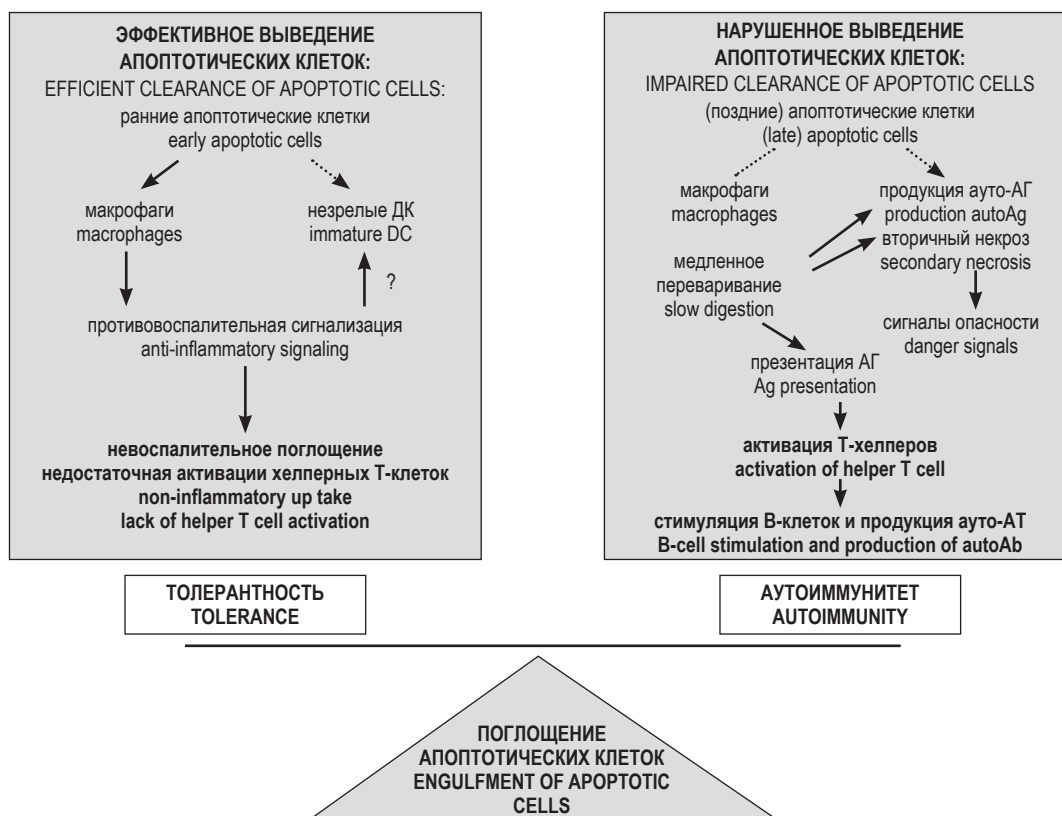


Рисунок 5. Баланс между иммунной толерантностью и аутоиммунитетом при ИВРЗ

Примечание. Слева представлена схема физиологического апоптоза, не приводящего к активации Т-клеточного иммунитета и воспалению; справа представлена схема измененного апоптоза при ИВРЗ, приводящая к аутоактивации Т- и В-клеточного иммунитета и развитию аутоиммунного воспаления.

Сокращения: DC – дендритная клетка, Ag – антиген, Ab – антитело, по материалам [110].

Figure 5. Balance between immune tolerance and autoimmunity in IVRD

Note. On the left is a scheme of physiological apoptosis, which does not lead to activation of T cell immunity and inflammation; on the right is a scheme of altered apoptosis in IVR, which leads to autoactivation of T and B cell immunity and the development of autoimmune inflammation. Abbreviations: DC, dendritic cell; Ag, antigen; Ab, antibody, based on materials [110].

В соответствии с этими данными, у пациентов с СКВ наблюдался повышенный апоптоз моноцитов/макрофагов, что способствовало образованию аутоантител и повреждению тканей [45].

Аналогичным образом, повышение уровня апоптотических нейтрофилов и Мф было обнаружено у пациентов с СКВ и этот уровень положительно коррелировал с активностью заболевания [153].

Таким образом, у пациентов с СКВ наблюдается высокий уровень апоптотических клеток, который, по крайней мере частично, объясняется массивным апоптозом в клетках тканей или в фагоцитах. Апоптотические клетки должны быть эффективно поглощены фагоцитами, чтобы предотвратить высвобождение клеточных компонентов, которые могут активировать иммунную систему. Нарушение элиминации апоптотических клеток при СКВ смещает баланс иммунной системы. Увеличение уровня апоптотических

нейтрофилов отмечалось в условиях дефектного фагоцитоза этого материала, что является существенным сигналом аутоиммунизации при этом заболевании.

Недавние исследования показали роль опсоинов в формировании иммуногенных и толерогенных характеристик ауто-АГ при ИВРЗ. Для быстрого распознавания и элиминации апоптотических клеток при ИВРЗ необходима опсонизация объекта фагоцитоза. В качестве опсоинов при этом выступает С-реактивный белок (СРБ), а также компонент системы комплемента С1q. СРБ не только способствует классическому пути активации комплемента, но также усиливает опсонизацию и фагоцитоз апоптотических клеток макрофагами [63].

У пациентов с СКВ наблюдался повышенный уровень аутоантител против СРБ, находящийся в прямой зависимости с активностью заболевания и поражением почек [76].

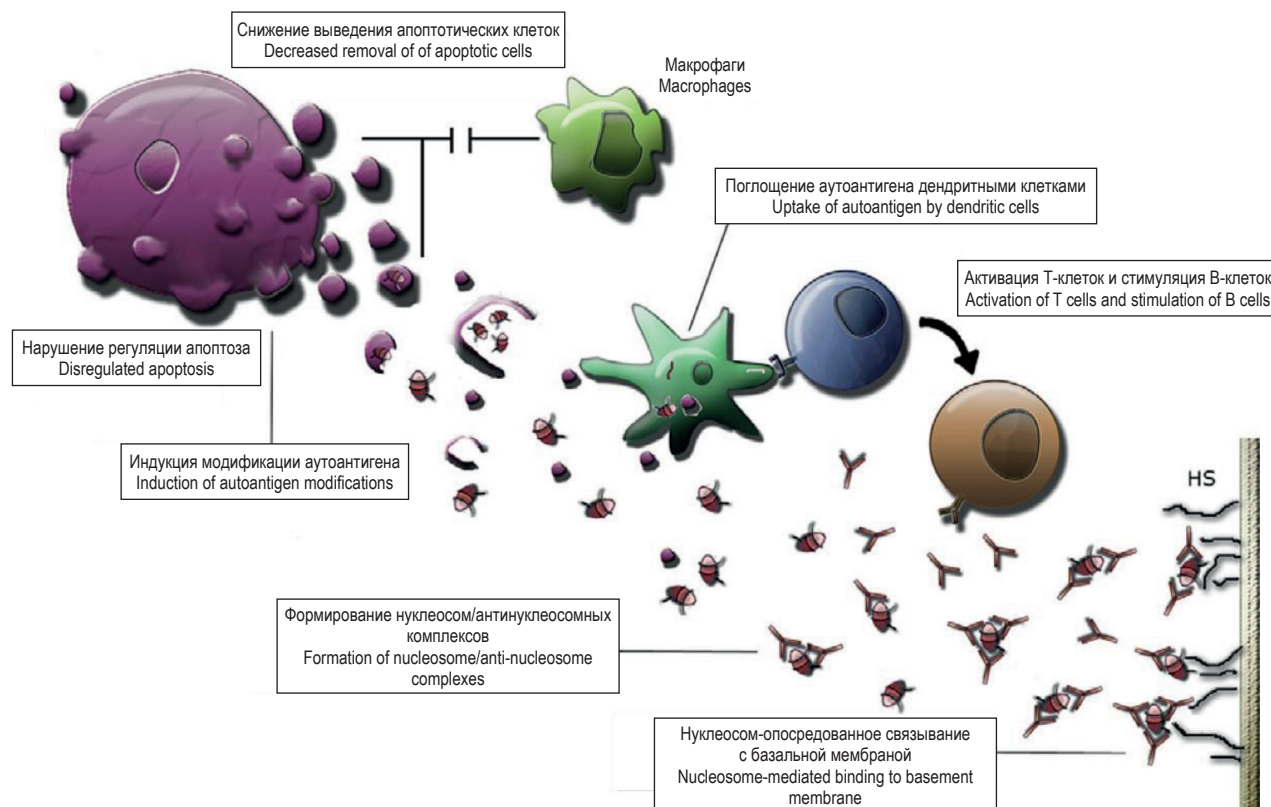


Рисунок 6. Схема патогенетического участия апоптоза при волчаночном нефрите, пояснения в тексте, по материалам [135]

Figure 6. Scheme of pathogenetic involvement of apoptosis in lupus nephritis, explanations in the text, based on materials [135]

Такая же картина складывается и в отношении C1q компонента комплемента. У пациентов с СКВ наблюдалось повышение антител против C1q, которые положительно коррелировали с нефритом, гипокомплементемией, антителами против dsDNA и циркулирующими иммунными комплексами [169].

Ниже представлена схема (рис. 6), демонстрирующая принципы патогенетического участия апоптоза при ИВРЗ на примере СКВ.

Согласно этой схеме, нерегулируемый апоптоз и/или недостаточное удаление апоптотических клеток приводит к высвобождению модифицированного клеточного материала в кровоток. Это приводит к активации АПК (макрофаги, дендритные клетки), аутоиммунному ответу, опосредованному Т- и В-клетками, образованию цитотоксических патогенных иммунных комплексов, способствующих возникновению гломерулонефрита.

Значение апоптоза изучено при РА. Показано, что Т-лимфоциты и В-лимфоциты в составе КВИ при РА устойчивы к Fas-индуцированному апоптозу и демонстрируют высокую экспрессию антиапоптотических молекул семейства Bcl. Эти клетки защищены от апоптоза фактором-1α

(SDF-1α), продуцирующимся синовиоцитами и лигандом рецептора хемокина (CXCR)4. Резистентность к апоптозу продемонстрировали и синовиальные фибробласты. Полагают, что такие изменения апоптоза при РА способствуют накоплению воспалительных клеток в составе КВИ в синовиальной оболочке, а также их гиперплазии и инвазивному росту [15, 29].

С использованием проточной цитометрии, показано, что апоптотические гранулоциты были статистически значимо выше у пациентов с РА по сравнению с контрольной группой. Причем это повышение сочеталось с увеличением уровня некротических гранулоцитов и моноцитов. На основании полученных данных авторы делают вывод о том, что нейтрофилы и моноциты при РА подвергаются апоптотическим модификациям, которые сопровождаются вторичным некрозом (см. выше) этих клеток при РА. Подобные сдвиги могут привести к накоплению ауто-АГ, что приводит к прогрессированию РА [95].

Получены интересные результаты, касающиеся патогенетического участия апоптоза при синдроме Шегрена. Показано, что при этом заболевании в биоптатах слюнных желез повышена экспрессия связанного с лизосомами мембран-

ного белка 3, обозначаемого как LAMP3/CD208/DC-LAMP. Экспрессия LAMP3 индуцирует дисфункцию эпителиальных клеток, приводящую к их апоптозу. Причем эта дисфункция сопровождалась статистически значимым увеличением сывороточных аутоантител, таких как анти-Ro/SSA, анти-La/SSB и антиядерных антител. Соответственно, делается вывод о том, что при болезни Шегрена LAMP3 инициирует апоптоз, а также независимый путь внеклеточного высвобождения известных ауто-АГ, приводящий к образованию аутоантител, связанных с этим заболеванием. Кроме этого, определяется перекрест молекулярных сигнальных путей между LAMP3-индуцированным апоптозом и аутофагией при синдроме Шегрена [175].

Патогенетическое значение апоптоза изучено и при полимиозитах. В частности, показано, что при этих заболеваниях в присутствии IFN I типа апоптотические миоциты вызывают выработку ауто-АТ, лимфоцитарную инфильтрацию *in situ* и непрерывные циклы повреждения и регенерации мышц. Нарушение апоптоза миоцитов при аутоиммунных полимиозитах, недостаточная элиминация апоптотического материала Мф вызывает «неадаптивное ремоделирование» мышц с накоплением коллагена и жира и аутоиммунного ответа на ауто-АГ мышечной ткани [166].

Таким образом, представленные данные свидетельствуют о неоспоримом патогенетическом значении апоптоза в КВИ при ИВРЗ. Следует обратить внимание, прежде всего, на противовоспалительные свойства апоптоза, а также на то, что апоптоз является формой гибели клеток, индуцирующей иммунную толерантность в том числе и к ауто-АГ. Накоплен большой материал, свидетельствующий о том, что регуляция указанных аспектов апоптоза, в частности сигнальных путей, является одним из перспективных направлений молекулярной иммунотропной терапии ИВРЗ.

Некроптоз и ассоциированные с повреждением молекулярные паттерны (DAMP)

Некроз, относящийся к основным категориям патоморфологии, является формой неконтролируемой гибели клеток, завершающейся аутолизом последних. Некроз является следствием воздействия экстремальных факторов, к числу которых, в частности, относятся инфекции, ишемия тканей, ионизирующая радиация, тепло, осмотический шок, механический стресс, замораживание-оттаивание и др. Отметим, что воздействие указанных факторов индуцируют случайную, неконтролируемую гибель клеток. Стадии некроза, а именно: паранекроз, некробиоз и аутолиз, отражают последовательность внутриклеточных процессов, приводящих, в конечном итоге, к на-

буханию органелл, увеличению объема клеток, разрушению плазмалеммы, а также клеточного ядра (кариопикноз, кариорексис, кариолизис). Из основных морфологических вариантов некроза (коликвационный, коагуляционный, казеозный и фибриноидный), преобладающим при ИВРЗ, является фибриноидный некроз клеток и тканей. Потеря целостности мембраны и высвобождение внутриклеточного содержимого придают некротическим клеткам способность вызывать неинфекционную воспалительную реакцию [22].

Детальное изучение молекулярных внутриклеточных процессов при некрозе показало, что в клетках существует множество сигнальных каскадов с участием адапторных молекул и последующей активацией транскрипционных факторов, напоминающих программу гибели клеток, которые дают основания для выделения определенных форм регулируемого некроза. К их числу относится наиболее часто упоминаемый некроптоз. Некроптоз — это генетически контролируемый процесс гибели клеток, характеризующийся грануляцией цитоплазмы, набуханием органелл, разрывом плазмалеммы. Эти признаки присущи и другим формам гибели клеток (этоз, нетоз, пиронекроз, пироптоз). Однако идентификация сигнальных путей, адапторных молекул и активации транскрипционных факторов, свойственных только некроптозу, позволило выделить этот процесс в качестве автономной формы клеточной гибели. При некроптозе отсутствуют такие маркеры апоптоза, как активация каспаз и конденсация хроматина и такие маркеры пироптоза, как активация провоспалительной каспазы-1. Некроптоз широко встречается при ишемических травмах головного мозга, при инфаркте миокарда, при гибели клеток, индуцированной химиотерапией опухолей, при окислительном клеточном стрессе.

Некроптоз представлен и в клетках воспалительного инфильтрата при ИВРЗ. Приятно отметить, что впервые понятие некроптоз ввел в научный обиход наш соотечественник А. Дегтярев [44].

Приведем примеры некоторых признаков некроптоза (рис. 7). В работе Berghe T. V. и соавт. [21] была использована клеточная линия мышечной фибросаркомы L929sAhFas, чувствительная к индукторам некроптоза — TNF и H₂O₂. В данном эксперименте основным фактором некроптотического поражения клеток была генерация активных форм кислорода и эта генерация совпадала с началом появления типичных признаков некроптоза. Методом фазово-контрастной и флуоресцентной микроскопии авторы показали, что оба стимула вызывали округление клетки, за ко-

торым следовало набухание клеток и грануляция цитоплазмы. Затем наблюдался разрыв плазматической мембраны, которая приобретала раздутый «баллонный» вид. Эти процессы сопровождались повреждением митохондрий и лизосом. Как при TNF-, так и при H_2O_2 -индуцированной гибели клеток активность каспаз не обнаруживалась, в отличие от Fas-индуцированного апоптоза.

Как указывалось выше, некроптоз встречается и при ИВРЗ. Воспаление при ИВРЗ является преимущественно продуктивным, сопровождающимся появлением эндогенных сигналов опасности, называемых «ассоциированные с повреждением молекулярные паттерны», или DAMP. Отличительной особенностью DAMP является их способность взаимодействовать с рецепторами врожденного иммунитета (TLR2, TLR4, TLR7, TLR9), экспрессирующихся на фолликулярных и плазматическоидных дендритных клетках (пДК и фДК) и активировать их [155].

DAMP способны взаимодействовать и с другими PRR-рецепторами на клетках в составе КВИ (NRL, RLR), тем самым принимая активное участие в неинфекционном воспалении [36].

В DAMP включают, в случаях неконтролируемого некроза, HMGB1, IL-1 α , мочевую кислоту, фрагменты ДНК, белки теплового шока (HSP70, HSP90), содержимое митохондрий, АТФ и др. [54, 87].

Номенклатура DAMP весьма противоречива. В целом эти молекулы, в физиологических условиях локализующиеся внутриклеточно, могут быть разделены на две группы. Во-первых, это молекулы, которые выполняют невоспалительные функции в клетках и приобретают иммуномодулирующие свойства при их высвобождении во время повреждения клеток или клеточного стресса, например, такие как HMGB1 и АТФ. HMGB1 — это высокомолекулярный, негистоновый, ядерный групповой белок-1, освобождающийся из клеток, подвергшихся инфекционному повреждению, некрозу, некробиозу, клеточному стрессу. И во-вторых, это алармины, т. е. молекулы, которые обладают цитокиноподобными функциями, которые высвобождаются при лизисе клеток и способствуют воспалительной реакции. К ним можно отнести, в частности, IL-1 α и IL-33 [142, 158].

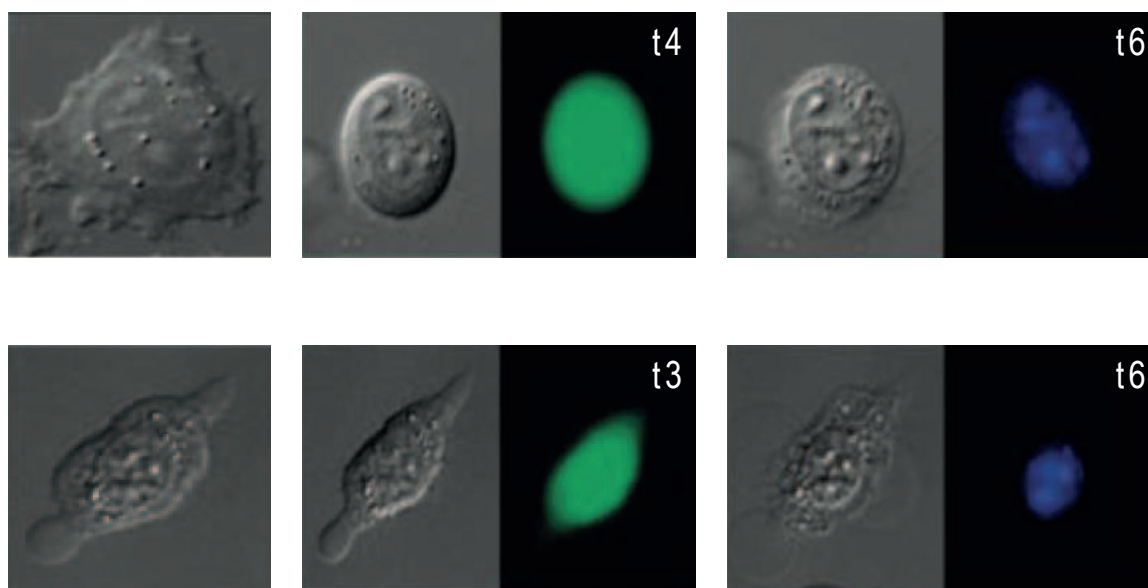


Рисунок 7. Картина некроптоза на клеточной линии мышинной фибросаркомы L929sAhFas, полученная методами фазово-контрастной и флуоресцентной микроскопии

Примечание. Верхний ряд – TNF-индуцированный некроптоз, нижний ряд – H_2O_2 -индуцированный некроптоз. И том, и другом случаях наблюдается округление и набухание клеток, грануляция цитоплазмы с раздутым «баллонным» видом. Зеленая флуоресценция – свидетельство продукции активных форм O_2 , синяя флуоресценция – свидетельство разрывов плазматической мембраны, сопровождающиеся нарушением ее проницаемости, по материалам [21].

Figure 7. Picture of necroptosis on the cell line of mouse fibrosarcoma L929sAhFas, obtained by phase contrast and fluorescence microscopy

Note. The upper row is TNF-induced necroptosis, the lower row is H_2O_2 -induced necroptosis. In both cases, there is rounding and swelling of cells, granulation of the cytoplasm with an inflated "balloon" appearance. Green fluorescence is evidence of the production of active forms of O_2 , blue fluorescence is evidence of ruptures of the plasma membrane, accompanied by a violation of its permeability, according to materials [21].

DAMP высвобождаются и при дезорганизации рыхлой волокнистой неоформленной соединительной ткани при ИВРЗ, приобретая при этом иммуногенные свойства.

Необходимо иметь в виду, что рецепторы врожденного иммунитета (TLR, NLR, RLR), экспрессирующиеся на дендритных клетках (ДК) и на клетках макрофагально-моноцитарного ряда в составе КВИ при ИВРЗ способны взаимодействовать как с DAMP, так и с молекулярными паттернами, связанными с инфекционными патогенами — PAMP. Факт весьма примечательный, указывающий на сходство между реакциями, вызванными инфекционными патогенами, и воспалительными реакциями на стресс, повреждение или смерть клеток [78].

Подобный взаимный перекрест сигнализации DAMP и PAMP является важным патогенетическим звеном при ИВРЗ. Известно, что инфекция, прежде всего вирусам, отводится роль триггеров ИВРЗ. В процессе эволюции взаимодействие вирусов и эукариотических клеток привело к отбору генов, которые способствуют гибели инфицированных клеток, в том числе путем некроптоза и апоптоза. Таким образом блокируется размножение и распространение вирусов в инфицированной клетке и в организме в целом. Однако в процессе той же эволюции выработались адаптивные вирусные механизмы, позволяющие им предотвратить гибель инфицированных клеток хозяина, тем самым позволяя вирусам неограниченно реплицироваться. К таким механизмам относят формирование специфических ингибиторов каспазы-8, таких как модификатор цитокинового ответа А (CrmA), вирусный ингибитор активации каспазы (v-ICA) и вирусные FLICE-подобные ингибирующие белки (FLIPs) [131].

Ингибирование активности каспазы-8 предотвращает иницирование апоптоза и в то же время является ключевым условием индукции некроптоза. Это послужило поводом для заключения, что в данной ситуации некроптоз выполняет защитные функции «двери-ловушки», которая открывается, когда каспаза-8 ингибируется и на этом фоне запускается процесс некроптоза с последующей гибелью клеток хозяина, а также вирусов, находящихся в ней.

Показано, что вирусная инфекция может сопровождаться выделением таких DAMP, как Hsp70 и HMGB1, которые прямо взаимодействуют с молекулой — передатчиком сигналов CD24 и лектином Siglec-G/10 (ось CD24-SiglecG/10), экспрессирующихся на клетках макрофагально-моноцитарного ряда и дендритных клетках в составе КВИ при ИВРЗ. И таким образом формируется взаимный перекрест DAMP и PAMP

определяющий, будут ли TLR и/или NLR, связанные с CD24 и экспрессирующиеся на вышеуказанных клетках, вызывать воспаление при воздействии DAMP [35].

В конце 80-х годов прошлого столетия было начато изучение так называемых рецепторно-взаимодействующих серин/треониновых киназ 1 и 3 (RIPK1 и RIPK3, соответственно), которые являются ключевыми киназами при некроптозе клеток, индуцированном TNF [100]. Затем был выявлен целый ряд индукторов некроптоза (более десятка) и молекулярные пути реализации этого процесса. К их числу относятся члены семейства фактора некроза опухоли (TNF), TLR-рецепторов (TLR3, TLR4) производные ДНК и РНК, RLR-рецепторов (RIG-1) [37, 197].

Таким образом, были представлены доказательства того, что есть формы некроза, которые контролируются генетически, зависят от активности RIPK1 и/или RIPK3, не зависят от активности каспаз, что и привело к появлению термина «некроптоз» для определения регулируемого некроза [61].

Характерной чертой некроптоза является то, что активность киназ RIPK1 и/или RIPK3 может ингибироваться молекулой, называемой некростатином 1 (NEC 1) [42].

В случае, когда некроптоз индуцируется провоспалительным цитокином TNF, задействованные сигнальные пути приводят к ингибированию каспазы-8 с последующим ауто- и трансфосфорилированием киназ RIPK1 и RIPK3, а также MLKL. Этот процесс, в конечном счете, приводит к их агрегации в микрофиламентоподобные (амилоидоподобные) комплексы, которые называются некросомами. Некросомы являются маркерами некроптоза, и их наличие свидетельствует об усилении этого процесса [105].

Некрсомы по своей молекулярной природе разнородны и, в зависимости от молекулярного состава, выделяют следующие их производные — это «комплекс I», содержащий молекулы TRADD, TRAF2/5, RIPK1, IAPs и LUBAC. Этот комплекс, после убиквитинирования, иницирует активацию транскрипционного фактора NF-κB, и остается связанным с рецептором TNFR1. В случае, когда рецептор TNFR1 подвергается эндосомальной интернализации, этот процесс сопровождается высвобождением рецептор-ассоциированного комплекса из TNFR1 и образованию предшественника каспазы-8 — прокаспазы-8, что приводит к образованию «комплекса II». Прокаспаза-8, подвергаясь процессу ограниченного протеолиза, трансформируется в активную каспазу-8. Комплекс II бывает двух типов — это комплекс IIa, который может вызвать апоптоз, за счет активации каспазы-8, и комплекс IIb, также назы-

ваемый некротомой, инициирующий некроптоз вследствие ингибирования каспазы-8 и фосфорилирования киназ RIPK1 и RIPK3 [145, 197].

Необходимо упомянуть еще о двух белках, взаимодействующих и регулирующих активность киназ RIPK1 и RIPK3. Это смешанная киназа, подобная белку (MLKL), и митохондриальная фосфатаза 5 (PGAM5). Фосфорилирование MLKL наделяет эту молекулу способностью перемещаться к плазматической мембране и нарушать ее целостность [199].

Таким образом, ключевыми молекулярными событиями индукции некроптоза является

индукция процессов фосфорилирования киназ RIPK1, RIPK3 и MLKL и негативная регуляция активности каспазы-8. Однако уникального биохимического маркера некроптоза не существует.

Разумеется, описанные молекулярные события являются сжатой картиной детально изученных молекулярных и межмолекулярных процессов, имеющих место в КВИ при ИВРЗ. Эта картина представлена на рисунке 8. Она отражает положение дел в этой области на период десятих-двадцатых годов нашего столетия. Исследования в этой области продолжаются.

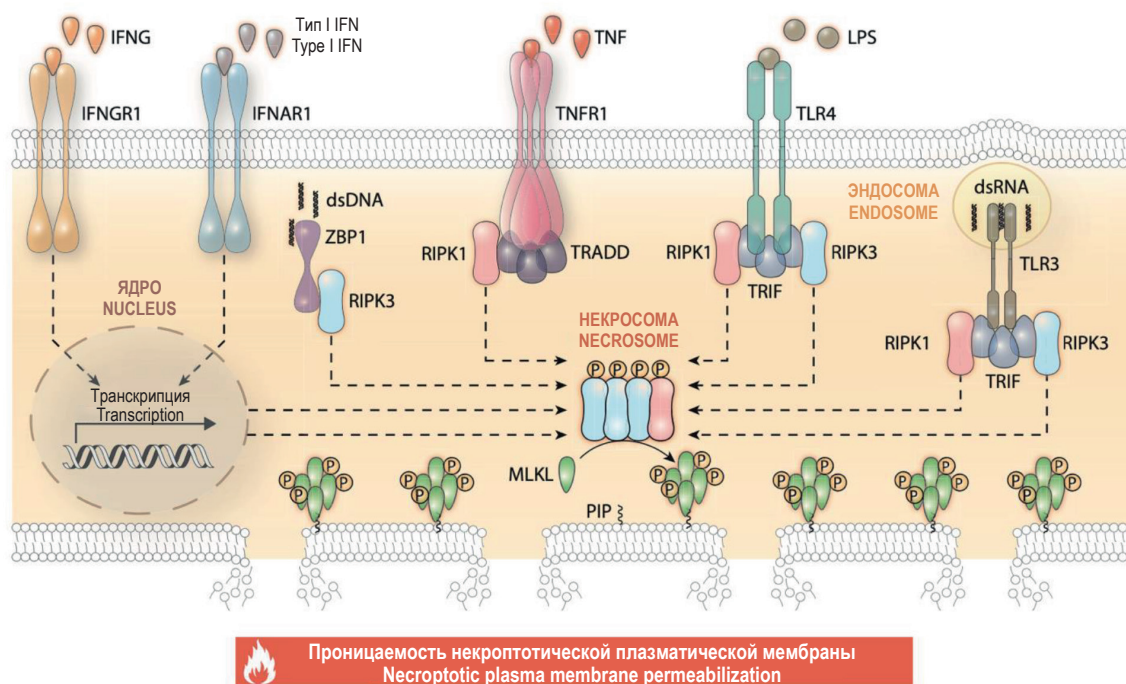


Рисунок 8. Молекулярные механизмы некроптоза

Примечание. Некроптоз критически зависит от взаимодействующей с TLR-, TNF-, IFN-рецепторами серин-треониновой протеинкиназы-1 и -3 (RIPK1 и RIPK3). Для некроптоза также важно фосфорилирование киназы смешанного происхождения (MLKL), приводящего к олигомеризации MLKL, транслокации этой молекулы во внутреннюю часть плазматической мембраны, нарушению ее целостности и гибели клеток. Образование некротомы, содержащей RIPK3 и MLKL, которая ускоряет некроптоз, может быть вызвано внеклеточными сигналами (например, связывание с рецептором смерти TNFR1), а также внутриклеточными сигналами (такими как присутствие вирусных нуклеиновых кислот) и регулируется сложной сетью функциональных белок-белковых взаимодействий.

Сокращения: dsDNA – двухцепочечная ДНК; dsRNA – двухцепочечная РНК; IFN – интерферон; IFNAR1 – рецептор интерферона (α и β); IFNG – γ -интерферон; IFNGR1 – γ -рецептор интерферона; LPS – липополисахарид; P – фосфат; PIP – фосфатидилинозитол фосфат; TLR – Toll-подобный рецептор; TNF – фактор некроза опухоли; TNFR1 – рецептор 1 к TNF; TRIF – молекула-адаптер Toll-подобного рецептора 1; ZBP1 – Z-ДНК-связывающий белок-1; по материалам [60].

Figure 8. Molecular mechanisms of necroptosis

Note. Necroptosis critically depends on serine threonine protein kinase 1 and 3 interacting with TLR, TNF, and IFN receptors (RIPK1 and RIPK3). Phosphorylation of mixed-origin kinase (MLL) is also important for necroptosis, leading to oligomerization of MLKL, translocation of this molecule into the inner part of the plasma membrane, violation of its integrity and cell death. The formation of a necrosome containing RIPK3 and MLKL, which accelerates necroptosis, can be caused by extracellular signals (for example, binding to the TNFR1 death receptor), as well as intracellular signals (such as the presence of viral nucleic acids) and is regulated by a complex network of functional protein-protein interactions.

Abbreviations: dsDNA, double-stranded DNA; dsRNA, double-stranded RNA; IFN, interferon; IFNAR1, interferon receptor (α and β); IFNG, γ -interferon; IFNGR1, γ -interferon receptor; LPS, lipopolysaccharide; P, phosphate; PIP, phosphatidylinositol phosphate; TLR, Toll-like receptor; TNF, tumor necrosis factor; TNFR1, TNF receptor 1; TRIF, adapter molecule of Toll-like receptor 1; ZBP1, Z-DNA-binding protein 1; based on materials [60].

Некроптоз присутствует при многих заболеваниях внутренних органов и систем, в том числе и аутоиммунных. Знание ключевых этапов этих процессов при некроптозе определяет стратегию разработки препаратов молекулярной таргетной терапии, в частности при ИВРЗ [88].

Важно, что активность киназы RIPK1 регулирует высвобождение цитокинов и аларминов в некроптотических клетках, в частности провоспалительного цитокина TNF α [38].

Также было показано, что при потере целостности плазмолеммы, некроптотический материал, находящийся во внеклеточной жидкости, подвергается процессу макропиноцитоза АПК [97]. Факт важный, поскольку при ИВРЗ процессинг некроптотических DAMP в АПК способствует презентации ауто-АГ в составе аллелей МНС I и II классов и индукции аутоиммунного ответа. Однако специфических DAMP, свойственных только некроптозу, не выявлено. Важно, что некроптоз, обусловленный RIPK3, способствует элиминации активированных Т-лимфоцитов, которые подверглись клональной экспансии в ответ на стимуляцию (инфекции, ауто-АГ), что имеет важное значение для поддержания гомеостаза Т-клеток, поскольку его нарушение может привести к иммунодефициту или аутоиммунитету.

К механизмам контроля некроптоза причисляют и аутофагию. Показано, что пролиферация Т-лимфоцитов нарушается в отсутствие генов аутофагии ATG5, ATG7, ATG3 или Беклина-1. Было высказано предположение, что киназа RIPK1 является связующим звеном между гибелью некроптотических клеток и аутофагией в активированных Т-клетках [69].

Показано, что некроптоз может быть вовлечен в патогенез и развитие СКВ, поскольку маркеры некроптоза определялись в В-клетках у пациентов с СКВ [56].

Открытие того, что конститутивная передача сигналов IFN γ способствует устойчивой экспрессии MLKL (смешанная киназа, подобная белку, регулирующая активность киназ RIPK1 и RIPK3, см. выше) и инициации некроптоза, подтверждает взгляд о том, что повышенная передача сигналов IFN γ при СКВ усиливает некроптоз, вызывая повреждение тканей [162].

Как упоминалось выше, некроптоз может способствовать воспалительным реакциям за счет высвобождения DAMP. Эти результаты могут дать определенные доказательства роли некроптоза в патогенезе и развитии СКВ. Кроме этого, следующие результаты указывают на важное патогенетическое значение провоспалительных свойств некроптоза при ИВРЗ. Показано, что некроптотическая сигнализация может индуцировать активацию воспалительной системы NLRP3

и, взаимосвязанный с этой системой — пироптоз, что еще больше усиливает воспалительную реакцию. NLRP3 (или криопирин) — это цитозольный NLR-рецептор, взаимодействующий с DAMP и/или PAMP, вовлеченный в активацию каспаз-1 и -5 с последующим образованием активных форм провоспалительных цитокинов IL-1 β и IL-18. NLRP3 экспрессируется клетками макрофагально-моноцитарного ряда и является основным компонентом воспалительных NLRP3-инфламмасом, формирующихся в указанных клетках в условиях продуктивного воспаления при ИВРЗ. Киназа RIPK3, необходимая для некроптоза, также способствует формированию воспалительных NLRP3-инфламмасом [101, 192].

Активацию воспалительных NLRP3-инфламмасом аналогичным образом индуцирует и MLKL, что также приводит к высвобождению IL-1 β [67].

К такому же эффекту приводит и высвобождающийся некроптотическими клетками АТФ, который, после связывания с рецептором P2X7, активирует инфламмасому NLRP3 и генерирует зрелый IL-1 β [170].

Митохондрии, высвобождаемые клетками в составе КВИ, подвергающихся некроптозу, индуцированному TNF α , могут быть поглощены макрофагами и дендритными клетками человека, что приводит к секреции вышеуказанных провоспалительных цитокинов макрофагами и индуцировать АГ-презентирующую функцию дендритных клеток [115].

При инфекционном воспалении показано, что интерфероны I типа могут способствовать сборке киназ RIPK1 и RIPK3, вызывая некроптоз макрофагов и высвобождение провоспалительных медиаторов (включая IL-1 α , IL-1 β и IFN γ) [157].

Представленные внутриклеточные молекулярные процессы присутствуют в эктопических лимфоидных структурах (ELS), в ГЗТ-гранулемах, а также в диффузном клеточном инфильтрате при ревматической лихорадке (РЛ), ревматоидном артрите (РА), системной красной волчанке (СКВ), дермато-полимиозите (ПМ).

Изучение экспрессии маркеров некроптоза и пироптоза методом количественной real time-PCR при экспериментальной СКВ показало, что экспрессия MLKL, GPX4 и PARP1 значительно повышалась в селезенке по мере прогрессирования заболевания, а CASP1, RIPK1, RIPK3 и CYPD были выше на ранних стадиях, но значительно снижались на более поздних стадиях. Напротив, в почках экспрессия генов, участвующих в пироптозе, например NLRP3 и CASP1, была значительно увеличена, а TNFR1, RIPK1, RIPK3 (маркеры некроптоза), CIAP1/2 и GPX4 были

значительно снижены по мере прогрессирования волчаночного нефрита. Таким образом была показана органная специфика экспрессии маркеров регулируемого некроза, зависящая также и от стадии заболевания [72].

Резюмируя вышесказанное, можно заключить, что принципиальное патогенетическое значение некроптоза при ИВРЗ заключается в том, что высвобождающиеся при дезорганизации рыхлой волокнистой неоформленной соединительной ткани DAMПы, взаимодействуя с NLR-, TNF-, IFN-рецепторами клеток-мишеней активируют (путем фосфорилирования) киназы RIPK1, RIPK3 и MLKL. Транслокация молекулярных комплексов с участием указанных молекул во внутреннюю часть плазматической мембраны, вызывает нарушение ее целостности и гибель клеток, т. е. возникает некроптоз. Эти процессы сопровождаются комплексной воспалительной реакцией *in situ* в паренхиматозных органах, в суставной щели, мышцах, коже, подкожной клетчатке, хрящевой ткани и др.

Пироптоз и аутоиммунное воспаление

Пироптоз (от греческих слов “pyro” — огонь или лихорадка и “ptosis” — падение) — это автономная, регулируемая, генетически запрограммированная форма гибели клеток, являющаяся важным механизмом врожденного иммунитета и принимающая активное патогенетическое участие при ИВРЗ. Автономия пироптоза обусловлена тем, что все внутриклеточные мембранные и молекулярные процессы обусловлены активностью провоспалительной каспазы-1, с последующим лизисом клетки и обязательной секрецией провоспалительных цитокинов IL-1 β и IL-18. Т. е. пироптоз является формой гибели клетки в условиях патологии. Необходимо отметить, что каспаза-1 не участвует в родственном пироптозу процессе, а именно — апоптозе. Уникальной особенностью пироптоза является то, что каспаза-1 активируется при непосредственном участии мультисубъединичного, олигомерного цитоплазматического комплекса, отвечающего за активацию воспалительного ответа — инфламасомы. При этом генерация каспазы-1 происходит за счет ограниченного протеолиза предшественника этого фермента — прокаспазы-1.

Эта форма гибели клетки впервые была описана Brennan M.A. и Cookson B.T. в 2000 г., как каспаза-1-зависимая неапоптотическая гибель клеток, индуцируемая макрофагами во время инфекции *Salmonella Typhimurium*. Эти же исследователи ввели термин «пироптоз» [26, 41].

Таким образом пироптоз сочетает в себе характеристики апоптоза (фрагментация ДНК) и некроза (воспаление и продукция цитокинов). Ввиду патогенетической важности процесса

пироптоза, приведем результаты экспериментов первооткрывателей этого процесса, когда впервые была продемонстрирована автономная форма гибели клеток, отличная от апоптоза и некроза, сопровождающаяся выбросом IL-1 β и зависящая от активности каспазы-1.

На рисунке 9 представлены результаты флуоресцентного анализа культуры клеток J774A.1, где впервые был зарегистрирован процесс пироптоза. В работе была использована макрофагоподобная клеточная культура J774A.1. Апоптоз клеток J774A.1 индуцировался грибовым ядом — глиотоксином. Некроз этих же клеток индуцировался путем их инфекции *S. Typhimurium* штамм SL1344. В таком варианте эксперимента и апоптоз, и некроз клеток J774A.1 сопровождался формированием крупных фрагментов ДНК, локализовавшихся в цитоплазме. Мутантный штамм *S. Typhimurium* SL1344, обозначенный как SL1344 prgH, не вызывал некроза клеток линии J774A.1, но в процессе инфицирования клеток J774A.1 этим мутантным штаммом все цитоплазматические события, связанные с собственно внутриклеточным инфекционным процессом протекали в полной мере. Процесс апоптоза клеток линии J774A.1, вызванный глиотоксином, и процесс некроза этих же клеток, вызванный инфицированием *S. Typhimurium* штаммом SL1344 определялся TUNEL-методом, при котором фрагментированная ДНК окрашивалась аннексином V, меченным флуоресцеина изотиоцианатом (FITC). Результат фиксировался по зеленой флуоресценции препаратов клеток J774A.1 в флуоресцентном микроскопе.

На рисунке 9А — это контрольные клетки J774A, обработанные физиологическим раствором. Видно, что флуоресценция отсутствует, вследствие сохранившейся целостности цитоплазматической мембраны;

В — классическая картина глиотоксин-индуцированного апоптоза клеток J774A. Видна четкая флуоресценция фрагментов ДНК;

С и D — картина некроза клеток J774A, инфицированных различными дозами *S. Typhimurium* штамм SL1344, С — меньшей дозой, D — большей дозой. Также видна четкая флуоресценция фрагментов ДНК;

Е и F — картина пироптоза клеток J774A, инфицированных мутантным штаммом *S. Typhimurium* — SL1344 prgH. В этом случае на препаратах клеток J774A флуоресценция не определяется, вследствие того, что при этой инфекции клеточная мембрана повреждается, высвобождается цитоплазматическое содержимое, в том числе и ДНК, и этот процесс является каспаза-1-зависимым.

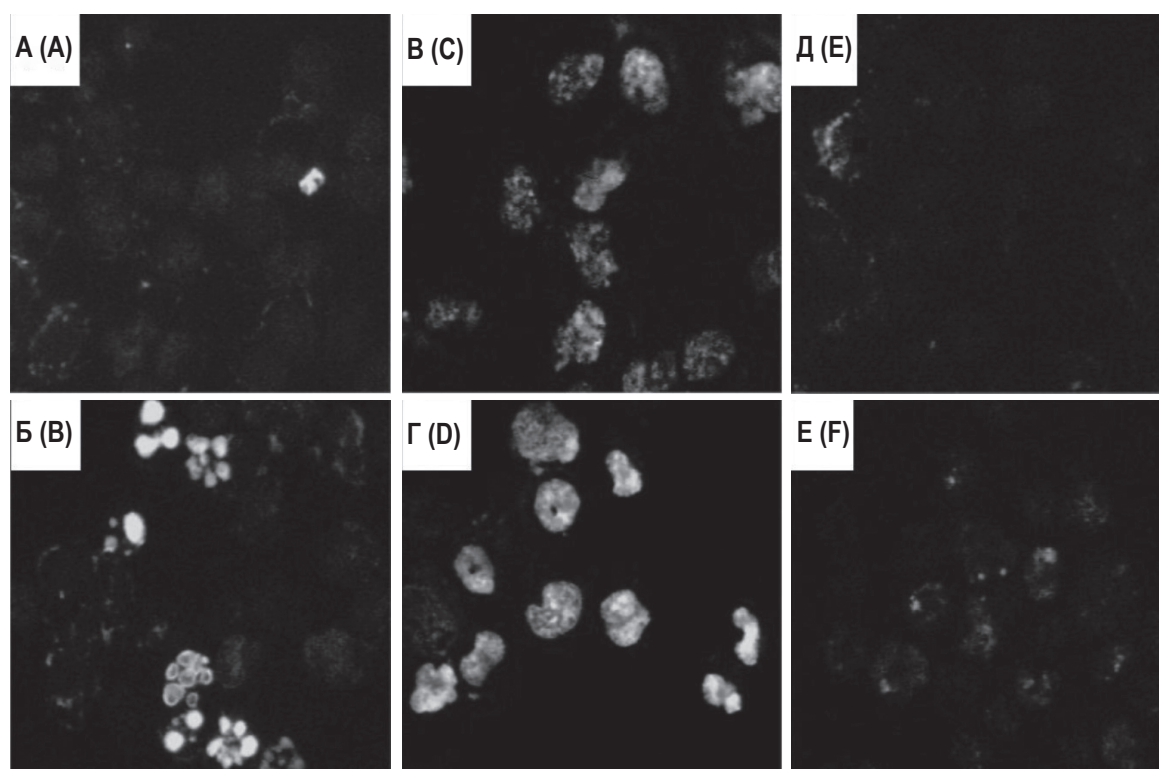


Рисунок 9. Результаты флуоресцентного анализа гибели клеток линии J774A.1 при глиотоксин-индуцированном апоптозе (Б), при инфицировании *S. Typhimurium* штамм SL1344 (В и Г), при инфицировании мутантным штаммом *S. Typhimurium* SL1344 prgH (Д и Е). А – контрольные клетки J774A

Примечание. Пояснения в тексте, по материалам [26].

Figure 9. The results of the fluorescent analysis of cell death of the J774A line.1 with gliotoxin-induced apoptosis (B), with infection with *S. Typhimurium* strain SL1344 (C and D), with infection with mutant *S. Typhimurium* strain SL1344 prgH (E and F). A, control cells J774A

Note. Explanations in the text, based on materials [26].

Так впервые был идентифицирован процесс клеточной гибели, отличный от апоптоза и некроза, зависимый от активности каспазы-1, сопровождающийся выбросом $\text{IL-1}\beta$ и названный этими же авторами пироптозом.

Ранним признаком пироптоза является образование в плазмалемме бочкообразных пор диаметром 10-15 нм. Формирование пор обусловлено белками семейства газдерминов (GSDM), состоящего у человека из 6 членов. Порообразующая способность газдерминов обеспечивается протеолитической активностью провоспалительных каспаз, прежде всего каспазы-1. Эти поры формируют клеточные ионные градиенты и в клетку поступает большое количество ионов Ca^{2+} , происходит повышение осмотического давления, увеличивается приток воды, возникает набухание клеток и, в конечном счете, осмотический лизис и высвобождение внутриклеточных провоспалительных цитокинов. При этом Ca^{2+} также способствует экзоцитозу лизосом и фагоцитированных частиц. Ионы Ca^{2+} обеспечивают

сборку так называемого эндосомального сортировочного комплекса (ESCRT), необходимого для выноса внутриклеточного содержимого во вне клетки при пироптозе, а также для восстановления поврежденной плазмалеммы [57, 179].

Поскольку порообразование является базисным элементом литической гибели клетки при пироптозе, целесообразно привести схему, иллюстрирующую сказанное (рис. 10).

Следующей отличительной особенностью пироптоза является то, что расщепление ДНК носит фрагментированный характер, эти фрагменты состоят из олигонуклеосом, сопровождается заметной ядерной конденсацией и зависит от активности каспазы-1. Если при апоптозе повреждение ДНК обусловлено работой ДНК-азы, то при пироптозе ДНК-аза остается связанной со своим ингибитором – ICAD (Inactive Caspase-Activated DNase), что обуславливает не разрезание, а фрагментацию ДНК.

Активность каспазы-1 приводит к множеству процессов, включающих гибель клеток, моду-

лению продукции воспалительных цитокинов, ограничение репликации патогена, контроль микробной инфекции. Пироптоз наряду с некроптозом служит важным механизмом элиминирования зараженных и измененных клеток, что важно при ИВРЗ. Однако в случаях, когда инфекция принимает генерализованный характер с поражением, в частности, костного мозга, пироптоз встречается в гемопоэтических стволовых клетках всех ростков кроветворения. В результате чего индуцируется картина заболеваний, связанных с нарушениями гемопоэза, цитопениями и иммуносупрессией.

Инициирование пироптоза, как показало более углубленное изучение этого процесса, не ограничивается активностью только каспазы-1. Показано, что пироптотическая гибель Мф, инфицированных грамотрицательными бактериями, такими как *E. coli* и *Citrobacter rodentium*, обусловлена также и активностью каспазы-11. Гуанилат-связывающий белок (GBP) в составе цитоплазматических вакуолей, позволяет проникать бактериальному липополисахариду (LPS) в цитоплазму, где LPS непосредственно связывается с доменом CARD каспазы-11 с последующей олигомеризацией и активацией этого фермента. В таком варианте процесс пироптоза не нуждается в активности каспазы-1. Каспаза-11 уча-

ствует в воспалении, при котором формируется NLRP-3 инфламасома (см. ниже), параллельно стимулируя продукцию каспазы-1-зависимых цитокинов — IL-1 β и IL-18. Такой путь был назван «неканоническим» путем формирования воспалительной NLRP-3 инфламасомы и процесса пироптоза [84]. Рисунок 11 иллюстрирует сказанное.

Пироптоз регистрируется в клетках иммунной системы — CD4⁺T-клетках, В-клетках, макрофагах (Мф), дендритных клетках (ДК), в нейтрофилах, в моноцитах, гепатоцитах, эндотелиоцитах, кератиноцитах, эпителиоцитах, нейронах и других типах клеток. Одна из причин того, что именно в этих клетках индуцируется пироптоз является наличие в них более высоких уровней воспалительных каспаз и прежде всего каспазы-1 [183].

Появились данные о том, что пироптоз является активным участником гибели CD4⁺ клеток в лимфоидной ткани при ВИЧ инфекции, причем одна из причин лихорадки при этой инфекции является гиперпродукция IL-1 β , свойственная пироптозу [49].

Активность каспазы-1 является патогенетическим звеном таких заболеваний как инфаркт миокарда, нейродегенеративные заболевания,

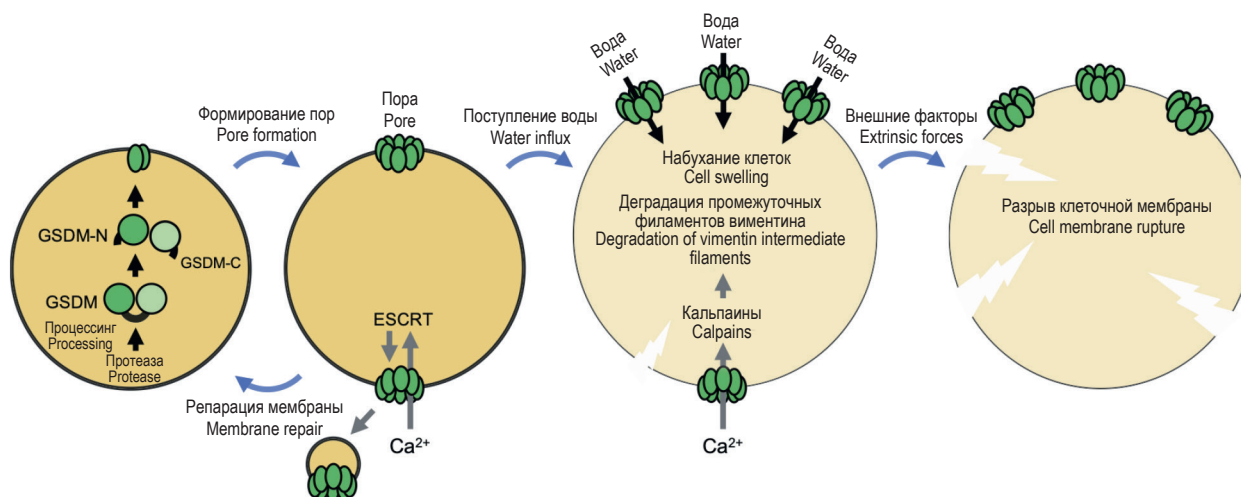


Рисунок 10. Молекулярный механизм порообразования при пироптозе

Примечание. Семейство GSDM находится в клетке в виде неактивных форм. Провоспалительные каспазы (каспазы-1) протеолитически активируют GSDM. N-концевые фрагменты GSDM и кальпаины образуют поры в плазматической мембране. Эти поры вызывают приток воды и ионов Ca²⁺, обуславливающих сборку эндосомального сортировочного комплекса (ESCRT), набухание клеток и, в конечном счете, разрыв плазмалеммы, по материалам [179].

Figure 10. Molecular mechanism of vaporization in nephroptosis

Note. The GSM family is in the cell in the form of inactive forms. Pro-inflammatory caspases (caspase-1) proteolytically activates GSM. The N-terminal fragments of GSDM and calpains form pores in the plasma membrane. These pores cause an influx of water and Ca²⁺ ions, which cause the assembly of the endosomal sorting complex (ESCORT), cell swelling and, ultimately, rupture of the plasmalemma, according to materials [179].

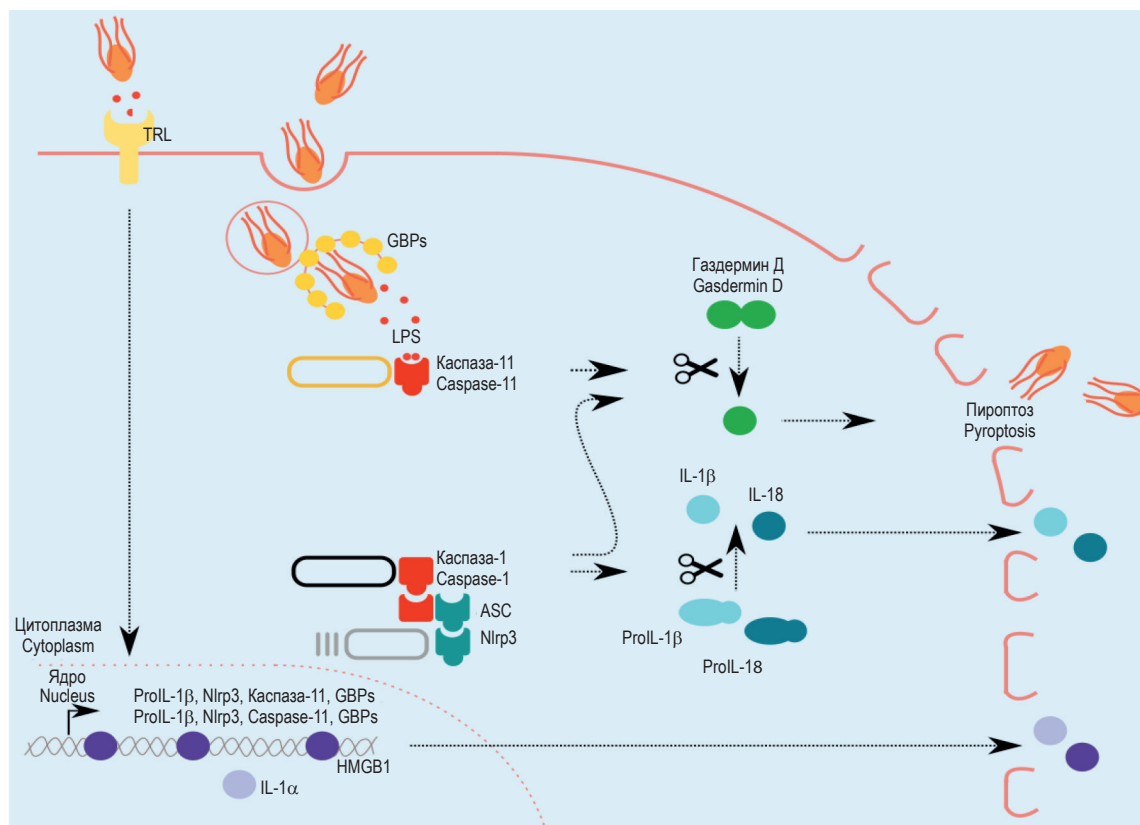


Рисунок 11. Молекулярные механизмы активации NLRP-3 инфламмосомы и индукции пироптоза

Примечание. На первом этапе инициация пироптоза происходит за счет формирования NLRP-3 инфламмосомы и генерации предшественников провоспалительных цитокинов и каспазы-11. На втором этапе собирается активная NLRP-3 инфламмосома и активируется каспаза-1, которая генерирует зрелые формы IL-1β и IL-18, а также продукты протеолиза газдермина D. Газдермин D – это белок газдерминового семейства, являющийся субстратом для каспазы-1, который, после ограниченного протеолиза, трансформируется в эффекторные молекулы, нарушающие целостность плазмолеммы. Каспаза-11 активируется независимо от каспазы-1 и, после взаимодействия с внутриклеточными бактериальными ЛПС, способствует пироптозу через протеолиз газдермина D. Пироптоз характеризуется быстрым разрывом плазматической мембраны, что приводит к высвобождению внутриклеточных патогенов, провоспалительных цитокинов IL-1β и IL-18 и аларминов HMGB1 и IL-1α, по материалам [183].

Figure 11. Molecular mechanisms of NLRP3 inflammasome activation and pyroptosis induction

Note. At the first stage, the initiation of apoptosis occurs due to the formation of NLRP3 inflammasome and generation of precursors of proinflammatory cytokines and caspase-11. At the second stage, an active NLRP-3 inflammasome is assembled and caspase-1 is activated, which generates mature forms of IL-1β and IL-18, as well as products of proteolysis of gasdermin D. Gasdermine D is a protein of the gasdermine family, which is a substrate for caspase-1, which, after limited proteolysis, is transformed into effector molecules that violate the integrity of the plasmalemma.

Caspase-11 is activated independently of caspase-1 and, after interaction with intracellular bacterial LPS, promotes pyroptosis through proteolysis of gasdermine D. Pyroptosis is characterized by rapid rupture of the plasma membrane, which leads to the release of intracellular pathogens, proinflammatory cytokines IL-1β and IL-18 and alarmins HMGB1 and IL-1α, according to materials [183].

воспалительные заболевания кишечника, эндотоксический шок [194].

Пироптоз и высвобождение DAMP

Пироптоз индуцируется внутриклеточными и внеклеточными сигналами «опасности», генерируемых вторгающимися патогенными микроорганизмами или хозяином в ответ на повреждение клеток и тканей, что имеет место при ИВРЗ. Или, иными словами, PAMP и DAMP [119].

Сенсорами подобных сигналов являются две группы PRR-рецепторов, а именно – мембранные TLR-рецепторы (для внеклеточных сигналов) и цитоплазматические NLR-рецепторы (для внутриклеточных сигналов). В случае связывания внутриклеточных патогенов (PAMP) или продуктов дезорганизации внутриклеточного содержимого (DAMP) с NLR-рецепторами начинается сборка указанного выше мультибелкового, олигомерного цитоплазматического

комплекса — инфламмасомы. В инфламмасомах происходит активации каспазы-1, которая необходима для образования и выделения провоспалительных цитокинов IL-1 β и IL-18. IL-18 является продуктом протеолиза IL-1 β , в результате чего эта молекула преобразуется в гликопротеин с молекулярной массой 18 кДа, определяемый как IL-18 и имеющий практически те же свойства, что и IL-1 β .

Инфламмасомы, участвующие в пироптозе, также имеют уникальную особенность, а именно — наличие домена привлечения и активации каспаз — CARD-домена. Посредством CARD-домена инфламмазома связывается с несколькими молекулами прокаспазы-1 и, как следствие ограниченного протеолиза, формируются две молекулы (p10 и p20), которые, объединившись, образуют активную каспазу-1. Активная каспаза-1 превращает про-IL-1 β и про-IL-18 в активные формы этих молекул. Эти цитокины принимают активное участие в патогенезе ИБПЗ. IL-1 β является пирогенным цитокином, который, после взаимодействия со своим рецептором 1-го типа (IL-1R1), мобилизует и активирует клетки иммунной системы. Эта активация приобретает черты аутоиммунного ответа на продукты дезорганизации рыхлой волокнистой соединительной ткани при ИБПЗ. Внеклеточный IL-18, также после взаимодействия со своим рецептором (IL-18R), стимулирует дифференцировку CD4⁺ клеток в направлении Th1, и этот процесс является ведущим при формировании ГЗТ-гранулем при ИБПЗ [89].

Таким образом, пироптоз клеток в составе КВИ при ИБПЗ является механизмом, способствующим пассивному высвобождению этих крайне активных провоспалительных цитокинов.

В контексте ИБПЗ необходимо подчеркнуть, что из пироптотических пор во внеклеточную среду поступают DAMP, имеющие ауто-антигенные характеристики и индуцирующие аутоиммунный ответ. На рисунке 12 представлена схема, иллюстрирующая выброс во внеклеточную среду таких патогенетически важных при ИБПЗ DAMP, как АТФ, HMGB1, IL-1 α и адаптерного митохондриального белка ASC.

Механизм пироптоза, как говорилось выше, является литическим, что приводит к выбросу дополнительных воспалительных факторов, из которых наибольший интерес при ИБПЗ представляют факторы, относящиеся к DAMP. Речь идет, в частности, о группе ядерных белков с высокой подвижностью (HMGB1), группе белков S100 (24 членов группы с различными внутри- и внеклеточными функциями) и IL-1 α . Отметим, что в физиологических условиях эти белки являются факторами внутриклеточного гомеостаза.

При ИБПЗ пироптоз клеток в составе КВИ придает этим белкам свойства DAMP, или аларминов [98].

При пироптозе наибольшее значение имеет инфламмазома, сформированная при участии NLR-рецепторов (Nod1 и Nod2), LRR-домена (обогащенный лейцином повторы), NBD-домена (нуклеотид-связывающий домен олигомеризации) и PYD-домена (пириновый домен). Эти инфламмасомы носят название NLRP-1, NLRP-3, NLRP-6, NLRP-7, NLRP-12 инфламмасом. Наиболее хорошо изучена инфламмазома NLRP-3. С учетом важной роли этой инфламмасы в воспалении, есть даже вариант этого процесса с названием «NLRP-3 воспаление». Взаимодействие каспазы-1 и NLRP-3 инфламмасы происходит при помощи адаптерного белка ASC, который и содержит в себе упомянутый выше домен рекрутирования каспазы — CARD-домен. Это происходит потому, что активировать прокаспазу-1 NLRP3 может только в присутствии молекулы-адаптера ASC [8].

NLRP-3 инфламмазома реагирует на множество стимулов, включая токсины, образующие мембранные поры, внеклеточный АТФ (из митохондрий), вирусные ДНК, РНК, ультрафиолетовое облучение и, что особенно важно, ауто-DAMP, а именно — ДНК, РНК, гиалуроновую кислоту, АТФ и др. аутологичных клеток, подвергшихся пироптозу, некроптозу, аутофагии и апоптозу в КВИ при ИБПЗ [138, 159].

NLRP-3 инфламмазома обладает многосторонними патофизиологическими свойствами. В частности, активность инфламмасы NLRP3 и каспазы-1 непосредственно связана с выраженностью симптомов таких заболеваний, как сахарный диабет 2-го типа и ожирение. Патогенетическая связь обусловлена тем, что каспаза-1 влияет на уровни IL-1 β и IL-18, которые ослабляют секрецию инсулина. Кроме этого, каспаза-1 способствует уменьшению поглощения клетками глюкозы, что связано с состоянием инсулинорезистентности [182].

Мутации в генах NLRP-3 инфламмасы, сопровождающиеся гиперпродукцией IL-1 β , ассоциированы с развитием таких иммуновоспалительных заболеваний, как неонатальное мультисистемное воспалительное заболевание, подагра, синдром Макла—Уэльса, криопиринопатии [39].

Помимо NLRP-3 инфламмасы при ИБПЗ немаловажную роль играет другая инфламмазома, а именно — NLRC4 инфламмазома, которая реагирует на такие DAMP, как белок теплового шока — HSP90 и SGT1 (см. выше) И в этом случае признаки воспаления, обусловленные NLRC4 инфламмасомой, являются следствием

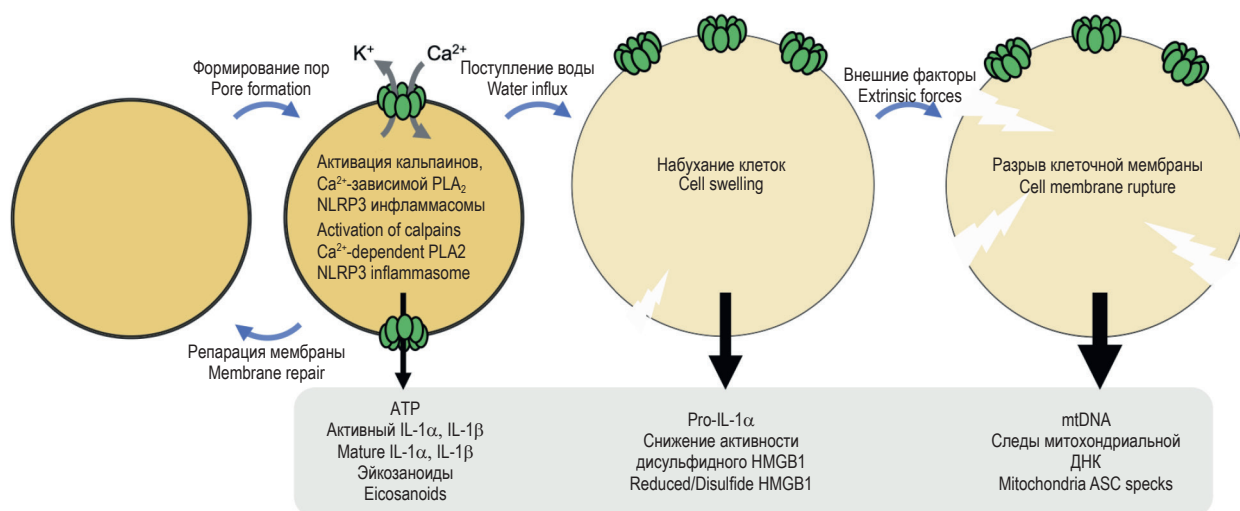


Рисунок 12. Формирование цитоплазматических пор в 10-15 нм при пироптозе создают возможность высвобождения цитозольного содержимого

Примечание. В составе этого содержимого находятся такие DAMP, как АТФ, IL-1 α , IL-1 β , HMGB1, митохондриальная ДНК (мтДНК), и собственно митохондрии, адаптерный белок ASC, способствующий активированию каспазы-1. В пироптотических клетках формируется провоспалительная NLRP-3 инфламмосома, по материалам [179].

Figure 12. Formation of cytoplasmic pores in 10-15 nm during pyroptosis makes it possible to release cytosolic contents

Note. This content contains such DAMPs as ATP, IL-1 α , IL-1 β , HMGB1, mitochondrial DNA (mtDNA), and mitochondria proper, the ASC adapter protein that promotes the activation of caspase-1. Proinflammatory NLRP3 inflammasome is formed in prostatic cells, according to materials [179].

гиперпродукции IL-1 β и IL-18 и быстрой гибели клеток путем пироптоза. Мутации, ассоциированные со структурой NLRC4 инфламмосомы, сопровождаются существенным увеличением в сыворотке крови уровня маркерного цитокина пироптоза – IL-18 [28].

Очень важное свойство NLRP-3 инфламмосомы и, связанного с ней пироптоза, имеющего непосредственное отношение к патогенезу ИВРЗ – это влияние «NLRP-3 воспаления» на адаптивный иммунитет. Маркерные цитокины пироптоза – IL-1 β и IL-18 играют важную роль в формировании адаптивных иммунных реакций. IL-1 β регулирует раннюю дифференцировку Th17-клеток [7].

Напомним, что субпопуляция Th17-лимфоцитов дифференцируется из активированных CD4^+ клеток независимо от Th1- и Th2-лимфоцитов и продуцирует ключевые цитокины – IL-17 и IL-23. Th17-клетки принимают участие в патогенезе ИВРЗ за счет своей провоспалительной активности, которая проявляется в поддержании хронического воспаления. Было показано, что IL-1 β взаимодействует с IL-23, индуцируя развитие $\gamma\delta$ -Т-клеток, продуцирующих IL-17, и тем самым способствует развитию аутоиммунных заболеваний. А синергизм действия IL-18 с IL-12 стимулирует Th1 клетки к продукции IFN γ , что способствует формированию ГЗТ-гранулем при ИВРЗ [173].

АГ-презентирующая функция Мф и ДК в отношении активации наивных Т-клеток с образованием эффекторных клеток Th1 и Th17 нуждается в присутствии в них NLRP3 инфламмосомы [18].

NLRP3, адапторная молекула ASC и связанная с ними активность каспазы-1, опосредуют контактную гиперчувствительность, которая состоит из опосредованных Т-клетками клеточных иммунных реакций на контактные аллергены [172].

Таким образом, инфламмосома NLRP3 опосредует продукцию IL-1 β и IL-18, которые, взаимодействуя с другими провоспалительными цитокинами, регулируют генерацию Т-эффекторных клеток и влияют на прогрессирование аутоиммунных заболеваний, в том числе и ИВРЗ.

Представлены интересные результаты экспериментальных исследований, в которых идентифицирован новый путь регуляции численности активных Мф, и этот путь связан с HMGB1-индуцированным пироптозом Мф. HMGB1 – это негистоновый ядерный высокомолекулярный групповой белок 1, присутствующий в ядре и цитоплазме почти всех типов клеток, по своим функциональным свойствам является прототипом молекулы DAMP. HMGB1 высвобождается из клеток, подвергшихся инфекционному повреждению, некрозу, некробиозу или клеточному стрессу и, взаимодействуя с RAGE-рецептором, служит медиатором воспаления, индуцирует кле-

точные иммунные реакции, хемотаксис и высвобождение провоспалительных цитокинов. Взаимодействуя с рецепторами врожденного иммунитета (TLR2, TLR4, TLR7, TLR9), экспрессирующихся на ДК и Мф, HMGB1 способствует продукции $IFN\alpha$, $IL-1\beta$, $TNF\alpha$ плазмацитоидными ДК и Мф, тем самым способствуя прогрессированию продуктивного воспаления *in situ* и усилению АГ-презентирующей функции ДК и Мф. Кроме этого, имеются данные о том, что HMGB1 способен индуцировать анти-HMGB1-антитела, которые относят к общему классу анти-ядерных ауто-АТ при ревматических заболеваниях [147]. Кроме этого, HMGB1 обладает способностью активировать тканевые металлопротеиназы (MMP1-9) и тканевой плазминоген, внося тем самым существенный вклад в дезорганизацию рыхлой волокнистой соединительной ткани.

Показано, что HMGB1, взаимодействуя с TLR2-, TLR4- и TLR9-рецепторами Мф, а также с RAGE-рецептором, эндоцитируется в цитоплазму этих клеток. Эндоцитоз HMGB1 запускает каскад молекулярных событий, включая высвобождение катепсина В из поврежденных лизосом с последующим образованием пироптозом и активацию каспазы-1. В этой же работе были приведены данные о том, что HMGB1-индуцированный пироптоз Мф также происходит *in vivo* во время эндотоксемии, что свидетельствует о патофизиологическом значении этой формы пироптоза в развитии воспаления [190]. Сказанное иллюстрируется рисунком 13.

RAGE является трансмембранным белком I типа, членом суперсемейства иммуноглобулинов, экспрессирующийся во многих клеточных популяциях, включая эндотелиоциты, сосудистые гладкомышечные клетки, нейроны, нейтрофилы и макрофаги/моноциты. Одной из функций RAGE является рецепторная функция, опосредующая хемотаксис и цитокиновую активность HMGB1.

ASC – адаптерный белок, содержащий CARD, входящий в состав пироптосом, мобилизующий прокаспазу-1, что приводит к ее активации и ограниченному протеолизу до функционально активной каспазы-1

Пироптоз и воспалительные заболевания

Появляется все больше работ, свидетельствующих об активном участии пироптоза при аутовоспалительных и инфекционных заболеваниях. Значимость механизмов пироптоза показана при клинико-генетических исследованиях при так называемом криопирин-ассоциированном периодическом синдроме (CAPS), состоящем из трех патогенетически связанных хронических воспалительных заболеваний возрастающей тяжести, а именно – семейного синдрома холодного ау-

товоспаления (FCAS), синдрома Макла–Уэллса (MWS) и неонатального мультисистемного воспалительного заболевания (NOMID). При таком синдроме определены мутации, ассоциированные с усилением провоспалительных свойств NLRP-3 инфламماسомы, интенсификацией воспаления, усилением пироптоза и избыточной секреции $IL-1\beta$ и $IL-18$. Системное воспаление, свойственное FCAS, сопровождается лихорадкой, сыпью, болями в суставах и конъюнктивитом. Терапия анакинрой, блокирующей активность $IL-1\beta$, была высокоэффективной при FCAS. Весьма вероятно, что связанные с пироптозом клеток DAMP являются патогенетически значимыми при этом аутовоспалительном заболевании [71, 118].

Все больше работ убедительно свидетельствуют о важной роли пироптоза в патогенезе и прогрессировании СКВ. Избыточная активация пироптогенной NLRP3 инфламماسомы была определена у пациентов с СКВ и волчаночным нефритом [59].

В присутствии антител против dsDNA может индуцироваться активность провоспалительной NLRP3 инфламماسомы. Аналогично, взаимодействие U1-малого ядерного рибонуклеопротеина (U1-snRNP) и антител против него также активирует NLRP3 инфламмасому [167, 168].

На мышинной экспериментальной модели СКВ показано, что ингибирование NLRP3 инфламماسомы с помощью MCC950 уменьшало степень протеинурии и улучшало патоморфологическую картину волчаночного нефрита [59].

Повышенные уровни сывороточного $IL-18$ определялись у пациентов с СКВ, и эти уровни статистически значимо коррелировали с тяжестью поражения почек и активностью заболевания [73].

Кроме того, высокие уровни HMGB1 были представлены не только в крови, но и в образцах биопсии почек пациентов с СКВ и уровни HMGB1 в сыворотке крови коррелировали с активностью заболевания СКВ [202]. Антитела к HMGB1 также встречаются у пациентов с СКВ [6].

Имеется немало свидетельств активного участия пироптоза при РА. В частности, показано, что $IL-18$ обнаруживается в синовиальных оболочках пациентов с РА. Экспрессия $IL-18$ была тесно связана с выраженностью местного воспаления и этот же цитокин способствует хемотаксису активированных моноцитов в синовиальную оболочку [34]. У этих же пациентов обнаружено повышение экспрессии генов каспазы-1 и NLRP3 инфламماسомы и эта экспрессия обнаруживала прямую положительную корреляцию с уровнями $IL-1\beta$ и $IL-18$ [91]. Сыворотка крови пациентов

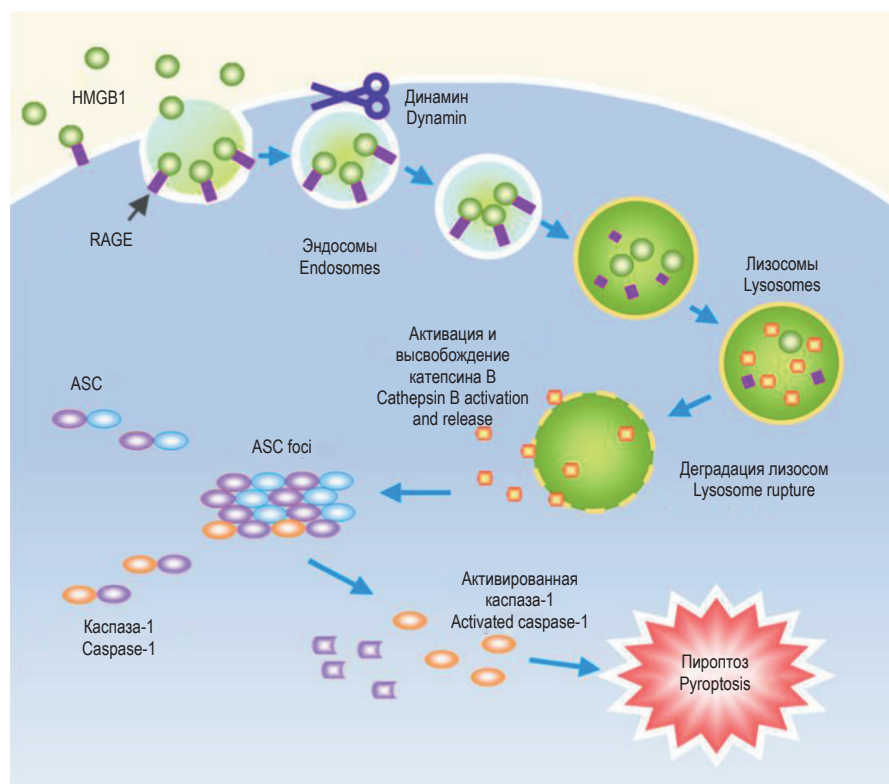


Рисунок 13. Модель HMGB1-индуцированного пироптоза макрофагов, пояснения в тексте

Примечание. Сокращения: HMGB1 – негистоновый ядерный высокоподвижный групповой белок 1; RAGE – рецептор, опосредующий хемотаксис и цитокиновую активность HMGB1; ASC – адаптерный белок, содержащий CARD, входящий в состав пироптосом, способствующий переходу прокаспазы-1 в каспазу-1, по материалам [193].

Figure 13. Model of HMGB1-induced macrophage apoptosis, explanations in the text

Note. Abbreviations: HMGB1 is a non-histone nuclear highly mobile group protein 1; RAGE is a receptor mediating chemotaxis and cytokine activity of HMGB1; ASC is an adapter protein containing CARD, which is part of pyroptosomes, contributing to the transition of procaspase-1 to caspase-1, according to [193].

РА индуцировала газдермин D-зависимый пироптоз в моноцитах, и эта способность была связана с активностью заболевания [187].

Наличие CD4⁺T-клеток, подвергшихся пироптозу при РА, было подтверждено фактом дефицита фермента репарации ДНК (нуклеазы MRE11A) у этих больных. Дефицит нуклеазы MRE11A в CD4⁺T-клетках при РА вызывал утечку митохондриальной ДНК в цитозоль, с последующей сборкой инфламмосомы, активацией каспазы-1 и, соответственно, индукцией пироптоза в CD4⁺T-клетках [107].

В адьювантной модели артрита у крыс показано, что экспрессия ASC, NLRP3, каспазы-1, а также IL-1 β и IL-18 была повышена в хондроцитах суставов крыс по сравнению с таковой у нормальных крыс [188].

Таким образом, пироптоз – это литический и воспалительный способ регулируемой гибели клеток, в результате которой внутриклеточные DAMP вытесняются быстрым разрывом плазматической мембраны. DAMP фагоцитируются

клетками макрофагально-моноцитарного ряда и ДК, в результате чего они приобретают свойства ауто-АГ. Наличие в очаге воспаления аутореактивных Т- и В-лимфоцитов обуславливает индукцию аутоиммунного ответа. Одновременно, при пироптозе DAMP, взаимодействуя с NLR-рецепторами, обуславливает сборку мультибелкового, олигомерного цитоплазматического комплекса – инфламмосом. При ИВРЗ наибольшее патогенетическое значение имеет NLRP3 инфламмосома. Закономерным итогом этих внутриклеточных молекулярных событий является гиперпродукция провоспалительных цитокинов IL-1 β и IL-18, которые вместе с DAMP, привлекают *in situ* дополнительные иммунные клетки, усиливающие аутоиммунный ответ на ауто-АГ при ИВРЗ.

Значение нетоза при иммуновоспалительных ревматических заболеваниях

Нейтрофилы (Нф) принадлежат к той категории уникальных клеток, которые используют смерть в качестве патогенетического механизма

модуляции воспаления, вызванного в том числе и DAMP, а также обеспечения эффективного удаления микроорганизмов во время инфекционного процесса.

Короткоживущие Нф способны быстро накапливаться в местах повреждения тканей, при наличии или при отсутствии инфекции, оперативно выполнять свои функции и отмирать с помощью механизмов, описанных ниже

Из известных форм запрограммированной и регулируемой гибели клеток у Нф описано по меньшей мере четыре типа — это апоптоз, аутофагическая гибель, некроптоз и нетоз. В процессах модуляции воспаления и элиминации инфекционных агентов принимают участие преимущественно две формы гибели нейтрофилов — апоптоз и нетоз.

Нетоз, или «внеклеточные сети, или ловушки», первоначально был отнесен к механизмам врожденного антиинфекционного иммунитета, реализуемого только Нф. Однако впоследствии этот феномен был выявлен в клетках макрофагально-моноцитарного ряда и назван «метозом» [51].

Экстернализация хроматина с образованием внеклеточных ловушек также обнаружена в эозинофилах, базофилах и тучных клетках [165].

Впервые новая, уникальная форма гибели Нф, несущая в себе функции врожденного антиинфекционного иммунитета, была описана в работе Brinkmann V. и соавт. в 2004 г. [27].

Авторы показали, что Нф, стимулированные IL-8, форбол-миристан-ацетатом (РМА) или липополисахаридом (ЛПС) при экспериментальной дизентерии и аппендиците у человека высвобождают гранулярные белки и хроматин, которые вместе образуют внеклеточные волокна, связывающие грамположительные и грамотрицательные бактерии. Эти внеклеточные ловушки (сети) обладали бактерицидными свойствами, которые обеспечивали высокую локальную концентрацию противомикробных агентов и предотвращали распространение микроорганизмов. Необходимо отметить важнейшее свойство нетоза, а именно — интенсивную локальную продукцию активных форм кислорода (АФК), обладающих выраженными бактерицидными свойствами. Первоначально этот феномен был описан как «кислородный взрыв» при фагоцитозе микробов Нф.

Таким образом, была открыта альтернативная форма гибели Нф, при которой реализуется эффекторная функция врожденного антиинфекционного иммунитета. Дальнейшее изучение этого феномена, показало активное участие нетоза при аутовоспалительных и аутоиммунных заболеваниях.

Нетоз является следствием последовательных внутриклеточных процессов, приводящих к смешиванию содержимого клеточного ядра с белковыми структурами, вытеснению этих образований из клеток и формированию внеклеточной волокнистой сети способной «захватить» и убить микроорганизмы. Сеть состоит из деспирализованной, транскрипционно неактивной ДНК, связанной с цитруллинизированными гистонами и гранулированными цитоплазматическими белками из первичных, вторичных и третичных гранул Нф, включая компоненты, обладающие воспалительной и бактерицидной активностями. К ним относятся эластаза нейтрофилов (NE), миелопероксидаза (МРО), катепсин G, α -дефензины, лактоферрин, пентраксин 3, желатиназа, протеиназа 3 и пептидогликансвязывающие белки [108].

В этих условиях ДНК нейтрофилов трансформируется в гетерохроматин внутри ядра, при этом ДНК оборачивается вокруг гистонов с образованием нуклеосом. При этом происходит важный при ИВРЗ процесс цитруллинизации гистоновых белков, имеющий важное значение при формировании ауто-АГ [87].

В контексте ИВРЗ триггерами нетоза могут быть следующие внеклеточные и внутриклеточные процессы:

- связывание TLR2 Нф грамположительными бактериями (витальный нетоз);
- связывание липополисахаридов грамотрицательных бактерий с Нф (витальный нетоз);
- опсонизация объекта фагоцитоза Нф компонентами активированной системы комплемента;
- аутофагия;
- связывание иммуноглобулинов и иммунных комплексов через Fc γ RIIA
- взаимодействие с рибонуклеопротеин — содержащими иммунными комплексами при СКВ
- некоторые аутоантитела (ANCA, сыворотки больных РА, СКВ);
- цитокины (IL-8, IL-17, TNF α , G-CSF, IFN α);
- хемокины;
- лектины и селектины;
- совместное культивирование активированных эндотелиальных клеток с Нф [23, 151].

Помимо бактериальных инфекций, нетоз может быть индуцирован также грибковыми [180], паразитарными [48] возбудителями, а также неинфекционными стимулами — кристаллами мочевой кислоты, кристаллами холестерина, аутоантителами, иммунными комплексами [64].

На рисунке 14 представлена картина нетоза, вызванного обработкой Нф форбол-миристан-ацетатом (РМА). Отчетливо видно, что РМА вы-

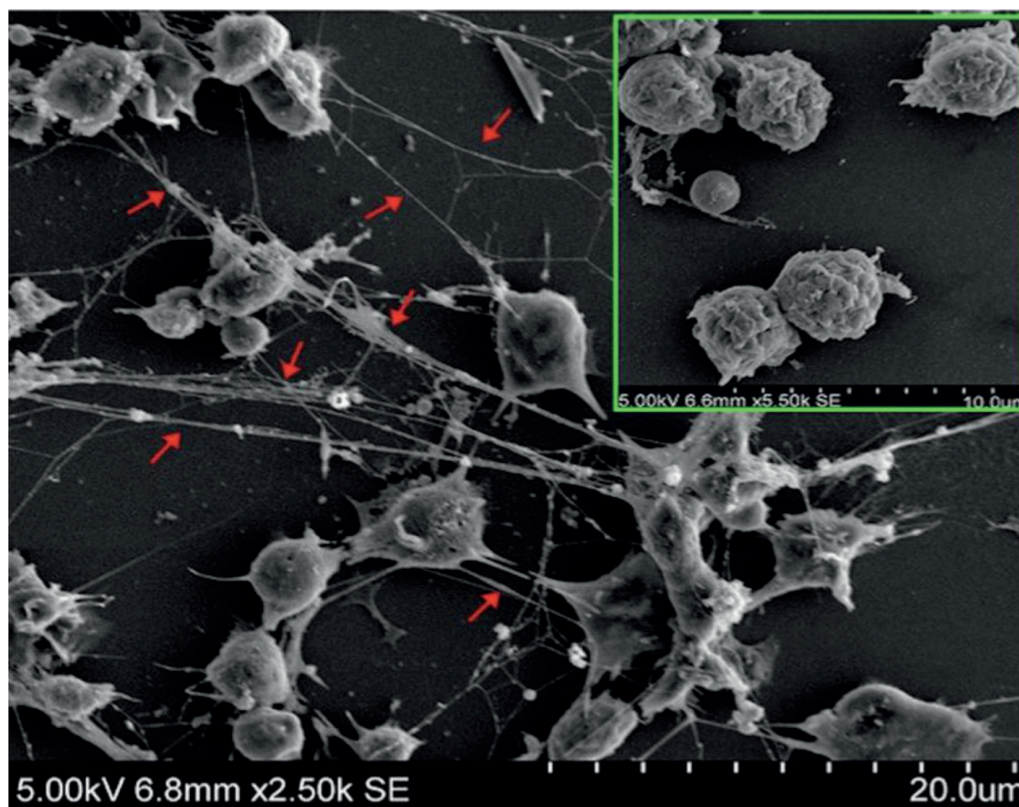


Рисунок 14. Картина нетоза, полученная с помощью сканирующего электронного микроскопа

Примечание. Красные стрелки указывают на нейтрофильные сети. Изображение в рамке отражает состояние intactных Нф, по материалам [74].

Figure 14. Picture of netosis obtained with a scanning electron microscope

Note. Red arrows indicate neutrophilic networks. The framed image reflects the state of intact Nf, according to materials [74].

зывает активный процесс формирования межклеточной сети, в которую вовлекаются все Нф. Создается нечто вроде клеточного конгломерата из активированных нейтрофилов, соединенных сетью в единое целое.

Не менее выразительны препараты нетоза, полученные методом иммунофлуоресценции. На рисунке 15 слева представлены intactные контрольные Нф, а справа Нф, стимулированные в течение 3 часов форбол-миристат-ацетатом (РМА). Нетоз определяется по признакам ремоделирования хроматина, визуализирующегося в виде экстрацеллюлярных структур, включающих в себя деспирализованную ДНК, гистоны и нейтрофильные белки — миелопероксидазу и нейтрофильную эластазу. Последняя, зеленого цвета, обрамляет клеточную стенку.

Идентифицированы несколько форм нетоза, различающиеся по внутриклеточным механизмам, а также по функциональному предназначению.

Первая форма — суицидальный нетоз. Это медленный процесс (от 120 до 240 минут), первым

этапом которого является сборка и активация комплекса NADPH-оксидазы (Nox), способствующей образованию активных форм кислорода (АФК) [3]. АФК обладает выраженными бактерицидными свойствами, но также повышает протеолитическую (а значит, и микробицидную) активность протеин-аргинин дезаминазы 4 (PAD4) и эластазы нейтрофилов (NE), а также миелопероксидазы (MPO). PAD4 и NE расщепляют основные ядерные гистоны. Отметим также, что комплекс NADPH-оксидаза способствует транслокации NE из цитозольных гранул в ядро, где она способствует расщеплению хроматина посредством расщепления гистонов.

Одновременно происходит патогенетически важный процесс при ИВРЗ, а именно — гиперцитруллинизация гистонов ферментом PAD4. Это приводит к деконденсации и мобилизации хроматина и, кроме этого, как указывалось выше, к индукции ауто-АГ, и, как следствие, дезорганизации рыхлой волокнистой соединительной ткани. Отметим, что активность фермента PAD4

отличает нетоз от апоптоза, поскольку индукция апоптоза предотвращает активацию PAD4 [151].

Важным свойством PAD4 является то, что во внеклеточной среде активация PAD4 может приводить к образованию цитруллинированных форм фибриногена, фибронектина, коллагена и других матричных белков, которые в этой ситуации могут выступать в качестве ауто-АГ при ИВРЗ [53].

Следующий этап суицидального нетоза состоит из МРО-зависимого распада оболочки ядра и смешивания ДНК с белками гранул внутри большой внутриклеточной вакуоли перед выдавливанием сеток из перфораций в плазмалемме с последующей гибелью Нф [125].

При суицидальном нетозе в дополнение к составу сети, указанному выше, в Нф определяется матриксная металлопротеиназа 9 (MMP-9), лизосомальный мембранный белок-2 (LAMP-2) и антибактериальный пептид, полученный из кателицидина, называемый LL-37. Активность этих белков способствует уничтожению некоторых микробов [176].

Отметим, что активация кальциевых и цинковых мембранных каналов способствует генерации АФК и цитруллинизации гистонов ферментом PAD4. Этому способствуют и процессы деграда-

ции внутриклеточных бактериальных, вирусных и простейших патогенов при аутофагии [65].

Вторая форма нетоза — витальный нетоз, возникает в ответ на патогенные микроорганизмы и представляет собой относительно быстрый процесс — от 5 до 60 минут. Эта форма нетоза характеризуется тем, что ядро теряет свою характерную дольчатую структуру. Мембрана ядра распадается, хроматин деконденсируется и попадает в цитоплазму, в то время как плазматическая мембрана остается неповрежденной. Затем, по истечении времени, плазмалемма разрывается, что приводит к высвобождению сети. Витальный нетоз зависит от АФК и активности NE [27, 125]. При этом обнаруживается интересное явление. Нф, лишенные ядра вследствие нетоза, сохраняют свою хемотаксическую способность, «преследуя и удерживая» бактерии, в частности стафилококк [196]. Т. е. этот механизм щадит внешнюю мембрану Нф, тем самым позволяя Нф отчасти выполнять свои функции.

Витальный нетоз индуцируется через рецептор TLR2, а также компонентами активированной системы комплемента (C1q) после контакта с грамположительными бактериями. Активное участие при этом принимают и тромбоциты, которые посредством своего TLR4-рецептора взаимодействуют с ЛПС грамотрицательных

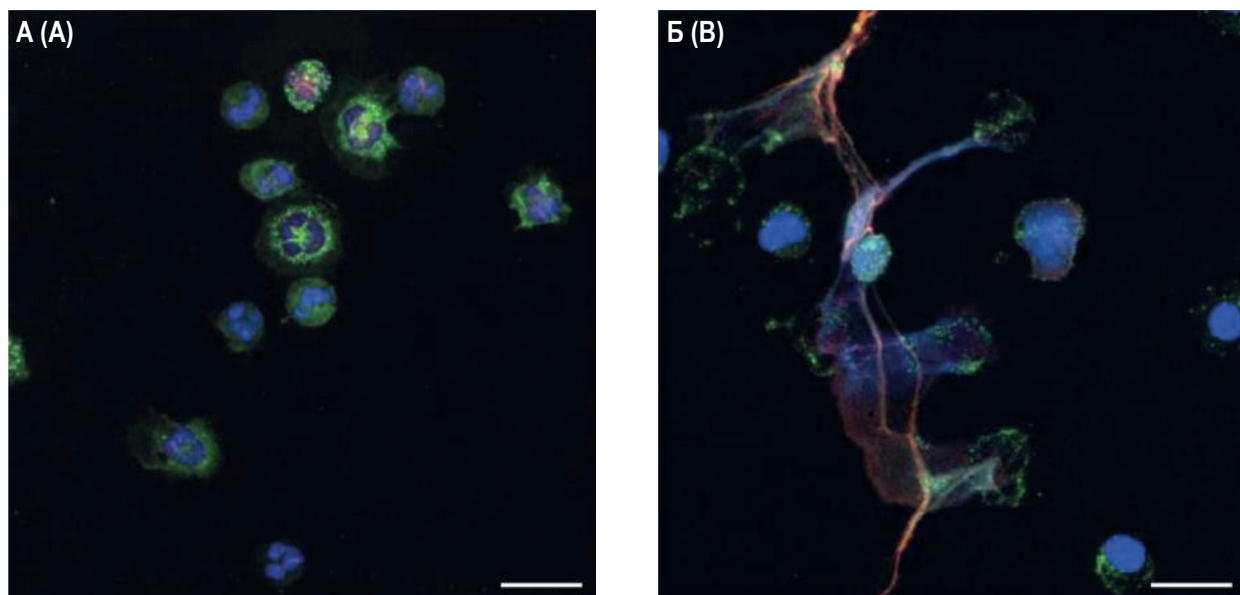


Рисунок 15. Нетоз, индуцированный 3-часовой инкубацией Нф с 50 nM PMA

Примечание. А – интактные Нф, Б – PMA-стимулированный нетоз. Зеленая флуоресценция – МАТ к нейтрофильной эластазе; красная флуоресценция – МАТ к хроматину; ДНК, меченная краской Hoechst – голубая флуоресценция. Метод иммунофлуоресценции, по материалам [14].

Figure 15. Netosis induced by 3-hour incubation of Nf with 50 nM PMA

Note. A, intact Nf; B, PMA-stimulated netosis.

Green fluorescence, MAT to neutrophil elastase; red fluorescence, MAT to chromatin; DNA labeled with Hoechst paint – blue fluorescence. Immunofluorescence method, based on materials [14].

бактерий и образуют агрегаты с нетозными Нф, благодаря своему прокоагулянтному эффекту.

Третья форма нетоза — митохондриальный нетоз. При этом определяется вытеснение митохондриальной ДНК из клеток без предварительной активации комплекса NADPH-оксидазы (Nox). Митохондриальный нетоз может быть индуцирован C5a компонентом активированной системы комплемента, ЛПС или иммунными комплексами, включающими в себя рибонуклеопротеины [111]. Эта форма нетоза является следствием выработки АФК митохондриями. Подобные «митохондриальные сетки» обнаружены после операций, но также у пациентов с хроническим гранулематозным заболеванием и при СКВ [123].

В нетотически трансформированных Нф определяется интересное свойство — это способность ограничивать воспаление за счет деградации цитокинов и хемокинов [163].

Однако чрезмерный нетоз может привести к повреждению тканей, например, в легких. Патогенетическая значимость нетоза показана при сердечно-сосудистых заболеваниях, атеросклерозе, тромбофилии, эндотелиальной дисфункции, канцерогенезе, а также при аутоиммунных заболеваниях [117].

С момента открытия нетоза интерес к Нф, как к потенциальным активным участникам аутоиммунных заболеваний, существенно вырос. Этот интерес обусловлен тем, что, прежде всего, в количественном отношении эти клетки являются преобладающими среди всех ядродержащих клеток крови. Эти клетки могут быть иммунологически активными и одновременно быть аутоантигенными мишенями. Последние свойства Нф связаны с широкой вариабельностью качеств этих клеток в ходе иммунного ответа — от секреции цитокинов, продукции антибактериальных агентов и формирования нетоза до стимуляции адаптивного иммунитета.

Нетоз может способствовать индукции аутоиммунитета. Активированные Нф и сети обнаруживаются в высоких концентрациях в очагах воспаления при различных аутоиммунных заболеваниях. Нарушение процесса очищения от сетей, более высокая концентрация сетей или взаимодействие сетей с другими иммунными клетками могут сыграть важную роль в нарушении аутоотолерантности.

Некоторые механизмы заключаются в следующем. Формирующиеся при нетозе сети включают в себя гистоны, последние, взаимодействуя с TLR2, TLR4 и инфламмасомой NLRP3, активируют каспазу-1 (центральный фермент инфламматомы NLRP3), что приводит к высвобождению активного IL-1 β и IL-18. В такой ситуации про-

слеживаются черты сходства продуктов нетоза с DAMP [79].

Кроме этого, известно, что нетоз активирует созревание Мф и ДК и они усиливают реакцию Т-клеток даже на неоптимальные стимулы [178].

Ферменты, высвобождаемые Нф при нетозе, могут изменять внеклеточные собственные белки, делая их более иммуногенными. Кроме этого, большинство ауто-АГ, высвобождаемых при нетозе, могут стать более иммуногенными благодаря посттрансляционным модификациям. Цитруллинированные гистоны более предпочтительно распознаются ауто-АТ по сравнению с немодифицированными, что зарегистрировано при СКВ, синдроме Фелти, РА [151].

Другие посттрансляционные модификации гистонов, в частности ацетилирование, также могут усиливать иммуностимулирующий потенциал нетоза [181].

Нетоз часто вызывается патогенами. Известно, что инфекции могут способствовать развитию аутовоспалительных и аутоиммунных заболеваний, в частности из-за скопления бактерий и аутологичного ядерного хроматина. Эта смесь ДНК человека и бактерий может иметь значение при индуцировании аутоиммунного ответа против ДНК, поскольку бактериальная ДНК содержит гипометилированные CpG-мотивы, которые непосредственно стимулируют TLR-рецепторы (TLR9) на В-клетках, Мф и ДК. В результате сети запускают выработку ауто-АТ В-клетками памяти, активируются плазмацитоподобные дендритные клетки (пДК), которые являются основными продуцентами IFN I типа [151]. Подобная последовательность событий способствует адаптивному иммунному ответу на собственные антигены. Нейтрофильные сети также могут инициировать апоптоз макрофагов через повреждение митохондрий.

Нф являются доминирующими в КВИ при системных васкулитах, в инфильтратах кожи при дерматомиозите, в синовиальном экссудате при РА и на границе паннус/хрящ, где происходит наибольшее повреждение тканей [30, 31, 132].

При СКВ в крови пациентов обнаруживаются повышенные уровни апоптотических, активированных и незрелых нейтрофилов, а процент апоптотических и активированных нейтрофилов положительно коррелирует с активностью заболевания [20].

Также нетоз может быть источником ауто-АГ при ИВРЗ. Нетотически трансформированные Нф могут служить подходящими мишенями для аутоантител. «Нейтрофильный аутоиммунитет», идентифицируемый, в частности, по факту продукции анти-нейтрофильных цитоплазматических ауто-АТ (ANCA), связан с васкулитами

мелких сосудов — микроскопическим полиангиитом, гранулематозом Вегенера, синдромом Черга-Стросса и узелковым полиартериитом [42, 113].

ANCA описаны при системной склеродермии (СС) и СКВ. Кроме этого, ANCA антитела к рибонуклеопротеину (RNP) стимулируют нетоз после обработки Нф провоспалительными цитокинами [86].

Патогенетическая связь между васкулитами и нетозом подтверждается данными о том, что активированные эндотелиоциты способны прямо стимулировать Нф к нетозу, которые, пребывая в этом состоянии, могут уже сами вызвать повреждение эндотелия [66].

Патогенетическое значение нетоза при СКВ подтверждено многочисленными данными. При этом заболевании сети обнаруживаются в коже и почечных клубочках, причем клиренс нетотических клеток существенно нарушен вследствие недостаточной фагоцитарной функции Мф. Это может привести к постоянному присутствию нейтрофильных ауто-АГ.

Аутоантитела, элюированные из биопсий при волчаночном нефрите человека, во всех случаях были специфичны к компонентам нетоза [24].

Кроме того, чрезмерное образование и недостаточное очищение от сетей приводят к повышению их остаточного уровня, обуславливающего более высокие концентрации в крови циркулирующей внеклеточной ДНК. Повышенные уровни

внеклеточной ДНК патогенетически связаны с активностью волчаночного нефрита [198].

Нетотические сети обычно разрушаются циркулирующими нуклеазами, такими как ДНК-аза. Экспериментально показано, что сыворотка крови от пациентов СКВ нарушает этот процесс, способствуя тем самым накоплению сетей и пролонгации воспаления. Связывается этот эффект с наличием повышенных уровней антител, направленных против гистонов и ДНК, а также гипокомplementемии (C1q компонента) [103].

Весьма показательны результаты исследования NET-реактивности сывороток крови от больных СКВ.

На рисунке 16 представлены результаты иммунофлуоресцентного исследования NET-реактивности сыворотки крови больных СКВ, свидетельствующие о том, что нетоз при ИВРЗ может быть источником ауто-АГ. А — это интактные нейтрофилы, обработанные сывороткой крови от больных СКВ, В — нейтрофилы, у которых нетоз был индуцирован ЛПС и затем эти клетки были проинкубированы с сывороткой крови больных СКВ. На препаратах ДНК идентифицируется по голубому свечению, IgG от больных СКВ, связавшийся с нетотическими нейтрофилами красного цвета, плазмолемма нейтрофилов окрашена зеленым цветом.

Видно, что при ЛПС-индуцированном нетозе нейтрофилов от здоровых доноров ауто-АТ (IgG-фракция) от больных СКВ связываются со структурами нетотически измененных нейтрофилов.

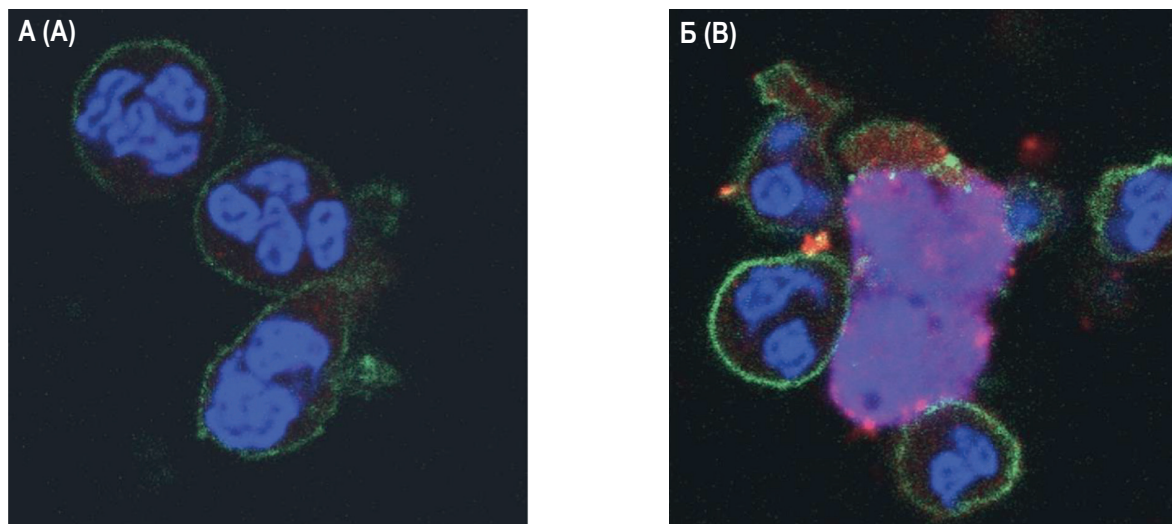


Рисунок 16. Иммунофлуоресцентный анализ NET-реактивности сыворотки крови от больных СКВ

Примечание. А — интактные нейтрофилы от здоровых доноров, обработанные сывороткой крови больных СКВ, В — ЛПС-индуцированный нетоз нейтрофилов здоровых доноров, также обработанных сывороткой крови больных СКВ, по материалам [53].

Figure 16. Immunofluorescence analysis of NET-reactivity of blood serum from patients with SLE

Note. A, intact neutrophils from healthy donors treated with blood serum of SLE patients. B, LPS-induced netosis of neutrophils from healthy donors also treated with blood serum of SLE patients, according to materials [53].

Аналогичные данные были получены и при синдроме Фелти. Т. е. нетоз может быть потенциальным источником уникальных ауто-АГ при ИВРЗ, которые отсутствуют в нестимулированных нейтрофилах.

Идентифицирована подгруппа Нф низкой плотности, названная гранулоцитами низкой плотности (LDG). Эти клетки обладают повышенной склонностью к спонтанному нетозу, а также к гиперпродукции провоспалительных цитокинов (IL-6, IL-8, TNF), измененной фагоцитарной активностью, повышенной способностью синтезировать IFN I типа и цитотоксичностью по отношению к эндотелиальным клеткам [32].

При СКВ матриксные металлопротеиназы (ММП-2 и ММП-9), выделяемые LDG во время формирования сети, могут нарушать эндотелий-зависимую вазорелаксацию и индуцировать апоптоз эндотелиальных клеток [33].

Кроме того, нетотические Нф (LDG подгруппа) являются источником IFN I типа, имеющих крайне важное патогенетическое значение при ИВРЗ.

Нарушение клиренса компонентов нетоза в зародышевых центрах вторичных лимфоидных органов может привести к презентации ауто-АГ аутореактивным В-клеткам с последующей продукцией анти-нейтрофильных АТ. Наконец, появляется все больше работ, свидетельствующих и значительной патогенетической роли митохондриального нетоза при СКВ. Основное значение в этом случае отводится продукции митохондриальных АФК, стимулирующих нетоз. Показана роль нетоза при ANCA-ассоциированных васкулитах (AAV), являющихся первичными системными некротизирующими васкулитами. У пациентов с AAV определяется повышенный уровень нетотически трансформированных Нф в кровотоке, такие же сети были идентифицированы и в образцах биопсии почечной ткани [86].

Эти сетевые структуры являются высокоиммуногенными и запускают адаптивные иммунные реакции, имеющие отношение к аутоиммунитету, приводящие к активации В-клеток и выработке аутоантител [161].

Как отмечалось выше Нф являются наиболее распространенными клетками в синовиальной жидкости и синовиальной оболочке пациентов с РА.

Усиленный нетоз наблюдался в циркулирующих Нф, а также в Нф синовиальной жидкости при РА по сравнению с Нф здоровых доноров и пациентов с остеоартритом. Кроме того, сетчатые Нф проникали в синовиальную ткань РА, ревматоидные узлы и кожу. Нетоз коррелировал с уровнями ауто-АТ (АСРА), а также с системными маркерами воспаления. В свою очередь, наличие

ауто-АТ (АСРА и RF) при РА и продукция провоспалительных цитокинов может стимулировать Нф к нетозу.

При РА в процессе нетоза на Нф в синовиальной оболочке экспрессировались цитруллинированные ауто-АГ, стимулирующие продукцию таких ауто-АТ, как АСРА [171].

Антитела к цитруллинированному виментину эффективно индуцировали образование сети. Более того, провоспалительные цитокины — IL-17 и TNF α индуцировали нетоз в Нф больных РА. Одновременно нетоз значительно усиливал воспалительный ответ синовиальных фибробластов больных РА за счет продукции IL-6, IL-8, хемокинов и молекул адгезии. Нф при РА экспрессируют высокие уровни PAD2 и PAD4 и накапливаются в синовиальной жидкости пациентов с РА во время обострения заболевания [87].

При РА определяется усиленный ЛПС-индуцированный нетоз, что отчетливо видно на рисунке 17.

На представленных препаратах Нф периферической крови и синовиальной жидкости нетоз идентифицируется по зеленому свечению мембраны Нф, обусловленной наличием в ней эластазы нейтрофилов (NE). Справа представлен препарат Нф от больных РА. Отчетливо видно, что эти клетки демонстрируют значительно повышенную способность к образованию сети. Слева представлен препарат с контрольными Нф от здоровых людей, также стимулированными ЛПС. Видно, что в этом случае признаки нетоза практически отсутствуют. Более того, в этой же работе показано, что при РА признаки усиленного спонтанного нетоза наблюдались у нестимулированных Нф течение 1 часа после культивирования и продолжали увеличиваться в течение 2-3 часов. Также сетчатые нейтрофилы были обнаружены в виде инфильтрирующих клеток в синовиальной ткани, ревматических узелках и коже пациентов с РА. Иными словами, патогенетически процесс нетоза при РА встречается во всех очагах продуктивного воспаления (*locus morbi*). Также была обнаружена значительная корреляция между процентом сетчатых Нф и уровнями С-реактивного белка (СРБ) в сыворотке крови, скоростью оседания эритроцитов (СОЭ), АСРА и IL-17, т. е. маркерами системного воспаления. Однако, продолжительность заболевания, острота артрита по клиническим признакам, титры ревматоидного фактора (РФ) не коррелировали с нетозом [87].

Повышенные уровни нетоза определяются также у пациентов с дерматомиозитом, полимиозитом и ювенильным дерматомиозитом. Это подтверждается высоким содержанием LL37 в плазме и циркулирующими в крови свободной ДНК

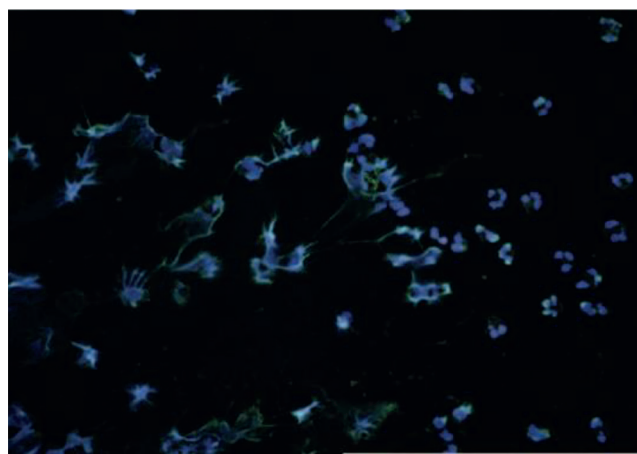
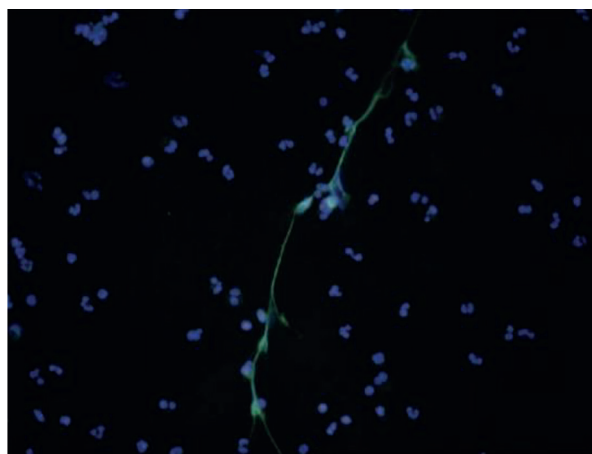


Рисунок 17. Нетоз нейтрофилов периферической крови больных РА

Примечание. Нетоз индуцировался действием бактериального липополисахарида (ЛПС). Сети визуализировались при флуоресцентной микроскопии как структуры, содержащие эластазу нейтрофильных клеток (зеленый), а также содержащие соединение 4',6-диамидино-2-фенилиндол (DAPI) (синий). Ув. $\times 40$, по материалам [87].

Figure 17. Netoz neutrophils of peripheral blood of RA patients

Note. Netoz was induced by the action of bacterial lipopolysaccharide (LPS). The networks were visualized by fluorescence microscopy as structures containing neutrophil cell elastase (green), as well as containing the compound 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (blue). Magnification $\times 40$, according to materials [87].

(cfDNA) и IL-8. Принципиально такая же картина определялась и при ювенильном идиопатическом артрите с системным началом [52].

Из представленных материалов видно, что такая форма запрограммированной и регулируемой гибели Нф, как нетоз, принимает активное патогенетическое участие при ИВРЗ. Несмотря на то, что остается еще много нерешенных вопросов, касающихся нетотических внутриклеточных молекулярных процессов и их функционального предназначения, взаимосвязи продуктивного воспаления и нетоза, тем не менее имеющиеся знания в этой области, позволяют определить направления исследований, связанных с регуляцией этого процесса. С учетом значимости «нейтрофильного иммунитета» в патогенезе ИВРЗ, можно предположить, что будущие исследования будут связаны в том числе с поиском средств и методов воздействия на нетоз, удовлетворяющих запросам клинической практики.

Заключение

Имеющийся на сегодняшний день значительный массив научной информации демонстрирует тесную взаимосвязь между гибелью клеток, воспалением и иммуногенезом. Эта взаимосвязь сформировалась в процессе биологической эволюции, отличается выраженным консерватизмом и подчиняется общебиологическим закономерностям молекулярно-клеточных процессов в клетке. Важнейшим фактором поддержания гомеостаза организма является баланс между вы-

живанием клеток и их гибелью. Высвобождающиеся в процессе гибели клеток в составе КВИ при ИВРЗ DAMPs индуцируют состояние аутореактивности, обусловленной в том числе модуляцией процессов гибели клеток с помощью PRR-рецепторов клеток врожденной иммунной системы. Идентифицированные внутриклеточные молекулярные процессы, имеющие причинно-следственные связи с различными формами клеточной гибели, позволяют расширить горизонт научной интерпретации патогенеза ИВРЗ, а также обосновать стратегию модуляции целевых молекул и кандидатных генов при запрограммированной гибели клеток у пациентов с ИВРЗ.

Из представленного в настоящем обзоре материала явствует, что всем видам аутофагии, апоптоза, некроптоза, пироптоза и нетоза принадлежит фундаментальная патогенетическая роль при ИВРЗ.

Значение аутофагии при ИВРЗ обусловлено активным участием этого внутриклеточного процесса в кросс-презентации продуктов дезорганизации рыхлой волокнистой неоформленной соединительной ткани с последующей генерацией аутореактивных $CD4^+$ и $CD8^+$ клеток. Мутации ключевого гена аутофагии ATG5 ассоциированы с нарушением регуляции секреции провоспалительных цитокинов, клиренса умирающих клеток и презентации ауто-АГ. Наиболее демонстративно эти явления представлены при СКВ. Показана центральная патогенетическая роль аутофагии в процессах деструкции суставов при РА. В диагностических целях оценка уровня аутофагии в био-

птатах синовиальной ткани может быть полезной при диагностике РА и оценки активности заболевания. Понимание функционального баланса между патогенной и цитопротекторной аутофагией и возможностями модуляции этих процессов крайне важно в отношении патогенетической интерпретации аутофагии при ИВРЗ.

Существует тесное взаимодействие между аутофагией и апоптозом, подтвержденное перекрестом внутриклеточных молекулярных активационных сигналов (каспазы, связанные с апоптозом, могут взаимодействовать с белками, связанными с аутофагией). В этой связи нашла обоснование следующая точка зрения относительно влияния аномального апоптоза на индукцию аутоиммунного ответа при ИВРЗ: неэффективный фагоцитоз апоптотических клеток Мф и ДК влияет на образование ауто-АГ, презентация которых Мф и зрелыми ДК Т-клеткам может стимулировать выработку аутоантител. Этот процесс присутствует в качестве патогенетического звена при СКВ, РА, синдроме Шегрена, полимиозитах.

Принципиальное патогенетическое значение некроптоза при ИВРЗ обусловлено тем, что высвобождающиеся при дезорганизации рыхлой волокнистой неоформленной соединительной ткани DAMПы, взаимодействуя с NLR-, TNF-, IFN-рецепторами клеток-мишеней, активируют ключевые некроптотические киназы RIPK1, RIPK3 и MLKL. Регулирование указанных рецептор-взаимодействующих серин/треониновых киназ 1 и 3 при некроптозе создает перспективу разработки молекулярных мишеней и средств модуляции их активности при СКВ и РА. К механизмам контроля некроптоза относят и аутофагию.

В контексте ИВРЗ процесс пироптоза клеток в составе КВИ сопровождается поступлением из пироптотических пор во внеклеточную среду

DAMPов, имеющих ауто-антигенные характеристики и индуцирующие аутоиммунный ответ. Из этих же пор во внеклеточную среду массивно поступают крайне активные провоспалительные цитокины IL-1 β и IL-18. Блокирование их активности составляют одну из целей противовоспалительной терапии при ИВРЗ.

Не менее значима патогенетическая роль и нетоза при ИВРЗ. Нф являются доминирующими в КВИ при системных васкулитах, в инфильтратах кожи при дерматомиозите, в синовиальном экссудате при РА и на границе паннус/хрящ. Процесс нетоза этих клеток может быть источником уникальных ауто-АГ при ИВРЗ и одновременно нетотически трансформированные Нф являются подходящими мишенями для аутоантител. «Нейтрофильный аутоиммунитет», идентифицируемый, в частности, по факту продукции анти-нейтрофильных цитоплазматических ауто-АГ (ANCA), имеет место при микроскопическом полиангиите, гранулематозе Вегенера, синдроме Чарга–Стросса, узловатом полиартериите, системной склеродермии, СКВ, дермато-полимиозите.

Очевидно, что накопленные знания в области патофизиологии аутофагии, апоптоза, некроптоза, пироптоза и нетоза расширяют наше понимание фундаментальных внутриклеточных молекулярных процессов, имеющих прямое и непосредственное влияние на реактивность врожденной и адаптивной систем иммунитета. Молекулярно-клеточные изменения при указанных формах гибели клеток в составе КВИ лежат в основе патогенеза ИВРЗ. Идентификация целевых молекулярных мишеней представляет собой наиболее перспективную стратегическую область разработки медикаментозных средств модуляции продуктивного воспаления при ИВРЗ.

Список литературы / References

1. Глебов Р.Н. Эндоцитоз и экзоцитоз. М.: Высшая школа, 1987, 91 с. [Glebov R.N. Endocytosis and exocytosis]. Moscow: High School, 1987. 91 p.
2. Насонов Е.Л., Александрова Е.Н., Новиков А.А. Аутоиммунные ревматические заболевания – проблемы иммунопатологии и персонализированной терапии // Вестник РАМН, 2015. Т. 70, № 2. С. 169-182. [Nasonov E.L., Alexandrova E.N., Novikov A.A. Autoimmune rheumatic diseases – problems of immunopathology and personalized treatment. *Vestnik rossiiskoi akademii meditsinskikh nauk = Annals of the Russian Academy of Medical Sciences*, 2015, Vol. 70, no. 2, pp. 169-182. (In Russ.)]
3. Пинегин Б.В., Воробьева Н.В., Пашенков М.В., Черняк Б.В. Роль митохондриальных активных форм кислорода в активации врожденного иммунитета // Иммунология, 2018. Т. 39, № 4. С. 221-229. [Pinegin B.V., Vorobjeva N.V., Pashenkov M.V., Chernyak B.V. The role of mitochondrial reactive oxygen species in activation of innate immunity. *Immunologiya = Immunologiya*, 2018, Vol. 39, no. 4, pp. 221-229. (In Russ.)]
4. Саидов М.З. Патогенетическое значение клеточного инфильтрата при иммуновоспалительных ревматических заболеваниях // Медицинская иммунология, 2021. Т. 23, № 6. С. 1239-1274. [Saidov M.Z. Pathogenetic value of cell infiltrate in immunoinflammatory rheumatic diseases. *Meditsinskaya Immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2021, Vol. 23, no. 6, pp. 1239-1274. (In Russ.)] doi:10.15789/1563-0625-PVO-2386.
5. Ярилин А.А., Никонова М.Ф., Ярилина А.А., Варфоломеева М.И., Григорьева Т.Ю. Апоптоз, роль в патологии и значимость его оценки при клинико-иммунологическом обследовании больных // Медицинская иммунология, 2000. Т. 2, № 1. С. 7-16. [Yarilin A.A., Nikonova M.F., Yarilina A.A., Varfolomeeva M.I.,

Grigorieva T.Yu. Apoptosis, importance of its evaluation in immunopathological states. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2000, Vol. 2, no. 1, pp. 7-16. (In Russ.)]

6. Abdulahad D.A., Westra J., Bijzet J., Limburg P.C., Wallenberg C.G., Bijl M. High mobility group box 1 (HMGB1) and anti-HMGB1 antibodies and their relation to disease characteristics in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res. Ther.*, 2011, Vol. 13, no. 3, R71. doi:10.1186/ar3332.

7. Acosta-Rodriguez E.V., Napolitani G., Lanzavecchia A., Sallusto F. Interleukins 1 β and 6 but not transforming growth factor- β are essential for the differentiation of interleukin 17-producing human T helper cells. *Nat. Immunol.*, 2007, Vol. 8, no. 9, pp. 942-949.

8. Agostini L., Martinon F., Burns K., McDermott M.F., Hawkins P.N., Tschopp J. NALP3 forms an IL-1 β -processing inflammasome with increased activity in Muckle-Wells autoinflammatory disorder. *Immunity*, 2004, Vol. 20, no. 3, pp. 319-325.

9. Aichinger M., Wu J., Nedjic L.K. Macroautophagy substrates are loaded onto MHC class II of medullary thymic epithelial cells for central tolerance. *J. Exp. Med.*, 2013, Vol. 210, no. 2, pp. 287-300.

10. Albert M.L., Sauter B., Bhardwaj N. Dendritic cells acquire antigen from apoptotic cells and induce class-restricted CTLs. *Nature*, 1998, Vol. 392, pp. 86-89.

11. Albert M.L., Pearce S.F., Francisco L.M., Sauter B., Roy P., Silverstein R.L., Bhardwaj N. Immature dendritic cells phagocytose apoptotic cells via alphavbeta5 and CD36, and cross-present antigens to cytotoxic T lymphocytes. *J. Exp. Med.*, 1998, Vol. 188, no. 7, pp. 1359-1368.

12. Alessandri C., Barbat C., Vacirca D., Piscopo P., Confaloni A., Sanchez M., Maselli A., Colasanti T., Conti F., Truglia S., Perl A., Valesini G., Malorni W., Ortona E., Pierdominici M. T lymphocytes from patients with systemic lupus erythematosus are resistant to induction of autophagy. *FASEB J.*, 2012, Vol. 26, no. 11, pp. 4722-4732.

13. An N., Chen Y., Wang C., Yang C., Wu Z., Xue J., Ye L., Wang S., Liu H., Pan Q. Chloroquine autophagic inhibition rebalances Th17/Treg-mediated immunity and ameliorates systemic lupus erythematosus. *Cell. Physiol. Biochem.*, 2017, Vol. 44, no. 1, pp. 412-422.

14. Apel F., Zychlinsky A., Kenny E.F. The role of neutrophil extracellular traps in rheumatic diseases. *Nat. Rev. Rheumatol.*, 2018, Vol. 14, no. 8, pp. 467-475.

15. Baier A., Meineckel I., Gay S., Pap T. Apoptosis in rheumatoid arthritis. *Curr. Opin. Rheumatol.*, 2003, Vol. 15, no. 3, pp. 274-279.

16. Banchereau R., Cepika A.M., Banchereau J., Pascual V. Understanding human autoimmunity and autoinflammation through transcriptomics. *Annu. Rev. Immunol.*, 2017, Vol. 35, pp. 337-370.

17. Baumann I., Kolowos W., Voll R.E., Manger B., Gaip U., Neuhuber W., Kirchner T., Kalden J., Herrmann M. Impaired uptake of apoptotic cells into tingible body macrophages in germinal centers of patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.*, 2002, Vol. 46, no. 1, pp. 191-201.

18. Beckley K.D., Wen H., Ting J.P. The Inflammasome NLRs in Immunity, Inflammation, and Associated Diseases. *Annu. Rev. Immunol.*, 2011, Vol. 29, pp. 707-735.

19. Bengtsson A.A., Gullstrand B., Truedsson L., Sturfelt G. SLE serum induces classical caspase-dependent apoptosis independent of death receptors. *Clin. Immunol.*, 2008, Vol. 126, no. 1, pp. 57-66.

20. Bennett L., Palucka A.K., Arce E., Cantrell V., Borvak J., Banchereau J., Pascual V. Interferon and granulopoiesis signatures in systemic lupus erythematosus blood. *J. Exp. Med.*, 2003, Vol. 197, no. 6, pp. 711-723.

21. Berghe T.V., Vanlangenakker N., Parthoens E., Deckers W., Devos M., Festjens N., Guerin C.J., Brunk U.T., Declercq W., Vandenabeele P. Necroptosis, necrosis and secondary necrosis converge on similar cellular disintegration features. *Cell Death Differ.*, 2010, Vol. 17, no. 6, pp. 922-930.

22. Berghe T.V., Linkermann A., Jouan-Lanhuet S., Walczak H., Vandenabeele P. Regulated necrosis: the expanding network of non-apoptotic cell death pathways. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2014, Vol. 15, pp. 135-147.

23. Berthelot J.-M., Le Goff B., Neel A., Maugars Y., Hamidou M. NETosis: At the crossroads of rheumatoid arthritis, lupus, and vasculitis. *Joint Bone Spine*, 2017, Vol. 84, no. 3, pp. 255-262.

24. Bonnani A., Vaglio A., Bruschi M., Sinico R., Cavagna L., Moroni G., Franceschini F., Allegri L., Pratesi F., Migliorini P., Candiano G., Pesce G., Ravelli A., Puppo F., Martini A., Tincan A., Ghiggeri G. Multi-antibody composition in lupus nephritis: isotype and antigen specificity make the difference. *Autoimmun. Rev.*, 2015, Vol. 14, no. 8, pp. 692-702.

25. Bortoluci K.R., Medzhitov R. Control of infection by pyroptosis and autophagy: role of TLR and NLR. *Cell. Mol. Life Sci.*, 2010, Vol. 67, no. 10, pp. 1643-1651.

26. Brennan M.A., Cookson B.T. Salmonella induces macrophage death by caspase-1-dependent necrosis. *Mol. Microbiol.*, 2000, Vol. 38, no. 1, pp. 31-40.

27. Brinkmann V., Reichard U., Goosmann C., Fauler B., Uhlemann Y., Weiss D., Weinrauch Y., Zychlinsky A. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science*, 2004, Vol. 303, pp. 1532-1535.

28. Broderick L., De Nardo D., Franklin B.S., Hoffman H.M., Latz E. The inflammasomes and autoinflammatory syndromes. *Annu. Rev. Pathol.*, 2015, Vol. 10, pp. 395-424.

29. Cai P., Lu Z., Jiang T., Wang Z., Yang Y., Zheng L., Zhao J. Syndecan-4 involves in the pathogenesis of rheumatoid arthritis by regulating the inflammatory response and apoptosis of fibroblast-like synoviocytes. *J. Cell. Physiol.*, 2020, Vol. 235, no. 2, pp. 1746-1758.

30. Caproni M., Torchia D., Cardinali C., Volpi W., Del B. E., D'Agata A., Fabbri P. Infiltrating cells, related cytokines and chemokine receptors in lesional skin of patients with dermatomyositis. *Br. J. Dermatol.*, 2004, Vol. 151, no. 4, pp. 784-791.

31. Carlson J.A., Chen K.R. Cutaneous vasculitis update: small vessel neutrophilic vasculitis syndromes. *Am. J. Dermatopathol.*, 2006, Vol. 28, no. 6, pp. 486-506.

32. Carmona-Rivera C., Kaplan M.J. Low-density granulocytes: a distinct class of neutrophils in systemic autoimmunity. *Semin. Immunopathol.* 2013, Vol. 35, no. 4, pp. 455-463.

33. Carmona-Rivera C., Zhao W., Yalavarthi S., Kaplan M.J. Neutrophil extracellular traps induce endothelial dysfunction in systemic lupus erythematosus through the activation of matrix metalloproteinase-2. *Ann. Rheum. Dis.*, 2015, Vol. 74, no. 7, pp. 1417-1424.
34. Chadha S., Behl T., Bungau S., Kumar A., Arora R., Gupta A., Uddin V., 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.
35. Chen G.Y., Chen X., King S., Cavassani K.A., Cheng J., Zheng X., Cao H., Yu H., Qu J., Fang D., Wu W., Bai X., Lui J., Woodiga S., Chen C., Sun L., Hogaboam C., Kunkel S., Zheng P., Lui Y. Amelioration of sepsis by inhibiting sialidase-mediated disruption of the CD24-SiglecG interaction. *Nat. Biotechnol.*, 2011, Vol. 29, no. 5, pp. 428-435.
36. Chen G.Y., Nunez G. Sterile inflammation: sensing and reacting to damage. *Nat. Rev. Immunol.*, 2010, Vol. 10, no. 12, pp. 826-837.
37. Cho Y.S., Challa S., Moquin D., Genga R., Ray T., Guidford M., Chan F. Phosphorylation-driven assembly of the RIP1-RIP3 complex regulates programmed necrosis and virus-induced inflammation. *Cell*, 2009, Vol. 137, no. 6, pp. 1112-1123.
38. Christofferson D.E., Li Y., Hitomi J., Zhou W., Upperman C., Zhu H., Gerber S.A., Gygi S., Yuan J. A novel role for RIP1 kinase in mediating TNF α production. *Cell Death Dis.*, 2012, Vol. 3, no. 6, e320. doi:10.1038/cddis.2012.64.
39. Church L.D., Cook G.P., McDermott M.F. Primer: inflammasomes and interleukin 1 β in inflammatory disorders. *Nat. Clin. Pract. Rheumatol.*, 2008, Vol. 4, no. 1, pp. 34-42.
40. Colonna L., Lood C., Elkon K. B. Beyond apoptosis in lupus. *Curr. Opin. Rheumatol.*, 2014, Vol. 26, no. 5, pp. 459-466.
41. Cookson B.T., Brennan M.A. Pro-inflammatory programmed cell death. *Trends Microbiol.*, 2001, Vol. 9, no. 3, pp. 113-114.
42. Darrah E., Andrade F. NETs: the missing link between cell death and systemic autoimmune diseases? *Front. Immunol.*, 2013, Vol. 3, 428. doi:10.3389/fimmu.2012.00428.
43. Degterev A., Hitomi J., Gernsheid M., Chen I., Korkina O., Teng X., Abbott D., Cuny G., Yuan C., Wagner G., Hedrick S., Gerber S., Lugovskoy A., Yuan J. Identification of RIP1 kinase as a specific cellular target of necrostatins. *Nat. Chem. Biol.*, 2008, Vol. 4, no. 5, pp. 313-321.
44. Degterev A., Huang Z., Boyce M., Li Y., Jagtap P., Mizushima N., Cuny G.D., Mitchison T.J., Moskowitz M.A., Yuan J. Chemical inhibitor of nonapoptotic cell death with therapeutic potential for ischemic brain injury. *Nat. Chem. Biol.*, 2005, Vol. 1, no. 2, pp. 112-119.
45. Denny M.F., Chandaroy P., Killen P., Caricchio R., Lewis E., Richardson B., Lee K., Gavalchin J., Kaplan M. Accelerated macrophage apoptosis induces autoantibody formation and organ damage in systemic lupus erythematosus. *J. Immunol.*, 2006, Vol. 176, no. 4, pp. 2095-2104.
46. Deretic V. Autophagy in immunity and cell-autonomous defense against intracellular microbes. *Immunol. Rev.*, 2011, Vol. 240, no. 1, pp. 92-104.
47. Deter R.L., de Duve C. Influence of glucagon, an inducer of cellular autophagy, on some physical properties of rat liver lysosomes. *J. Cell Biol.*, 1967, Vol. 33, no. 2, pp. 437-449.
48. Díaz-Godínez C., Carrero J.C. The state of art of neutrophil extracellular traps in protozoan and helminthic infections. *Biosci. Re.*, 2019, Vol. 39, no. 1, BSR20180916. doi:10.1042/bsr20180916.
49. Doitsh G., Galloway N.L.K., Geng X., Yang Z., Monroe K.M., Zepeda O., Hunt P., Hatano H., Sowinski S., Munoz-Arias I., Greene W.C. Cell death by pyroptosis drives CD4 T-cell depletion in HIV-1 infection. *Nature*, 2014, Vol. 505, no. 7484, pp. 509-514.
50. Dondelinger Y., Aguilera M.A., Goossens V., Dubuisson C., Grootjans S., De Jardin E., Vandenabeele P., Bertrand M. RIPK3 contributes to TNFR1-mediated RIPK1 kinase-dependent apoptosis in conditions of cIAP1/2 depletion or TAK1 kinase inhibition. *Cell Death Differ.*, 2013, Vol. 20, no. 10, pp. 1381-1392.
51. Doster R.S., Rogers L.M., Gaddy J.A., Aronoff D.M. Macrophage Extracellular Traps: A Scoping Review. *J. Innate Immun.*, 2017, Vol. 10, no. 1, pp. 3-13.
52. Duvvuri B., Pachman L.M., Morgan G., Khojah A.M., Klein-Gitelman M., Curran M.L., Doty S., Lood C. Neutrophil extracellular traps in tissue and periphery in juvenile dermatomyositis. *Arthritis Rheumatol.*, 2020, Vol. 72, no. 2, pp. 348-358.
53. Dwivedi N., Radic M. Citrullination of autoantigens implicates NETosis in the induction of autoimmunity. *Annals Rheum. Dis.*, 2013, Vol. 73, no. 3, pp. 483-491.
54. Eigenbrod T., Park J.H., Harder J., Iwakura Y., Nunez G. Cutting edge: critical role for mesothelial cells in necrosis-induced inflammation through the recognition of IL-1 α released from dying cells. *J. Immunol.*, 2008, Vol. 181, pp. 8194-8198.
55. Erwig L.P., Henson P.M. Immunological consequences of apoptotic cell phagocytosis. *Am. J. Pathol.*, 2007, Vol. 171, no. 1, pp. 2-8.
56. Fan F.H., Dong L.G., Ren D., Xu Y., Dou J., Wang T., Sun L., Hou Y. Activation-induced necroptosis contributes to B-cell lymphopenia in active systemic lupus erythematosus. *Cell Death Dis.*, 2014, Vol. 5, no. 9, e1416. doi: 10.1038/cddis.2014.375.
57. Fink S.L., Cookson B.T. Caspase-1-dependent pore formation during pyroptosis leads to osmotic lysis of infected host macrophages. *Cell. Microbiol.*, 2006, Vol. 8, no. 11, pp. 1812-1825.
58. Fitzpatrick A.M., Holguin F., Teague W.G., Brown L.A. Alveolar macrophage phagocytosis is impaired in children with poorly controlled asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2008, Vol. 121, no. 6, pp. 1372-1378.

59. Fu R., Guo C., Wang S., Huang Y., Jin O., Haoqiang H., Chen J., Xu B., Zhou M., Zhao J., Sung S., Wang H., Gaskin F., Yang N., Fu S. Podocyte activation of NLRP3 inflammasomes contributes to the development of proteinuria in lupus nephritis. *Arthritis Rheumatol.*, 2017, Vol. 69, no. 8, pp. 1636-1646.
60. Galluzzi L., Kepp O., Chan F.K.-M., Kroemer G. Necroptosis: Mechanisms and Relevance to Disease. *Annu. Rev. Pathol.*, 2017, Vol. 12, no. 1, pp. 103-130.
61. Galluzzi L., Vitale I., Abrams J.M., Alnemri E.S., Baehrecke E.H., Blagosklonny M.V., Dawson T.M., Dawson V.L., El-Deiry W.S., Fulda S., Gottlieb E., Green D.R., Hengartner M.O., Kepp O., Knight R.A., Kumar S., Lipton S.A., Lu X., Madeo F., Malorni W., Mehlen P., Nuñez G., Peter M.E., Piacentini M., Rubinsztein D.C., Shi Y., Simon H.-U., Vandenabeele P., White E., Yuan J., Zhivotovsky B., Melino G., Kroemer G. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell Death Differ.*, 2012, Vol. 19, no. 1, pp. 107-120.
62. Galluzzi L., Vitale I., Aaronson S.A., Abrams J.M., Adam D., Agostinis P., Alnemri E.S., Altucci L., Amelio I., Andrews D.W., Annicchiarico-Petruzzelli M., Antonov A.V., Arama E., Baehrecke E.H., Barlev N.A., Bazan N.G., Bernassola F., Bertrand M.J.M., Bianchi K., Blagosklonny M.V., Blomgren K., Borner C., Boya P., Brenner C., Campanella M., Candi E., Carmona-Gutierrez D., Cecconi F., Chan F.K.-M., Chandel N.S., Cheng E.H., Chipuk J.E., Cidlowski J.A., Ciechanover A., Cohen G.M., Conrad M., Cubillos-Ruiz J.R., Czabotar P.E., D'Angiolella V., Dawson T.M., Dawson V.L., de Laurenzi V., de Maria R., Debatin K.-M., DeBerardinis R.J., Deshmukh M., di Daniele N., di Virgilio F., Dixit V.M., Dixon S.J., Duckett C.S., Dynlacht B.D., El-Deiry W.S., Elrod J.W., Fimia G.M., Fulda S., García-Sáez A.J., Garg A.D., Garrido C., Gavathiotis E., Golstein P., Gottlieb E., Green D.R., Greene L.A., Gronemeyer H., Gross A., Hajnoczky G., Hardwick J.M., Harris I.S., Hengartner M.O., Hetz C., Ichijo H., Jäättelä M., Joseph B., Jost P.J., Juin P.P., Kaiser W.J., Karin M., Kaufmann T., Kepp O., Kimchi A., Kitsis R.N., Klionsky D.J., Knight R.A., Kumar S., Lee S.W., Lemasters J.J., Levine B., Linkermann A., Lipton S.A., Lockshin R.A., López-Otín C., Lowe S.W., Luedde T., Lugli E., MacFarlane M., Madeo F., Malewicz M., Malorni W., Manic G., Marine J.-C., Martin S.J., Martinou J.-C., Medema J.P., Mehlen P., Meier P., Meier S., Miao E.A., Molkentin J.D., Moll U.M., Muñoz-Pinedo C., Nagata S., Nuñez G., Oberst A., Oren M., Overholtzer M., Pagano M., Panaretakis T., Pasparakis M., Penninger J.M., Pereira D.M., Pervaiz S., Peter M.E., Piacentini M., Pinton P., Prehn J.H.M., Puthalakath H., Rabinovich G.A., Rehm M., Rizzuto R., Rodrigues C.M.P., Rubinsztein D.C., Rudel T., Ryan K.M., Sayan E., Scorrano L., Shao F., Shi Y., Silke J., Simon H.-U., Sistigu A., Stockwell B.R., Strasser A., Szabadkai G., Tait S.W.G., Tang D., Tavernarakis N., Thorburn A., Tsujimoto Y., Turk B., Berghe T.V., Vandenabeele P., Heiden M.G.V., Villunger A., Virgin H.W., Vousden K.H., Vucic D., Wagner E.F., Walczak H., Wallach D., Wang Y., Wells J.A., Wood W., Yuan J., Zakeri Z., Zhivotovsky B., Zitvogel L., Melino G., Kroemer G. Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death Differ.*, 2018, Vol. 25, no. 3, pp. 486-541.
63. Gershov D., Kim S., Brot N., Elkon K.B. C-reactive protein binds to apoptotic cells, protects the cells from assembly of the terminal complement components, and sustains an antiinflammatory innate immune response: implications for systemic autoimmunity. *J. Exp. Med.*, 2000, Vol. 192, no. 9, pp. 1353-1364.
64. Granger V., Peyneau M., Chollet-Martin S., de Chaisemartin L. Neutrophil extracellular traps in autoimmunity and allergy: immune complexes at work. *Front. Immunol.*, 2019, Vol. 10, no. 2824. doi: 10.3389/fimmu.2019.02824.
65. Gupta A.K., Giaglis S., Hasler P., Hahn S. Efficient neutrophil extracellular trap induction requires mobilization of both intracellular and extracellular calcium pools and is modulated by cyclosporine A. *PLoS One*, 2014, Vol. 9, no. 5, e97088. doi: 10.1371/journal.pone.0097088.
66. Gupta A.K., Joshi M.B., Philippova M., Erne P., Hasler P., Hahn S., Resink T.J. Activated endothelial cells induce neutrophil extracellular traps and are susceptible to NETosis-mediated cell death. *FEBS Lett.*, 2010, Vol. 584, pp. 3193-3197.
67. Gutierrez K.D., Davis M.F., Daniels B.P., Olsen T.M., Ralli-Jain P., Tait S., Jr M., Oberst A. MLKL activation triggers NLRP3-mediated processing and release of IL-1 β independently of gasdermin-D. *J. Immunol.*, 2017, Vol. 198, no. 5, pp. 2156-2164.
68. Harle G., Kowalski C., Dubrot J., Brighouse D., Clavel G., Pick R., Bessis N., Niven J., Scheiermann C., Gannage M., Hugues S. Macroautophagy in lymphatic endothelial cells inhibits T cell-mediated autoimmunity. *J. Exp. Med.*, 2021, Vol. 218, no. 6, e20201776. doi: 10.1084/jem.20201776.
69. He M.X., McLeod I.X., Jia W., He Y.W. Macroautophagy in T lymphocyte development and function. *Front. Immunol.*, 2012, Vol. 3, 22. doi: 10.3389/fimmu.2012.00022.
70. Hodge S., Hodge G., Scicchitano R., Reynolds P.N., Holmes M. Alveolar macrophages from subjects with chronic obstructive pulmonary disease are deficient in their ability to phagocytose apoptotic airway epithelial cells. *Immunol. Cell Biol.*, 2003, Vol. 81, no. 4, pp. 289-296.
71. Hoffman H.M., Wanderer A. A. Inflammasome and IL-1 β -mediated disorders. *Curr. Allergy Asthma Rep.*, 2010, Vol. 10, no. 4, pp. 229-235.
72. Honarpisheh M., Desai J., Marschner J. A., Weidenbusch M., Lech M., Vielhauer V., Hans-Joachim Anders, Mulay S. R. Regulated necrosis-related molecule mRNA expression in humans and mice and in murine acute tissue injury and systemic autoimmunity leading to progressive organ damage, and progressive fibrosis. *Biosci. Rep.*, 2016, Vol. 36, no. 6, e00425. doi:10.1042/bsr20160336.
73. Jafari-Nakhjavani M.R., Abedi-Azar S., Nejadi B. Correlation of plasma interleukin-18 concentration and severity of renal involvement and disease activity in systemic lupus erythematosus. *J. Nephropathol.*, 2016, Vol. 5, no. 1, pp. 28-33.
74. Jariwala M.P., Laxer R.M. NETosis in Rheumatic Diseases. *Curr. Rheumatol. Rep.*, 2021, Vol. 23, no. 2. doi:10.1007/s11926-020-00977-6.

75. Johansson U., Walther-Jallow L., Smed-Sorensen A., Spetz A.L. Triggering of dendritic cell responses after exposure to activated, but not resting, apoptotic PBMCs. *J. Immunol.*, 2007, Vol. 179, no. 3, pp. 1711-1720.
76. Jung J.Y., Koh B.R., Kim H.A., Jeon J.Y., Suh C.H. Autoantibodies to C-reactive protein in incomplete lupus and systemic lupus erythematosus. *J. Investig. Med.*, 2014, Vol. 62, no. 6, pp. 890-893.
77. Kessenbrock K., Krumbholz M., Schönermarck U., Back W., Gross W., Werb Z., Gröne H., Brinkmann V., Jenne D. Netting neutrophils in autoimmune small-vessel vasculitis. *Nat. Med.*, 2009, Vol. 15, no. 6, pp. 623-625.
78. Kaczmarek A., Vandenabeele P., Krysko D.V. Necroptosis: The release of damage-associated molecular patterns and its physiological relevance. *Immunity*, 2013, Vol. 38, no. 2, pp. 209-223.
79. Kahlenberg J. M., Carmona-Rivera C., Smith C.K., Kaplan M. Neutrophil extracellular trap-associated protein activation of the NLRP3 inflammasome is enhanced in lupus macrophages. *J. Immunol.*, 2013, Vol. 190, no. 3, pp. 1217-1226.
80. Kalaaji M., Fenton K.A., Mortensen E.S., Olsen R., Sturfelt G., Alm P., Rekvig O. Glomerular apoptotic nucleosomes are central target structures for nephritogenic antibodies in human SLE nephritis. *Kidney Int.*, 2007, Vol. 71, no. 7, pp. 664-672.
81. Kaplan M. J., Apoptosis in systemic lupus erythematosus. *Clin. Immunol.*, 2004, Vol. 112, no. 3, pp. 210-218.
82. Kato M., Ospelt C., Gay R.E., Gay S., Klein K. Dual role of autophagy in stress-induced cell death in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. *Arthritis Rheumatol.*, 2014, Vol. 66, no. 1, pp. 40-48.
83. Kaushik S., Massey A.C., Mizushima N., Cuervo A.M. Constitutive activation of chaperone-mediated autophagy in cells with impaired macroautophagy. *Mol. Biol. Cell*, 2008, Vol. 19, no. 5, pp. 2179-2192.
84. Kayagaki N., Warming S., Lamkanfi M., Vande Walle L., Louie S., Dong J., Newton K., Qu Y., Liu J., Heldens S., Zang J., Lee W., Roose-Girma M., Dixit V. Non-canonical inflammasome activation targets caspase-11. *Nature*, 2011, Vol. 479, pp. 117-121.
85. Kerr J.F.R., Wyllie A.H., Currie A. R. Apoptosis: A Basic Biological Phenomenon with Wideranging Implications in Tissue Kinetics. *Br. J. Cancer*, 1972, Vol. 26, no. 4, pp. 239-257.
86. Kessenbrock K., Krumbholz M., Schönermarck U., Back W., Gross W.L., Werb Z., Gröne H., Brinkmann V., Jenne D. Netting neutrophils in autoimmune small-vessel vasculitis. *Nat. Med.*, 2009, Vol. 15, no. 6, pp. 623-625.
87. Khandpur R., Carmona-Rivera C., Vivekanandan-Giri A., Gizinski A., Yalavarthi S., Knight J.S., Friday S., Li S., Patel R.M., Subramanian V., Thompson P., Chen P., Fox D.A., Pennathur S., Kaplan M.J. NETs are a source of citrullinated autoantigens and stimulate inflammatory responses in rheumatoid arthritis. *Sci. Transl. Med.*, 2013, Vol. 5, no. 178, 178ra40. doi:10.1126/scitranslmed.3005580.
88. Khoury M.K., Gupta K., Franco S.R., Liu B. Necroptosis in the pathophysiology of disease. *Am. J. Pathol.*, 2020, Vol. 190, no. 2, pp. 272-285.
89. Kobayashi K., Kaneda K., Kasama T. Immunopathogenesis of delayed-type hypersensitivity. *Microsc. Res. Tech.*, 2001, Vol. 53, no. 4, pp. 241-245.
90. Kobayashi N., Karisola P., Pena-Cruz V., Dorfman D.M., Jinushi M., Umetsu S.E., Butte M.J., Nagumo H., Chernova I., Zhu B., Sharpe A.H., Ito S., Dranoff G., Kaplan G.G., Casanovas J.M., Umetsu D.T., Dekruyff R.H., Freeman G. TIM-1 and TIM-4 glycoproteins bind phosphatidylserine and mediate uptake of apoptotic cells. *Immunity*, 2007, Vol. 27, no. 6, pp. 927-940.
91. Kolly L., Busso N., Palmer G., Talabot-Ayer D., Chobaz V., So A. Expression and function of the NALP3 inflammasome in rheumatoid synovium. *Immunology*, 2010, Vol. 129, no. 2, pp. 178-185.
92. Kono H., Karmarkar D., Iwakura Y., Rock K.L. Identification of the cellular sensor that stimulates the inflammatory response to sterile cell death. *J. Immunol.*, 2010, Vol. 184, no. 8, pp. 4470-4478.
93. Kovacs J.R., Li C., Yang Q., Li G., Garcia I.G., Ju S., Roodman D.G., Windle J.J., Zhang X., Lu B. Autophagy promotes T-cell survival through degradation of proteins of the cell death machinery. *Cell Death Differ.*, 2012, Vol. 19, no. 1, pp. 144-152.
94. Krainer J., Siebenhandl S., Weinhäusel A. Systemic autoinflammatory diseases. *J. Autoimmun.*, 2020, 102421. doi:10.1016/j.jaut.2020.102421.
95. Kril I., Havrylyuk A., Potomkina H., Chopyak V. Apoptosis and secondary necrosis of neutrophils and monocytes in the immunopathogenesis of rheumatoid arthritis: a cohort study. *Rheumat.Int.*, 2020, Vol. 40, Iss. 9, pp. 1449-1454.
96. Kroemer G.R., Galluzzi L., Vandenabeele P., Abrams J., Alnermi E.S., Baehrecke E.H., Blagosklonny M.V., El-Deiry W.S., Golstein P., Green D.R., Hengartner M., Knight R.A., Kumar S., Lipton S.A., Malorni W., Núñez G., Peter M.E., Tschopp J., Yuan J., Piacentini M., Zhivotovsky B., Melino G. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death. *Cell Death Differ.*, 2009, Vol. 16, no. 1, pp. 3-11.
97. Krysko D.V., Denecker G., Festjens N., Gabriels S., Parthoens E., D'Herde K., Vandenabeele P. Macrophages use different internalization mechanisms to clear apoptotic and necrotic cells. *Cell Death Differ.*, 2006, Vol. 13, no. 12, pp. 2011-2022.
98. Lamkanfi M., Sarkar A., Vande Walle L., Vitari A.C., Amer A.O., Wewers M.D., Tracey K.J., Kanneganti T.D., Dixit V.M. Inflammasome-dependent release of the alarmin HMGB1 in endotoxemia. *J. Immunol.*, 2010, Vol. 185, no. 7, pp. 4385-4392.
99. Laster S.M., Wood J.G., Gooding L.R. Tumor necrosis factor can induce both apoptotic and necrotic forms of cell lysis. *J. Immunol.*, 1988, Vol. 141, no. 8, pp. 2629-2634.
100. Lauber K., Bohn E., Kröber S.M., Xiao Y.J., Blumenthal S.G., Lindemann R.K., Marini P., Wiedig C., Zobywalski A., Baksh S., Xu Y., Autenrieth I., Schulze-Jstho K., Belka C., Stuhler G., Wesselborg S. Apoptotic cells induce migration of phagocytes via caspase-3-mediated release of a lipid attraction signal. *Cell*, 2003, Vol. 113, no. 6, pp. 717-730.
101. Lawlor K.E., Khan N., Mildenhallet A., Gerlic M., Croker B.A., Dcuz A.A., Hall C., Spall S.K., Anderton H., Masters S.L., Rashidi M., Wicks I.P., Alexander W.S., Mitsuchi Y., Benetatos C.A., Condon S.M., Wong W.W.-L.,

Silke J., Vaux D.L., Vince J. RIPK3 promotes cell death and NLRP3 inflammasome activation in the absence of MLKL. *Nat. Commun.*, 2015, Vol. 6, 6282. doi: 10.1038/ncomms7282.

102. Lee J.W., Epardaud M., Sun J., Becker J.E., Cheng A.C., Yonekura A., Heath J.K., Turley S.J. Peripheral antigen display by lymph node stroma promotes T cell tolerance to intestinal self. *Nat. Immunol.*, 2007. Vol. 8, no. 2, pp. 181-190.

103. Leffler J., Gullstrand B., Jonsen A., Nilsson J.A., Martin M., Blom A.M., Bengtsson A. Degradation of neutrophil extracellular traps covaries with disease activity in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res Ther.*, 2013, Vol. 15, no. 4, R84. doi:10.1186/ar4264.

104. Levine B., Mizushima N., Herbert W. Virgin Autophagy in immunity and inflammation. *Nature*, 2011, Vol. 469, pp. 323-334.

105. Li J., McQuade T., Siemer A., Napetschnig J., Moriwaki K., Hsiao Y., Damko E., Moquin D., Walz T., McDermott A., Chan F., Wu H. The RIP1/RIP3 necrosome forms a functional amyloid signaling complex required for programmed necrosis. *Cell*, 2012, Vol. 150, no. 2, pp. 339-350.

106. Li W., Yang Q., Mao Z. Chaperone-mediated autophagy: machinery, regulation and biological consequences. *Cell. Mol. Life Sci.*, 2011, Vol. 68, no. 5, pp. 749-763.

107. Li Y., Shen Y., Jin K., Wen Z., Cao W., Wu B., Wen R., Tian L., Berry G., Goronzy J., Weyand C.M. The DNA repair nuclease MRE11A functions as a mitochondrial protector and prevents T cell pyroptosis and tissue inflammation. *Cell Metab.*, 2019, Vol. 30, no. 3, pp. 477-492.

108. Liberale L., Carbone F., Vecchié A., Diaz-Cañestro C., Camici G., Montecucco F., Dallegri F., Bonaventura A. The pathophysiological role of neutrophil extracellular traps in inflammatory diseases. *Thromb. Haemost.*, 2018, Vol. 118, no. 1, pp. 6-27.

109. Lin N.Y., Beyer C., Giessel A., Kireva T., Scholtyssek C., Uderhardt S., Enrique L., Munoz E.L., Dees C., Distler A., Wirtz S., Kronke G., Spenser B., Distler O., Schett G., Distler J.H. Autophagy regulates TNF α -mediated joint destruction in experimental arthritis. *Ann. Rheum. Dis.*, 2013, Vol. 72, no. 5, pp. 761-768.

110. Lleo A., Selmi C., Invernizzi P., Podda M., Gershwin M. E. The consequences of apoptosis in autoimmunity. *J. Autoimmun.*, 2008, Vol. 31, no. 3, pp. 257-262.

111. Lood C., Blanco L.P., Pumalike M.M., Carmona-Rivera C., de Ravin S., Smith C., Malech H., Ledbetter J., Elkon K., Kaplan M. Neutrophil extracellular traps enriched in oxidized mitochondrial DNA are interferogenic and contribute to lupus-like disease. *Nat. Med.*, 2016, Vol. 22, no. 2, pp. 146-153.

112. Lopalco G., Cantarini L., Vitale A., Iannone F., Anelli M. G., Andreozzi L., Lapadula G., Galeazzi M., Rigante D. Interleukin-1 as a common denominator from autoinflammatory to autoimmune disorders: premises, perils, and perspectives. *Mediators Inflamm.*, 2015, Vol. 2015, 194864. doi:10.1155/2015/194864

113. Ludemann J., Utecht B., Gross W.L. Anti-neutrophil cytoplasm antibodies in Wegener's granulomatosis recognize an elastolytic enzyme. *J. Exp. Med.*, 1990, Vol. 171, pp. 357-362.

114. Luo X.Y., Yuan J.L., Liuetal J. Increased macroautophagy in interferon-gamma-producing T cells from patients with newly diagnosed systemic lupus erythematosus. *Chin. Med. J.*, 2018, Vol. 131, no. 13, pp. 1527-1532.

115. Maeda A., Fadeel B. Mitochondria released by cells undergoing TNF- α -induced necroptosis act as danger signals. *Cell Death Dis.*, 2014, Vol. 5, no. 7, e1312. doi: 10.1038/cddis.2014.277.

116. Martin S.J., Henry C.M., Cullen S.P. A perspective on mammalian caspases as positive and negative regulators of inflammation. *Mol. Cell*, 2012, Vol. 46, no. 4, pp. 387-397.

117. Martinod K., Wiltsch T., Farley K., Gallant M., Remold-Donnell E., Wagner D. Neutrophil elastase-deficient mice form neutrophil extracellular traps in an experimental model of deep vein thrombosis. *J. Thromb. Haemost.*, 2016, Vol. 14, no. 3, pp. 551-558.

118. Masters S.L., Simon A., Aksentijevich I., Kastner D.L. Horror autoinflammaticus: the molecular pathophysiology of autoinflammatory disease. *Annu. Rev. Immunol.*, 2009, Vol. 27, pp. 621-668.

119. Matzinger P. The danger model: a renewed sense of self. *Science*, 2002, Vol. 296, pp. 301-305.

120. Mayes M.D., Bossini-Castillo L., Gorlova O., Martin J.E., Zhou X., Chen W.V., Assassi S., Ying J., Tan F.K., Arnett F.C., Reveille J.D., Guerra S., Teruel M., Carmona F.D., Gregersen P.K., Lee A.T., López-Isac E., Ochoa E., Carreira P., Simeón C.P., Castellví I., González-Gay M.Á., Spanish Scleroderma Group; Zhernakova A., Padyukov L., Alarcón-Riquelme M., Wijmenga C., Brown M., Beretta L., Riemekasten G., Witte T., Hunzelmann N., Kreuter A., Distler J.H.W., Voskuyl A.E., Schuerwegh A.J., Hesselstrand R., Nordin A., Airó P., Lunardi C., Shiels P., van Laar J.M., Herrick A., Worthington J., Denton C., Wigley F.M., Hummers L.K., Varga J., Hinchcliff M.E., Baron M., Hudson M., Pope J.E., Furst D.E., Khanna D., Phillips K., Schiopu E., Segal B.M., Molitor J.A., Silver R.M., Steen V.D., Simms R.W., Lafyatis R.A., Fessler B.J., Frech T.M., Alkassab F., Docherty P., Kaminska E., Khalidi N., Jones H.N., Markland J., Robinson D., Broen J., Radstake T.R.D.J., Fonseca C., Koeleman B.P., Martin J. Immunochip analysis identifies multiple susceptibility loci for systemic sclerosis. *Am. J. Hum. Genet.*, 2014, Vol. 94, no. 1, pp. 47-61.

121. McGonagle D., McDermott M.F. A proposed classification of the immunological diseases. *PLoS Med.*, 2006, Vol. 3, no. 8, e297. doi:10.1371/journal.pmed.0030297.

122. McLeod I.X., He Y. Roles of autophagy in lymphocytes: reflections and directions. *Cell. Mol. Immunol.*, 2010, Vol. 7, no. 2, pp. 104-107.

123. McIlroy D.J., Jarnicki A.G., Au G.G., Lott N., Smith D., Hansbro P., Balogh Z. Mitochondrial DNA neutrophil extra cellular traps are formed after trauma and subsequent surgery. *J. Crit. Care*, 2014, Vol. 29, no. 6, 1133.e1-e5. doi: 10.1016/j.jcrc.2014.07.013.

124. Mehrpour M., Esclatine A., Beau I., Codogno P. Overview of macroautophagy regulation in mammalian cells. *Cell Res.*, 2010, Vol. 20, no. 7, pp. 748-762.

125. Metzler K.D., Goosmann C., Lubojemska A., Zychlinsky A., Papayannopoulos V. A myeloperoxidase-containing complex regulates neutrophil elastase release and actin dynamics during NETosis. *Cell Rep.*, 2014, Vol. 8, no. 3, pp. 883-896.

126. Mijaljica D., Prescott M., Devenish R.J. Microautophagy in mammalian cells: revisiting a 40-year-old conundrum. *Autophagy*, 2011, Vol. 7, no. 7, pp. 673-682.
127. Mitchell J.S., Li N., Weinhold N., Forsti A., Ali M., van Duin M., Thorleifsson G., Johnson D.C., Chen B., Halvarsson B.-M., Gudbjartsson D.F., Kuiper R., Stephens O.W., Bertsch U., Broderick P., Campo C., Einsele H., Gregory W.A., Gullberg U., Henrion M., Hillengass J., Hoffmann P., Jackson G.H., Johnsson E., Jöud M., Kristinsson S.Y., Lenhoff S., Lenive O., Mellqvist U.-H., Migliorini G., Nahi H., Nelander S., Nickel J., Nöthen M.M., Rafnar T., Ross F.M., da Silva Filho M.I., Swaminathan B., Thomsen H., Turesson I., Vangsted A., Vogel U., Waage A., Walker B.A., Wihlborg A.-K., Broyl A., Davies F.E., Thorsteinsdottir U., Langer C., Hansson M., Kaiser M., Sonneveld P., Stefansson K., Morgan G.J., Goldschmidt H., Hemminki K., Nilsson B., Houlston R. Genome-wide association study identifies multiple susceptibility loci for multiple myeloma. *Nat. Commun.*, 2016, Vol. 7, 12050. doi: 10.1038/ncomms12050.
128. Mizushima N. Autophagy: process and function. *Genes Dev.*, 2007, Vol. 21, no. 22, pp. 2861-2873.
129. Mizushima N., Klionsky D.J. Protein turnover via autophagy: implications for metabolism. *Annu. Rev. Nutr.*, 2007, Vol. 27, pp. 19-40.
130. Mizushima N., Yoshimori T., Levine B. Methods in mammalian autophagy research. *Cell*, 2010, Vol. 140, no. 3, pp. 313-326.
131. Mocarski E.S., Upton J.W., Kaiser W.J. Viral infection and the evolution of caspase 8-regulated apoptotic and necrotic death pathways. *Nat. Rev. Immunol.*, 2011, Vol. 12, no. 2, pp. 79-88.
132. Mohr W., Westerhellweg H., Wessinghage D. Polymorphonuclear granulocytes in rheumatic tissue destruction. III. An electron microscopic study of PMNs at the pannus-cartilage junction in rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.*, 1981, Vol. 40, 396-399.
133. Mosser D.M., Edwards J.P. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat. Rev. Immunol.*, 2008, Vol. 8, no. 12, pp. 958-969.
134. Munoz L.E., Lauber K., Schiller M., Manfredi A.A., Herrmann M. The role of defective clearance of apoptotic cells in systemic autoimmunity. *Nat. Rev. Rheumatol.*, 2010, Vol. 6, no. 5, pp. 280-289.
135. Munoz L., van Bavel C., Franz S., Berden J., Herrmann M., van der Vlag J. Apoptosis in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Lupus*, 2008, Vol. 17, no. 5, pp. 371-375.
136. Münz C. Autophagy and antigen presentation. *Cell. Microbiol.*, 2006, Vol. 8, no. 6, pp. 891-898.
137. Munz C. Antigen processing via autophagy – not only for MHC class II presentation anymore? *Curr. Opin. Immunol.*, 2010, Vol. 22, pp. 89-93.
138. Muruve D.A., Petrilli V., Zaiss A., White L., Clark S., Ross P., Parks R., Tschoop J. The inflammasome recognizes cytosolic microbial and host DNA and triggers an innate immune response. *Nature*, 2008, Vol. 452, pp. 103-107.
139. Nagata S. Apoptosis and clearance of apoptotic cells. *Annu. Rev. Immunol.*, 2018, Vol. 36, pp. 489-517.
140. Nagy G., Barcza M., Gonchoroff N., Phillips P.E., Perl A. Nitric oxide-dependent mitochondrial biogenesis generates Ca^{2+} signaling profile of lupus T cells. *J. Immunol.*, 2004, Vol. 173, no. 6, pp. 3676-3683.
141. Ning X., Wang Y., Jingetal M. Apoptotic caspases suppress type I interferon production via the cleavage of cGAS, MAVS, and IRF3. *Mol. Cell*, Vol. 74, no. 1, pp. 19-31.
142. Oppenheim J.J., Yang D. Alarmins: chemotactic activators of immune responses. *Curr. Opin. Immunol.*, 2005, Vol. 17, no. 4, pp. 359-365.
143. Panaretakis T., Kepp O., Brockmeier U., Tesniere A., Bjorklund A.C., Chapman D.C., Durchschlag M., Joza N., Pierron G., van Ender, P., Yuan J., Zitvogel L., Madeo F., Williams D., Kroemer G. Mechanisms of preapoptotic calreticulin exposure in immunogenic cell death. *EMBO J.*, 2009, Vol. 28, no. 5, pp. 578-590.
144. Park S.Y., Jung M.Y., Kim H.J., Lee S.J., Kim S.Y., Lee B.H., Kwon T., Park R., Kim I. Rapid cell corpse clearance by stabilin-2, a membrane phosphatidylserine receptor. *Cell Death Differ.*, 2008, Vol. 15, no. 1, pp. 192-201.
145. Pasparakis M., Vandenabeele P. Necroptosis and its role in inflammation. *Nature*, 2015, Vol. 517, no. 7534, pp. 311-320.
146. Pierdominici M., Vomero M., Barbati C., Colasanti T., Maselli A., Vacirca D., Giovannetti A., Malorni W., Ortona E. Role of autophagy in immunity and autoimmunity, with a special focus on systemic lupus erythematosus. *FASEB J.*, 2012, Vol. 26, no. 4, pp. 1400-1412.
147. Pisetsky D.S., Erlandsson-Harris H., Andersson U. High-mobility group box protein 1 (HMGB1): an alarmin mediating the pathogenesis of rheumatic disease. *Arthritis Res. Ther.*, 2008, Vol. 10, no. 3, 209. doi:10.1186/ar2440.
148. Pua H.H., He Y.W. Maintaining T lymphocyte homeostasis: another duty of autophagy. *Autophagy*, 2007, Vol. 3, no. 3, pp. 266-267.
149. Pua H.H., Guo J., Komatsu M., He Y.W. Autophagy is essential for mitochondrial clearance in mature T lymphocytes. *J. Immunol.*, 2009, Vol. 182, no. 7, pp. 4046-4055.
150. Puri A.W., Broz P., Shen A., Monack D.M., Bogoy M. Caspase-1 activity is required to bypass macrophage apoptosis upon Salmonella infection. *Nat. Chem. Biol.*, 2012, Vol. 8, no. 9, pp. 745-747.
151. Radic M. Clearance of apoptotic bodies, NETs, and Biofilm DNA: implications for autoimmunity. *Front. Immunol.*, 2014, Vol. 5, 365. doi: 10.3389/fimmu.2014.00365.
152. Radic M., Herrmann M.J., van der Vlag J., Rekvig O.P. Regulatory and pathogenetic mechanisms of autoantibodies in SLE. *Autoimmunity*, 2011, Vol. 44, no. 5, pp. 349-356.
153. Ren Y., Tang J., Mok M.Y., Chan A.W., Wu A., Lau C.S. Increased apoptotic neutrophils and macrophages and impaired macrophage phagocytic clearance of apoptotic neutrophils in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.*, 2003, Vol. 48, no. 10, pp. 2888-2897.
154. Riedl S.J., Salvesen G.S. The apoptosome: signalling platform of cell death. *Nat. Rev.*, 2007, Vol. 8, no. 5, pp. 405-413.

155. Rizzo C., Grasso G., Castaniti G., Ciccio F., Guggino G. Primary sjogren syndrome: focus on innate immune cells and inflammation. *Vaccines*, 2020, Vol. 8, no. 2, pp. 1-23.
156. Roberts T.L., Idris A., Dunn J.A., Kelly G.M., Burnton C.M., Hodgson S., Hardy L.L., Garceau V., Sweet M.J., Ross L.I., Hume A.D., Stacey J.K. HIN-200 proteins regulate caspase activation in response to foreign cytoplasmic DNA. *Science*, 2009, Vol. 323, no. 5917, pp. 1057-1060.
157. Robinson N., McComb S., Mulligan R., Dudani R., Krishnan L., Sad S. Type I interferon induces necroptosis in macrophages during infection with *Salmonella enterica*, serovar Typhimurium. *Nat. Immunol.*, 2012, Vol. 13, no. 10, pp. 954-962.
158. Rock K.L., Kono H. The inflammatory response to cell death. *Annu. Rev. Pathol.*, 2008, Vol. 3, pp. 99-126.
159. Rock K.L., Latz E., Ontiveros F., Kono H. The sterile inflammatory response. *Annu. Rev. Immunol.*, 2010, Vol. 28, pp. 321-342.
160. Rubartelli A., Poggi A., Zocchi M.R. The selective engulfment of apoptotic bodies by dendritic cells is mediated by the $\alpha(v)\beta3$ integrin and requires intracellular and extracellular calcium. *Eur. J. Immunol.*, 1997, Vol. 27, no. 8, pp. 1893-1900.
161. Sangaletti S., Tripodo C., Chiodoni C., Guarnotta C., Cappetti B., Casalini P., Piconese S., Parenza M., Guiducci C., Vitali C., Colombo M. Neutrophil extracellular traps mediate transfer of cytoplasmic neutrophil antigens to myeloid dendritic cells toward ANCA induction and associated autoimmunity. *Blood*, 2012, Vol. 120, no. 15, pp. 3007-3018.
162. Sarhan J., Liu B.C., Muendleinetal H.I. Constitutive interferon signaling maintains critical threshold of MLKL expression to license necroptosis. *Cell Death Differ.*, 2019, Vol. 26, no. 2, pp. 332-347.
163. Schauer C., Janko C., Munoz L.E., Zhao Y., Kienhofer D., Frey B., Lell M., Manger B., Rech J., Naschberger E., Holmdahl R., Krenn V., Harrer T., Jeremic I., Bilyy R., Schett G., Hoffmann M., Herrmann M. Aggregated neutrophil extracellular traps limit inflammation by degrading cytokines and chemokines. *Nat. Med.*, 2014, Vol. 20, no. 5, pp. 511-517.
164. Schmid D., Pypaert M., Munz C. Antigen-loading compartments for major histocompatibility complex class II molecules continuously receive input from autophagosomes. *Immunity*, 2007, Vol. 26, no. 1, pp. 79-92.
165. Schorn C., Janko C., Latzko M., Chaurio R., Schett G., Herrmann M. Monosodium urate crystals induce extracellular DNA traps in neutrophils, eosinophils, and basophils but not in mononuclear cells. *Front. Immunol.*, 2012, Vol. 3, 277. doi: 10.3389/fimmu.2012.00277.
166. Sciorati C., Rigamonti E., Manfredi A.A., Rovere-Querini P. Cell death, clearance and immunity in the skeletal muscle. *Cell Death Differ.*, 2016, Vol. 23, no. 6, pp. 927-937.
167. Shin M.S., Kang Y., Lee N., Wahl R., Kim S., Kang K., Lazova R., Kang I. Self double-stranded (ds)DNA induces IL-1 β production from human monocytes by activating NLRP3 inflammasome in the presence of anti-dsDNA antibodies. *J. Immunol.*, 2013, Vol. 190, no. 4, pp. 1407-1415.
168. Shin M.S., Kang Y., Wahl E.R., Park H., Lasova R., Leng L., Mamula M., Krishnaswamy S., Bucala R., Kang I. Macrophage Migration Inhibitory Factor Regulates U1 Small Nuclear RNP Immune Complex-Mediated Activation of the NLRP3 Inflammasome. *Arthritis Rheumatol.*, 2019, Vol. 71, no. 1, pp. 109-120.
169. Siegert C., Daha M., Westedt M.L., van der Voort E., Breedveld F. IgG autoantibodies against C1q are correlated with nephritis, hypocomplementemia, and dsDNA antibodies in systemic lupus erythematosus. *J. Rheumatol.*, 1991, Vol. 18, no. 2, pp. 230-234.
170. Silke J., Rickard J.A., Gerlic M. The diverse role of RIP kinases in necroptosis and inflammation. *Nat. Immunol.*, 2015, Vol. 16, no. 7, pp. 689-697.
171. Spengler J., Lugonia B., Ytterberg A.J., Zubarev R.A., Creese A.J., Pearson M.J., Grant M.M., Milward M., Lundberg K., Buckley C.D., Filer A., Raza K., Cooper P.R., Chapple I.L., Scheel-Toellner D. Release of active peptidyl arginine deiminases by neutrophils can explain production of extracellular citrullinated autoantigens in rheumatoid arthritis synovial fluid. *Arthritis Rheumatol.*, 2015, Vol. 67, no. 12, pp. 3135-3145.
172. Sutterwala F.S., Ogura Y., Szczepanik M., Lara-Tejero M., Lichtenberger G.S., Grant E. P., Bertin J., Coyle A.J., Galan J.E., Askenase P.W., Fravell R.A. Critical role for NALP3/CIA1/Cryopyrin in innate and adaptive immunity through its regulation of caspase-1. *Immunity*, 2006, Vol. 24, no. 3, pp. 317-327.
173. Sutton C.E., Lalor S.J., Sweeney C.M., Brereton C.F., Lavelle E.C., Mills K.H. Interleukin-1 and IL-23 induce innate IL-17 production from $\gamma\delta$ -T cells, amplifying Th17 responses and autoimmunity. *Immunity*, 2009, Vol. 31, no. 2, pp. 331-341.
174. Takeshige K., Baba M., Tsuboi S., Noda T., Ohsumi Y. Autophagy in yeast demonstrated with proteinase-deficient mutants and conditions for its induction. *J. Cell Biol.*, 1992, Vol. 119, no. 2, pp. 301-311.
175. Tanaka T., Warner B.M., Odani T., Ji Y., Mo Y.-Q., Nakamura H., Jang S.-I., Yin H., Michael D.G., Hirata N., Suizu F., Ishigaki S., Oliveira F.R., Motta A.C.F., Ribeiro-Silva A., Rocha E.M., Atsumi T., Noguchi M., Chiorini J.A. LAMP3 induces apoptosis and autoantigen release in Sjögren's syndrome patients. *Sci. Rep.*, 2020, Vol. 10, no. 1, 15169. doi:10.1038/s41598-020-71669-5
176. Tang S., Zhang Y., Yin S.W., Gao X., Shi W., Wang Y., Huahg X., Wang L., Zou L., Zhao J., Huang Y., Shan L., Gounni A., Wu Y., Zhang J. Neutrophil extracellular trap formation is associated with autophagy-related signalling in ANCA-associated vasculitis. *Clin. Exp. Immunol.*, 2015, Vol. 180, no. 3, pp. 408-418.
177. Taylor R.C., Cullen S.P., Martin S.J. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2008, Vol. 9, no. 3, pp. 231-241.
178. Tillack K., Breiden P., Martin R., Sospedra M. T lymphocyte priming by neutrophil extracellular traps links innate and adaptive immune responses. *J. Immunol.*, 2012, Vol. 188, no. 7, pp. 3150-3159.
179. Tsuchiya K. Switching from apoptosis to pyroptosis: gasdermin-elicited inflammation and antitumor immunity. *International J. Mol. Sci.*, 2021, Vol. 22, no. 1, 426. doi:10.3390/ijms22010426.

180. Urban C.F., Reichard U., Brinkmann V., Zychlinsky A. Neutrophil extracellular traps capture and kill *Candida albicans* yeast and hyphal forms. *Cell Microbiol.*, 2006, Vol. 8, no. 4, pp. 668-676.
181. Valesini G., Gerardi M.C., Iannuccelli C., Pacucci V., Pendolino M., Shoenfeld Y. Citrullination and autoimmunity. *Autoimmun. Rev.*, 2015, Vol. 14, no. 6, pp. 490-497.
182. Vandanmagsar B., Youm Y.H., Ravussin A., Galgani J.E., Stadler K., Mynatt R.L., Ravussin E., Stephens J.M., Dixit V.D. The NLRP3 inflammasome instigates obesity-induced inflammation and insulin resistance. *Nat. Med.*, 2011, Vol. 17, no. 2, pp. 179-188.
183. Vande Walle L., Lamkanfi M. Pyroptosis. *Curr. Biol.*, 2016, Vol. 26, no. 13, pp. R568-R572.
184. Vandivier R.W., Fadok V.A., Ogden C.A., Hoffmann P.R., Brain J.D., Accurso F.J. Impaired clearance of apoptotic cells from cystic fibrosis airways. *Chest*, 2002, Vol. 121, Iss. 3 Suppl., 89S. doi: 10.1378/chest.121.3_suppl.89S.
185. Voll R.E., Herrmann M., Roth E.A., Stach C., Kalden J.R., Girkontaite I. Immunosuppressive effects of apoptotic cells. *Nature*, 1997, Vol. 390, no. 6658, pp. 350-351.
186. Wu M.-Y., Lu J.-H. Autophagy and macrophage functions: inflammatory response and phagocytosis. *Cells*, 2020, Vol. 9, no. 1, 70. doi:10.3390/cells9010070.
187. Wu X., Li K., Yang H., Yang B., Lu X., Zhao L., Fei Y.-Y., Chen H., Wang L., Li J., Peng L.-Y., Zheng W.-J., Hou Y., Jiang Y., Shi Q., Zhang W., Zhang F.-C., Zhang J.-M., Huang B., He W., Zhang X. Complement C1q synergizes with PTX3 in promoting NLRP3 inflammasome over-activation and pyroptosis in rheumatoid arthritis. *J. Autoimmun.*, 2019, 102336. doi:10.1016/j.jaut.2019.102336.
188. Wu X., Ren G., Zhou R., Ge J., Chen F.-H. The role of Ca²⁺ in acid-sensing ion channel 1a-mediated chondrocyte pyroptosis in rat adjuvant arthritis. *Laboratory Investigation*, 2019, Vol. 99, no. 4, pp. 499-513.
189. Xie L., Xu J. Role of MiR-98 and its underlying mechanisms in systemic lupus erythematosus. *The Journal of Rheumatology*, 2018, Vol. 45, no. 10, pp. 1397-1405.
190. Xu J., Jiang Y., Wang J., Shi X., Liu Q., Liu Z., Fan J. Macrophage endocytosis of high-mobility group box 1 triggers pyroptosis. *Cell Death Differ.*, 2014, Vol. 21, no. 8, pp. 1229-1239.
191. Xu Y., Jagannath C., Liu X.-D., Sharafkhan A., Kolodziejska K., Eissa T. Toll-like Receptor 4 is a sensor for autophagy associated with innate immunity. *Immunity*, 2007, Vol. 27, no. 1, pp. 135-144.
192. Yang F., He Y., Zhai Z., Sun E. Programmed cell death pathways in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *J. Immunol. Res.*, 2019, 3638562. doi:10.1155/2019/3638562.
193. Yang Y., Jiang G., Zhang P., Fan J. Programmed cell death and its role in inflammation. *Mil. Med. Res.*, 2015, Vol. 2, 12. doi:10.1186/s40779-015-0039-0.
194. Yao Z., Delorme-Axford E., Backues S.K., Klionsky D.J. Atg41/Icy2 regulates autophagosome formation. *Autophagy*, 2015, Vol. 11, pp. 2288-2299. doi: 10.1080/15548627.2015.1107692.
195. Ye X., Zhou X.-J., Zhang H. Exploring the role of autophagy-related gene 5 (ATG5) yields important insights into autophagy in autoimmune / autoinflammatory diseases. *Front. Immunol.*, 2018, Vol. 9, 2334. doi: 10.3389/fimmu.2018.02334.
196. Yipp B.G., Kubes P. NETosis: how vital is it? *Blood*, 2013, Vol. 122, no. 16, pp. 2784-2794.
197. Zhang D.W., Shao J., Lin J., Zhang N., Lu B.J., Lin S.C., Dong M.Q., Han J. RIP3, an energy metabolism regulator that switches TNF-induced cell death from apoptosis to necrosis. *Science*, 2009, Vol. 325, pp. 332-336.
198. Zhang S., Lu X., Shu X., Tian X., Yang H., Yang W., Zhang Y., Wang G. Elevated plasma cfDNA may be associated with active lupus nephritis and partially attributed to abnormal regulation of neutrophil extracellular traps (NETs) in patients with systemic lupus erythematosus. *Intern. Med.*, 2014, Vol. 53, no. 24, pp. 2763-2771.
199. Zhao J., Jitkaew S., Cai Z., Choksi S., Li Q., Luo J., Liu, Z.G. Mixed lineage kinase domain-like is a key receptor interacting protein 3 down-stream component of TNF-induced necrosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2012, Vol. 109, no. 14, pp. 5322-5327.
200. Zhou X.J., Lu X.L., Lv J.C., Yang H.Z., Qin L.X., Zhao M.H., Su Y., Li Z., Zhang H. Genetic association of PRDM1-ATG5 intergenic region and autophagy with systemic lupus erythematosus in a Chinese population. *Ann. Rheum. Dis.*, 2011, Vol. 70, no. 7, pp. 1330-1337.
201. Zhu L., Wang H., Wu Y., He Z., Qin Y., Shen Q. The autophagy level is increased in the synovial tissues of patients with active rheumatoid arthritis and is correlated with disease severity. *Mediators Inflamm.*, 2017, Vol. 2017, 7623145. doi: 10.1155/2017/7623145.
202. Zickert A., Palmblad K., Sundelin B., Chavan S., Tracey K., Bruchfeld A., Gunnarsson I. Renal expression and serum levels of high mobility group box 1 protein in lupus nephritis. *Arthritis Res. Ther.*, 2012, Vol. 14, no. 1, R36. doi: 10.1186/ar3747.
203. Zoncu R., Efeyan A., Sabatini D.M. mTOR: from growth signal integration to cancer, diabetes and ageing. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, 2011, Vol. 12, no. 1, pp. 21-35.

Автор:

Саидов М.З. — д.м.н., профессор, заведующий кафедрой патологической физиологии ФГБОУ ВО «Дагестанский государственный медицинский университет», г. Махачкала, Республика Дагестан, Россия

Author:

Saidov M.Z., PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Department of Pathological Physiology, Dagestan State Medical University, Makhachkala, Republic of Dagestan, Russian Federation

Поступила 28.02.2022

Принята к печати 28.03.2022

Received 28.02.2022

Accepted 28.03.2022

СЕКРЕТОРНАЯ ФОСФОЛИПАЗА A2: БИОМАРКЕР ВОСПАЛЕНИЯ АУТОИММУННЫХ, БАКТЕРИАЛЬНЫХ И ВИРУСНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

Уразов С.П.¹, Чернов А.Н.², Черкас А.В.³, Бойков А.В.³, Глотов О.С.⁴,
Апалько С.В.¹, Сушенцева Н.Н.¹, Полковникова И.А.¹,
Смирнов В.В.¹, Щербак С.Г.^{1,5}

¹ СПб ГБУЗ «Городская больница № 40 Курортного административного района», г. Сестрорецк, Санкт-Петербург, Россия

² ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

³ Центр компетенций Национальной технологической инициативы по направлению «Новые производственные технологии» ФГАОУ ВО «Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого», Санкт-Петербург, Россия

⁴ Детский научно-клинический центр инфекционных болезней Федерального медико-биологического агентства, Санкт-Петербург, Россия

⁵ ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет», Санкт-Петербург, Россия

Резюме. Секреторные фосфолипазы A2 (sPLA2) представляют собой большое суперсемейство ферментов с молекулярной массой 14–19 кДа, включающее 15 групп и более 30 изоформ, принадлежащих к четырем типам: секреторный (sPLA2), цитозольный (cPLA2), кальций-независимый (iPLA2) и липопопротеин-ассоциированная фосфолипаза A2 (LP-PLA2, PAF-AH). У млекопитающих обнаружены одиннадцать секреторных sPLA2 (IB, IIA, IIC, IID, IIE, IIF, III, V, X, XIIA и XIIB), выполняющие разносторонние функции и участвующие в патогенезе широкого спектра заболеваний. С одной стороны, sPLA2, гидролизуя фосфолипиды мембран, способствуют элиминации поврежденных, апоптотических клеток и оказывают сильное бактерицидное, вируцидное действие, в том числе против антибиотикорезистентных штаммов микроорганизмов. В этом плане использование sPLA2 может представлять новую стратегию терапии бактериальных и вирусных инфекций. С другой стороны, в результате действия sPLA2 на ее субстраты образуются биологически активные молекулы (арахидоновая, лизофосфатидная кислоты, лизофосфолипиды, жирные кислоты, простагландины, лейкотриены, тромбоксаны), которые оказывают сильное воспалительное, детергирующее, коагулирующее действие и повышают проницаемость сосудов. Такая провоспалительная роль sPLA2 обуславливает повышение ее уровней и активности при сердечно-сосудистых, дыхательных, аутоиммунных, метаболических, онкологических, бактериальных и вирусных заболеваниях. В обзоре приводится классификация изоформ sPLA2, рассматриваются их субстраты, регулирующие факторы, биологическое

Адрес для переписки:

Уразов Станислав Петрович
СПб ГБУЗ «Городская больница № 40 Курортного
административного района»
197706, Россия, Санкт-Петербург,
г. Сестрорецк, ул. Борисова, 9.
Тел.: 8 (906) 276-64-53
E-mail: urasta@list.ru

Address for correspondence:

Urazov Stanislav P.
Municipal City Hospital No. 40 of the Kurort Region
197706, Russian Federation, St. Petersburg, Sestroretsk,
Borisov str., 9.
Phone: 7 (906) 276-64-53
E-mail: urasta@list.ru

Образец цитирования:

С.П. Уразов, А.Н. Чернов, А.В. Черкас, А.В. Бойков,
О.С. Глотов, С.В. Апалько, Н.Н. Сушенцева,
И.А. Полковникова, В.В. Смирнов, С.Г. Щербак
«Секреторная фосфолипаза A2: биомаркер воспаления
аутоиммунных, бактериальных и вирусных
заболеваний» // Медицинская иммунология, 2022. Т. 24,
№ 4. С. 705-728. doi: 10.15789/1563-0625-SPA-2460
© Уразов С.П. и соавт., 2022

For citation:

S.P. Urazov, A.N. Chernov, A.V. Cherkas, A.V. Boikov,
O.S. Glotov, S.V. Apalko, N.N. Sushentseva,
I.A. Polkovnikova, V.V. Smirnov, S.G. Shcherbak
“Secretory phospholipase A2: a biomarker of inflammation
in autoimmune, bacterial and viral diseases”, *Medical
Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2022,
Vol. 24, no. 4, pp. 705-728.
doi: 10.15789/1563-0625-SPA-2460
DOI: 10.15789/1563-0625-SPA-2460

значение и механизмы сильного бактерицидного, вируцидного действия, а также провоспалительной активности при сердечно-сосудистых, дыхательных, аутоиммунных, метаболических, бактериальных и вирусных заболеваниях. Отдельно излагаются механизмы селективного действия sPLA2 в отношении грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов. Обсуждаются диагностическая, прогностическая значимость, корреляции повышенных уровней и активности sPLA2 с клиническими симптомами, тяжестью и исходом пациентов с ишемической болезнью сердца (CAD), острым инфарктом миокарда (AMI), атеросклерозом, острым воспалительным повреждением легких (ALI), респираторным дистресс-синдромом (ARDS), хронической обструктивной болезнью легких (COPD), ревматоидным артритом, бронхиальной астмой, бактериальными инфекциями, сепсисом и вирусными (COVID-19) инфекциями. Рассматривается возможность использования sPLA2 в качестве биомаркера тяжести и исхода пациентов с хронической обструктивной болезнью легких, бактериальными инфекциями, сепсисом и вирусными, в том числе COVID-19, инфекциями.

Ключевые слова: секреторная фосфолипаза A2, изоформы фосфолипазы A2, механизмы действия, диагностическое значение фосфолипазы A2, прогностическое значение фосфолипазы A2, корреляции, воспаление, сердечно-сосудистые заболевания, бактериальные заболевания, вирусные заболевания, аутоиммунные заболевания

SECRETORY PHOSPHOLIPASE A2: A BIOMARKER OF INFLAMMATION IN AUTOIMMUNE, BACTERIAL AND VIRAL DISEASES

Urazov S.P.^a, Chernov A.N.^b, Cherkas A.V.^c, Boikov A.V.^c, Glotov O.S.^d,
Apalko S.V.^a, Sushentseva N.N.^a, Polkovnikova I.A.^a, Smirnov V.V.^a,
Shcherbak S.G.^{a, e}

^a Municipal City Hospital No. 40 of the Kurort Region, Sestroretsk, St. Petersburg, Russian Federation

^b Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

^c Industrial Systems of Data Flow Treatment, St. Petersburg Polytechnic University, St. Petersburg, Russian Federation

^d Pediatric Research and Clinical Center of Infectious Diseases, St. Petersburg, Russian Federation

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

Abstract. Secretory phospholipases A2 (sPLA2) represent a large superfamily of enzymes with a molecular weight of 14–19 kDa, including 15 groups and more than 30 isoforms belonging to four types: secretory (sPLA2), cytosolic (cPLA2), calcium-independent (iPLA2) and lipoprotein-associated phospholipase A2 (LP-PLA2, PAF-AH). Eleven species of secretory sPLA2s (IB, IIA, IIC, IID, IIE, IIF, III, V, X, XIIA, and XIIB) have been found in mammals, performing versatile functions and participating in the pathogenesis of a wide range of diseases. On the one hand, sPLA2 may promote elimination of damaged, apoptotic cells by hydrolyzing membrane phospholipids, and exerts a strong bactericidal and antiviral properties, including pronounced effects against antibiotic-resistant strains of microorganisms. In this regard, the use of sPLA2 may represent a new strategy for the treatment of bacterial and viral infections. Moreover, due to the action of sPLA2 on its substrates, a number of biologically active molecules (arachidonic, lysophosphatidic acids, lysophospholipids, fatty acids, prostaglandins, leukotrienes, thromboxanes) are formed, which provide strong inflammatory, detergent, coagulating effects and increase vascular permeability. This pro-inflammatory role of sPLA2 may explain its increase levels and activity in cardiovascular, respiratory, autoimmune, metabolic, oncological, bacterial and viral disorders. The review article presents a classification of sPLA2 isoforms, their substrates, regulatory factors, biological significance, and mechanisms of their strong bactericidal, virucidal, and pro-inflammatory activity in the heart and lung disorders, autoimmune, metabolic, bacterial, and viral diseases. In particular, the mechanisms of the selective action of sPLA2 against Gram-positive and Gram-negative microorganisms are discussed. We consider diagnostic and prognostic significance, correlations between elevated levels and activity of sPLA2 and distinct clinical symptoms, severity and outcome in the patients with coronary heart disease (CAD), acute myocardial infarction (AMI), atherosclerosis, acute inflammatory lung injury (ALI), respiratory distress syndrome (ARDS), chronic obstructive pulmonary disease (COPD), rheumatoid arthritis, bronchial asthma, bacterial infections, septicemia and viral (COVID-19) infections. The

opportunity of using sPLA2 as a biomarker of the severity and outcome of patients with chronic obstructive pulmonary disease, bacterial infections, sepsis and viral infections, including COVID-19, is also considered.

Keywords: secretory phospholipase A2, isoforms, mechanisms of action, diagnostic significance, prognostic value, inflammation, cardiovascular diseases, bacterial diseases, viral diseases, autoimmune diseases, correlations

Введение

Обнаружение новых специфических диагностических и прогностических биомаркеров является актуальной задачей диагностики и терапии социально-значимых заболеваний и борьбы с их этиологическими агентами — резистентными к лечению бактериями и вирусами, в том числе коронавирусом SARS-CoV-2. Определение таких новых биомаркеров должно быть доступным для клинической диагностики, по возможности дешевым и информативным. Доступность биомаркеров определяется возможностью их быстрого выявления в образцах тканей или биологических жидкостях пациента с помощью используемых в лабораторной диагностике методов. Информативность связана с современным состоянием знания о биологической и патологической роли биомаркера в заболевании, установленными механизмами, корреляциями и ассоциациями с тяжестью и исходом патологического состояния.

Среди клинически значимых анализов ключевое место занимают биомаркеры липидного метаболизма [1]. К наиболее распространенным маркерам относятся: глюкоза, триглицериды, холестерин, насыщенные и ω -полиненасыщенные жирные кислоты, липопротеины высокой, низкой, очень низкой плотности, а также их ферменты [2]. К таким липидным энзимам относится секреторная sPLA2 [3]. Идентификация ее изоформ и субстратной специфичности позволили установить роль sPLA2 в патогенезе воспаления и воспалительных артритов [4, 5], ревматоидных синовиоцитах [6], бронхиальной астме [7], остром респираторном синдроме взрослых (ARDS) [8],

атеросклерозе [9], раке [10], ожирении, сахарном диабете [11, 12], гипоксия-ишемическом повреждении нейронов мозга [13, 14], сепсисе [15], бактериальных [16] и вирусных инфекциях [17], а также COVID-19 [18].

В обзоре суммируются последние данные литературы относительно роли PLA2 в патогенезе аутоиммунных, бактериальных, вирусных заболеваний. Обсуждается диагностическое и прогностическое значение PLA2 в качестве биомаркера степени тяжести и исхода этого спектра патологий у пациентов.

1. Фосфолипаза А2: структура и механизм действия

1.1. Структура и локализация PLA2

В нормальных физиологических условиях ферменты фосфолипазы А2 (PLA2) локализованы преимущественно в секреторных железах: слезных протоках, слюнных железах, клетках Панета кишечника, предстательной, молочной железах, семенных пузырьках, везикулах тучных клеток, тромбоцитов и эозинофилов [19]. Например, в слезах человека концентрация PLA2 превышает 30 мкг/мл [20]. В других тканях и сыворотке крови уровни PLA2 у здоровых людей составляют 0–6,5 нг/мл [15].

Фосфолипазы А2 (EC 3.1.1.4) состоят из Ca^{2+} -зависимого липид-связывающего C2-домена (Xxx-Cys-Gly-Xxx-Gly-Gly) и каталитического α/β -гидролазного домена, содержащего последовательность Asp-Xxx-Cys-Cys-Xxx-Xxx-His-Asp в активном центре. Оба домена соединены 5–8 дисульфидными связями (рис. 1). Ионы кальция связываются с Asp-49 и атомами кислорода Tyr-28, Gly-30 и Gly-32 [19, 21].

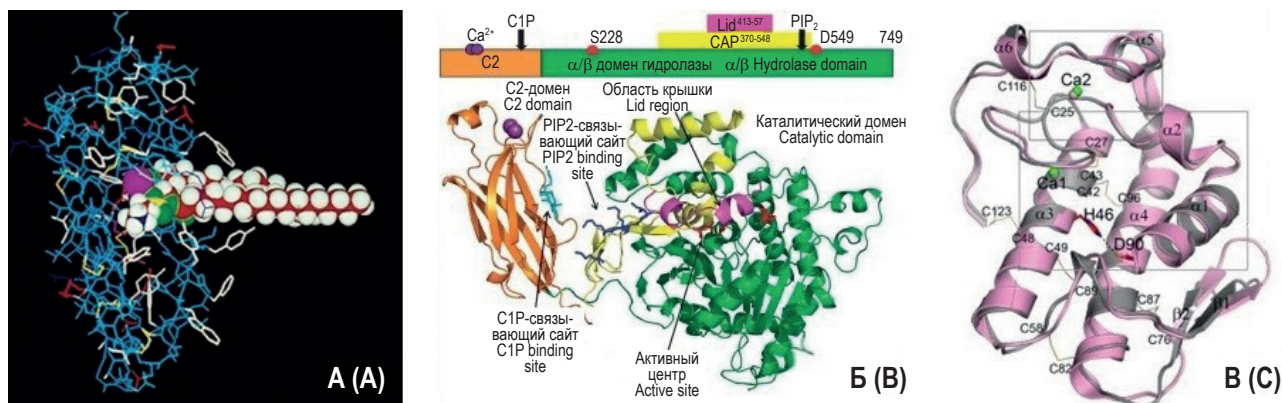


Рисунок 1. Фосфолипаза А2 группы IA (PLA2): А – общий вид, Б – доменная структура, В – активный центр [21, 22]

Figure 1. Phospholipase A2 group IA (PLA2): A, general view; B, domain structure; C, active site [21, 22]

ТАБЛИЦА 1. КЛАССИФИКАЦИЯ СЕКРЕТОРНЫХ ФОСФОЛИПАЗ A2

TABLE 1. CLASSIFICATION OF A2 SECRETORY PHOSPHOLIPASES

Официальное название Official name	Альтернативное название Alternative name	Число дисульфидных связей Number of disulfide bonds	Молекулярная масса (кДа) Molecular weight (kDa)	Каталитические аминокислоты Catalytic amino acids
PLA2G1B	sPLA2-IB	7	13-15	His/Asp
PLA2G2A	sPLA2-IIA	7	13-15	His/Asp
PLA2G2C	sPLA2-IIC	8	15	His/Asp
PLA2G2D	sPLA2-IID	7	14-15	His/Asp
PLA2G2E	sPLA2-IIIE	7	14-15	His/Asp
PLA2G2F	sPLA2-IIF	7	16-17	His/Asp
PLA2G3	sPLA2-III	5	15-18, 55	His/Asp
PLA2G5	sPLA2-V	6	14	His/Asp
PLA2G10	sPLA2-X	8	14	His/Asp
PLA2G12A	sPLA2-XIIA	7	19	His/Asp
PLA2G12B	sPLA2-XIIB	7	19	Leucine/Asp

Фосфолипазы A2 представляют собой большое суперсемейство ферментов с молекулярной массой 14-19 кДа, включающее 15 групп и более 30 изоформ, принадлежащих к 4 типам: секреторный (sPLA2), цитозольный (cPLA2), кальций-независимый (iPLA2) и липопротеин-ассоциированная фосфолипаза A2 (LP-PLA2, PAF-AH) [21, 23, 24]. Одиннадцать секреторных sPLA2 (IB, IIA, IIC, IID, IIE, IIF, III, V, X, XIIA и XIIB) обнаружены у млекопитающих (табл. 1) [25, 26, 27].

PLA2 типа IB локализуется в клетках в виде неактивного зимогена, который активируется трипсином, а PLA2-XIIB — единственная неактивная изоформа.

1.2. Механизмы действия PLA2 и факторы, участвующие в их регуляции

Фосфолипазы PLA2 гидролизуют в положении sn-2 фосфолипиды плазматической и мембраны митохондрий с образованием лизофосфолипидов, арахидоновой (АК), лизофосфатидной кислот, простагландинов, лейкотриенов, тромбосана, фактора активации тромбоцитов и неэтерифицированных жирных кислот [28, 29, 30] (рис. 2).

Секреторная PLA2-IIA также гидролизует внеклеточные везикулы (EV) тромбоцитов, с выделением тромбосансинтазы, гистамина, 12-липоксигеназы, циклооксигеназы и воспалительных эйкозаноидов [18, 27]. Секреторные sPLA2 также гидролизуют альвеолярный сурфактант и фосфолипиды бактерий. При этом активность и экспрессия sPLA2 регулируются фактором некроза опухолей- α (TNF α), интерлейкином-1 (IL-1), стероидами, поверхностно-активным бел-

ком A (SP-A), секреторным белком клеток Clara (CCSP) (рис. 3) [31].

Цитозольная cPLA2 активируется в результате фосфорилирования по Ser505 MAPK в присутствии ионов кальция, что способствует ее перемещению к плазматической мембране для гидролиза фосфолипидов. Кроме того, фосфорилирование cPLA2 наблюдается при взаимодействии лигандов с серотониновым (5-HT₂), глутаматным (mGLUR1), рецепторами интерферонов- α , - γ (IFN α , IFN γ), основного фактора роста фибробластов (bFGF) и фосфолипазы A2 M-типа (PLA2RM) [19]. PLA2RM является односубъединичным трансмембранным гликопротеином I типа с молекулярной массой 180 кДа, который контролирует внеклеточную концентрацию sPLA2 и активирует p38MAPK [32]. Образованная в результате шеддинга, растворимая форма PLA2RM может служить эндогенным ингибитором sPLA2 [33]. Установлено, что через взаимодействие cPLA2- α с гепарансульфатными протеогликанами (HSPG) наблюдается активация каскада АК с образованием PGE₂, эйкозаноидов и простаноидов [19]. Также HSPG участвуют в интернализации hGPIIa посредством эндоцитоза и ее транспорте в везикулах в перинуклеарную область для активации cPLA2- α [19]. Интересно, что sPLA2 также связывается с интегринами α v β 3, α 4 β 1 и α 5 β 1 на клеточной мембране моноцитов U937 индуцирует их пролиферацию через активацию ERK_{1/2} каскада [34]. Получены доказательства активации каскада АК и воспаления в результате связывания sPLA2 с виментином —

белком промежуточных филаментов III типа в ревматоидных синовиоцитах [6].

1.3. Изоформы sPLA2 и их биологическое значение

Биологическое значение PLA2 заключается в переваривании и метаболизме фосфолипидов, защите организма хозяина от бактерицидного действия микроорганизмов, образовании из АК биологически активных медиаторов и внутриклеточном сигналинге. С одной стороны, PLA2 может гидролизовать фосфолипиды апоптотических клеток, участвуя в очистке организма [36]. Кроме того, секреторные PLA2 в концентрации 0,5 мкг/мл индуцируют в течение 20 мин липолиз анионных фосфолипидов мембран 99% грамположительных бактерий (*Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*), обеспечивая защиту мембран клеток человека, состоящих из цвиттерионных фосфолипидов [20]. С другой стороны, липолиз sPLA2-ПА клеточных мембран повреждает ткани и способствует дисфункции органов. При этом из поврежденных клеток в межклеточное пространство и кровь высвобождаются митохондрии и митохондриальная (мтДНК) [5, 37]. При гидролизе фосфолипидов митохондриаль-

ной мембраны образуются АК и ее метаболиты, которые способствуют активации лейкоцитов с секрецией ими воспалительных интерлейкинов и хемокинов. Поврежденные митохондрии, мтДНК представляют собой сильные антигены, которые интернализуются активированными макрофагами, нейтрофилами с выделением воспалительных медиаторов [5, 38, 39].

Каждая изоформа sPLA2 обладает уникальной субстратной специфичностью, локализацией в клетках и тканях и участвует в определенных физиологических и патологических процессах (рис. 4) [40].

Например, sPLA2 группы II (IIA, IIC, IID, IIE, IIF) имеют высокую аффинность к фосфатидилглицерину (PG), фосфатидилсерину и фосфатидилэтаноламину (PE) клеточных мембран, тогда как слабее связываются с фосфатидилхолином (PC). Повышенные уровни sPLA2 группы IIA наблюдаются при воспалении, сепсисе, бактериальных инфекциях, ARDS, атеросклерозе, раке и травмах [8, 27, 41]. Секреторная PLA2 группа V (sPLA2-V, gVPLA2 или PLA2G5) обладает высокой аффинностью к PS и сурфактанту легких, участвуя в метаболических процессах при ожире-

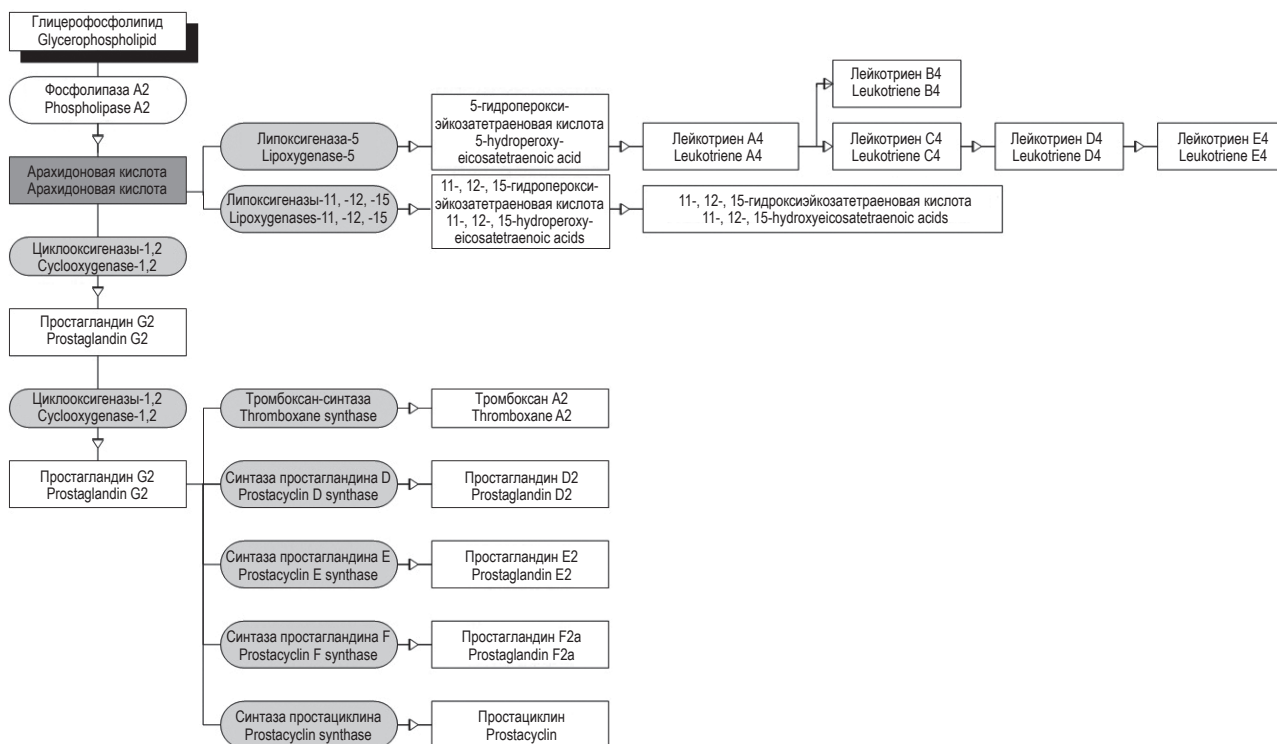


Рисунок 2. Субстраты и ферменты, участвующие в каскаде арахидоновой кислоты, образуемой при гидролизе PLA2 фосфолипидов

Примечание. Эллипсы – ферменты, прямоугольники – субстраты и продукты. PG – простагландины (D, E, F, G, H), COX – циклооксигеназы (1, 2), LT – лейкотриены (A4, B4, C4, D4, E4), 5-LOX – 5-липоксигеназа [19].

Figure 2. Substrates and enzymes involved in the arachidonic acid cascade formed during the hydrolysis of PLA2 phospholipids
Note. Ellipses are enzymes, rectangles are substrates and products. PG, prostaglandins (D, E, F, G, H); COX, cyclooxygenases (1, 2); LT, leukotrienes (A4, B4, C4, D4, E4); 5-LOX, 5-lipoxygenase [19].

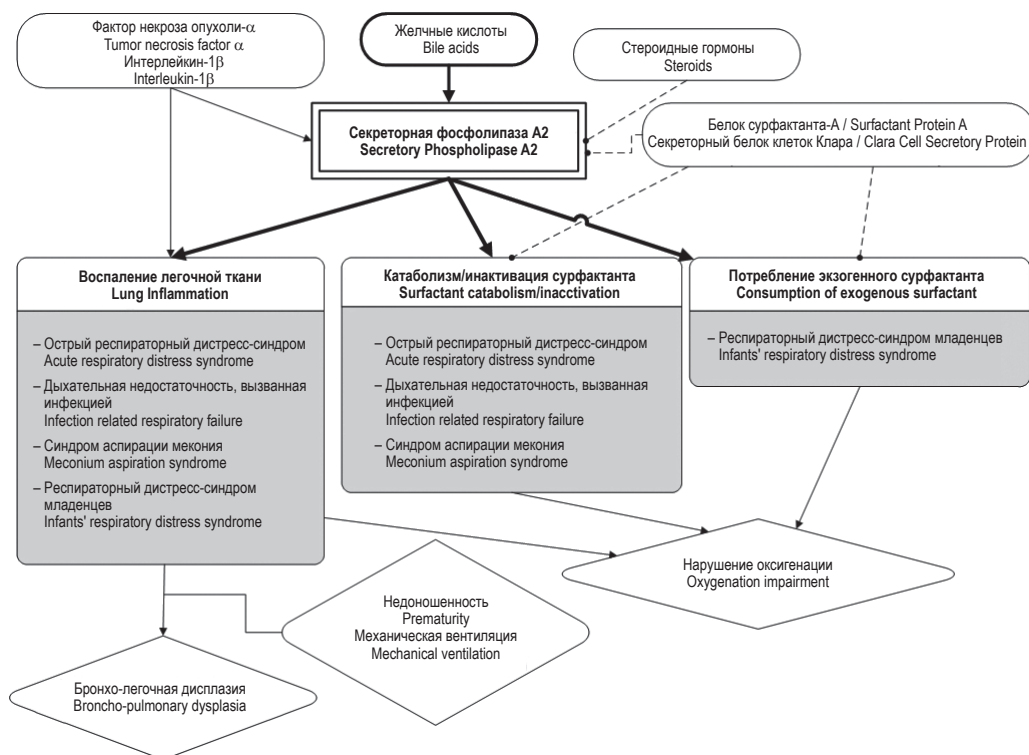


Рисунок 3. Факторы регуляции sPLA2 и ее роль в патогенезе заболеваний легких [31]

Примечание. ARDS (ОРДС) – острый респираторный дистресс-синдром, BPD (БЛД) – бронхо-легочная дисплазия, iRDS – респираторный дистресс-синдром младенцев, IRRF – дыхательная недостаточность, связанная с инфекцией, MAS – синдром аспирации мекония, sPLA2 – секреторная фосфолипаза A2, CCSP – секреторный белок клеток клара, IL-1β – интерлейкин-1β, SP-A – поверхностно-активный белок-A, TNFα – фактор некроза опухоли-α; MB: механическая вентиляция.

Figure 3. Regulatory factors of sPLA2 and its role in the pathogenesis of lung diseases [31]

Note. ARDS, acute respiratory distress syndrome; BPD, broncho-pulmonary dysplasia; iRDS, infants' respiratory distress syndrome; IRRF, infection related respiratory failure; MAS, meconium aspiration syndrome; sPLA2, secretory phospholipase A2; CCSP, clara cell secretory protein; IL-1β, interleukine-1β; SP-A, surfactant protein-A; TNFα, tumor necrosis factor-α; MV, mechanical ventilation.

нии и остром повреждении легких (рис. 3, 4) [42]. sPLA2-V активирует экспрессию молекулы межклеточной адгезии-1 (ICAM-1) на эпителиальных клетках легких, усиливая к ним адгезию нейтрофилов и продукцию воспалительных цитокинов через активацию MAPK/ERK сигнального каскада [43, 44]. Фосфолипаза sPLA2 группы X (sPLA2-X, gXPLA2, PLA2G10, GX-sPLA2) синтезируется как зимоген и проявляет высокое сродство к PC сурфактанта легких, участвуя в повреждении эпителия альвеол дыхательных путей и развитии воспалительной реакции, лежащей в основе астмы (рис. 3, 4) [7]. Следовательно, изоформы II, III, V, X sPLA2 могут рассматриваться в качестве специфических биомаркеров сепсиса, бактериальных инфекций, ожирения, ARDS, астмы и других заболеваний [16, 28, 45].

2. Прогностическое значение sPLA2 при патологических процессах и состояниях

2.1. sPLA2 в воспалении при сердечно-сосудистых заболеваниях

Известно, что воспаление является этиологическим фактором риска развития сердечно-со-

судистых заболеваний [46]. Повышенные до 1000 раз уровни sPLA2-IIA в сыворотке при воспалительных процессах в течение первых нескольких дней указывают на участие этого фермента в патогенезе острой фазы сосудистого воспаления и связанных с ним коронарных событий при CAD и остром коронарном синдроме (ACS) [47]. Например, в работе Li J. и соавт. [47] изучены уровни Lp-PLA2 и липидов в крови у 167 пациентов с нестабильной стенокардией (UA) и 67 лиц с инфарктом миокарда с подъемом ST сегмента (STEMI) в течение 6 ч с момента появления симптомов. Контролем служили 184 пациента с (CAD и ACS). Авторы обнаружили значительно повышенные уровни активности Lp-PLA2 (> 306,4 Ед/л) у пациентов с STEMI и UA по сравнению с группой CAD. У пациентов с ACS чувствительность и специфичность Lp-PLA2 составили, соответственно, 67% и 69% при площади под кривой 0,719. При этом активность Lp-PLA2 коррелировала с концентрацией липопротеинов низкой плотности (LDL-C) [47]. Гидролиз LDL sPLA2 приводит к образованию проатерогенных

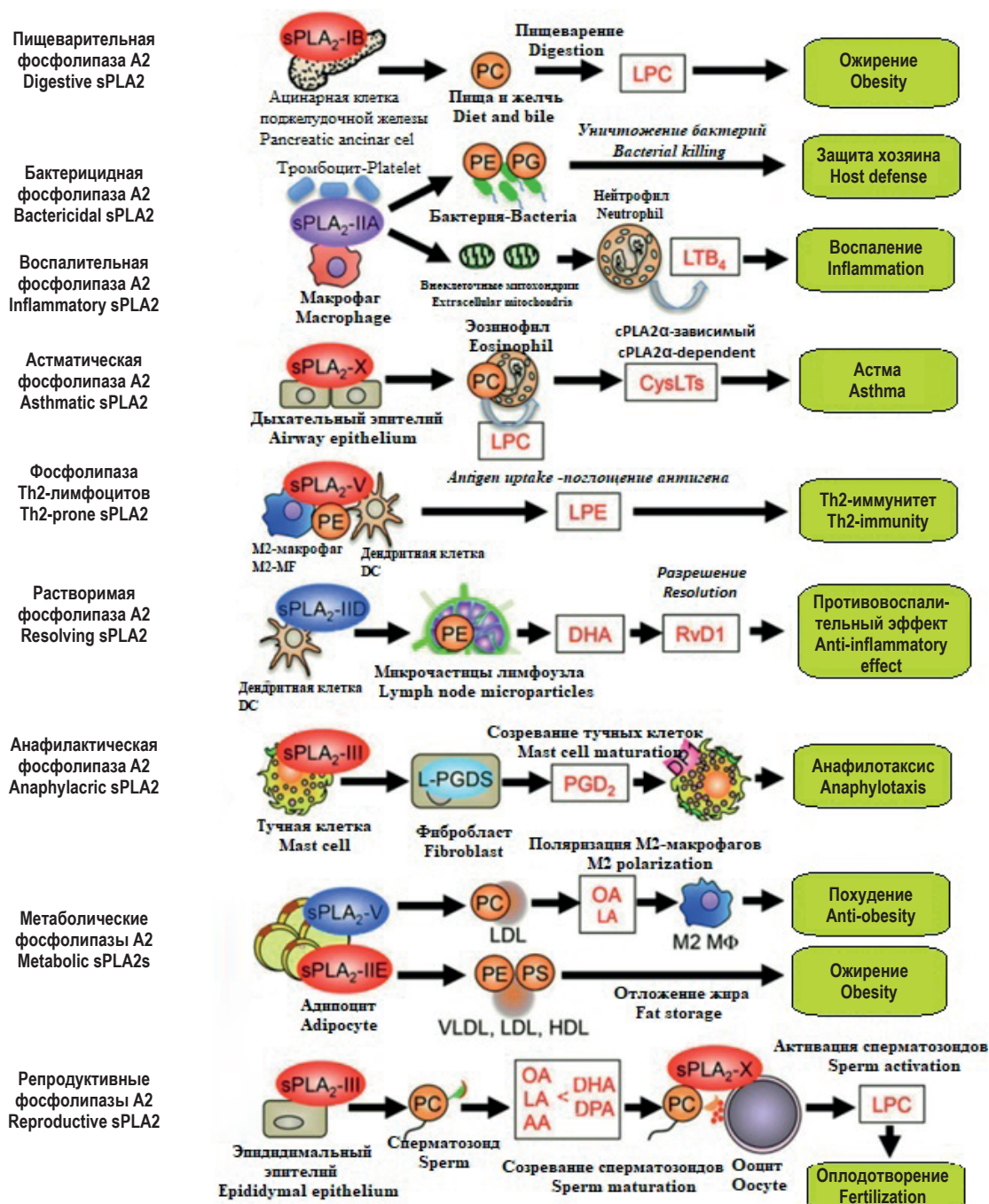


Рисунок 4. Типы секреторной sPLA2 и их функции [40]

Примечание. sPLA2 – секреторная фосфолипаза A2, PC – фосфотидилхолин, LPC – лизофосфатидилхолин, PE – фосфотидиэтаноамин, PG – фосфатидилглицерин, LTB₄ – лейкотриен B₄, CysLTs – цитотоксические Т-лимфоциты, LPE – лизофосфотидиэтаноамин, DHA – докозагексаеновая кислота, DPA – докозапентаеновая кислота, RvD1 – резолвин D1, L-PGDS – простагландин-D-синтаза липокалинового типа, PGD₂ – простагландин D₂, PS – фосфотидилсерин, M2 МФ – макрофаг M2, LDL – липопротеины низкой плотности, HDL – липопротеины высокой плотности, VLDL – липопротеины очень низкой плотности, OA – олеиновая кислота, LA – линолевая кислота, AA – арахидоновая кислота.

Figure 4. Types of secretory sPLA2 and their functions [40]

Note. sPLA2, secretory phospholipase A2; PC, phosphatidylcholine; LPC, lysophosphatidylcholine; PE, phosphatidylethanoamine; PG, phosphatidylglycerin; LTB₄, leukotriene B₄; CysLTs, cytotoxic T-lymphocytes; LPE, lysophosphatidylethanoamine; DHA, docosahexaenoic acid; DPA, docosapentaenoic acid; RvD1, resolvins D1; L-PGDS, prostaglandin-D-lipoxygenase type synthase; PGD₂, prostaglandin D₂; PS, phosphatidylserine; M2 MF, macrophage M2; LDL, low density lipoproteins; HDL, high density lipoproteins; VLDL, very low density lipoproteins; OA, oleic acid; LA, linoleic acid; AA, arachidonic acid.

липопротеинов очень низкой плотности (VLDL) и активации макрофагов, секретирующие воспалительные цитокины [3].

В другом исследовании, проведенном на 1056 пациентах с AMI, UA, стабильной стенокардией (SA) и группе контроля (без CAD), изучены уровни LP-PLA2 в зависимости от количества пораженных коронарных ветвей. Установлено, что уровень LP-PLA2 был выше ($p < 0,001$) у пациентов со стенозом одного сосуда (230,95, 115,69–406,35 нг/мл) и двух коронарных ветвей (289,24, 132,11–430,21 нг/мл), чем в контрольной группе (172,83, 92,35–296,42 нг/мл). Также уровни LP-PLA2 у пациентов с AMI (311,45, 85,24–412,35 нг/мл) и UA (263,95, 172,32–396,45 нг/мл) были статистически значимо ($p < 0,001$) выше по сравнению с группами SA (193,84, 102,35–372,35 нг/мл) и контролем. Чувствительность и специфичность LP-PLA2 для выявления CAD составили 75,6% и 67,3% соответственно, а тяжести стеноза коронарных артерий – 53,0% и 80,3%. Авторы делают вывод, что активность LP-PLA2 положительно коррелирует с тяжестью CAD [48]. В двойном слепом плацебо-контролируемом клиническом исследовании JUPITER (NCT00239681) изучен уровень sPLA2-IIA в плазме крови у 17 802 здоровых мужчин (старше 50 лет) и женщин (старше 60 лет) с холестерином ЛПНП < 130 мг/сут и hsCRP (≥ 2 мг/л) с предрасположенностью к риску сердечно-сосудистых событий и хроническим воспалением при применении розувастатина в дозе 20 мг/сут в течение 1 года. За время наблюдения произошло 313 эпизодов сердечно-сосудистых заболеваний. Результаты исследования показывают, что уровень sPLA2-IIA (3,81, 75% перцентиль: 2,49–6,03 нг/мл) коррелирует с повышенным риском $OR = 1,22$ (95% CI 1,08–1,38; $p = 0,002$) сердечно-сосудистых заболеваний. Аллель С полиморфизма rs11573156 (с.-180C $>$ T) гена PLA2G2A был ассоциирован с повышенным уровнем sPLA2-II 2,79 (1,97–4,01 нг/мл для CC генотипа) и 7,38 (5,38–10,19 нг/мл для GG генотипа) и имел тенденцию ($OR = 1,11$; 95% CI 0,89–1,38; $p = 0,34$) к высокому риску сердечно-сосудистых заболеваний [49]. Также установлена положительная корреляция sPLA2-IIA с уровнями глюкозы, подтверждающая связь энзима с системным воспалением [18].

2.2. sPLA2 при атеросклерозе

Ранние иммуногистохимические исследования установили, что PLA2 экспрессируется в атеросклеротических бляшках [50]. Последние данные указывают на проатерогенную роль различных изоформ sPLA2 (lp-PLA2) [3]. Окисление и последующий гидролиз LDL с помощью активных форм кислорода и lp-PLA2 способству-

ет истощению фосфолипидов и образованию проатерогенных частиц в результате активации гладкомышечных клеток и секреции ими хемоаттрактантного белка-1 моноцитов [51, 52]. В исследовании Sun C.Q. и соавт. изучена зависимость между атеросклерозом и уровнем sPLA2-IIA у 136 пациентов с метаболическим синдромом (MetS) и 120 лиц контрольной группы. У пациентов с MetS уровень ($7,83 \pm 2,58$ нг/мл, $p = 0,008$), активность sPLA2-IIA ($31,21 \pm 7,00$ ед/мл, $p = 0,002$) и толщина интимы-медии сонной артерии (сИМТ $0,87 \pm 0,17$ мм, $p = 0,013$) были выше, чем эти параметры в контрольной группе ($4,69 \pm 2,40$ нг/мл, $22,49 \pm 10,37$ ед/мл, $0,61 \pm 0,25$ мм). Концентрация и активность sPLA2-IIA положительно коррелировали с уровнями молекулы межклеточной адгезии-1 ICAM-1 ($r = 0,308$, $r = 0,282$, $p = 0,011$, $p = 0,02$), молекулы сосудистой адгезии-1 VCAM-1 ($r = 0,430$, $r = 0,288$, $p < 0,001$, $p = 0,017$), Е-селектина ($r = 0,374$, $r = 0,337$, $p = 0,002$, $p = 0,005$) и Р-селектина ($r = 0,259$, $r = 0,403$, $p = 0,033$, $p < 0,001$), глюкозы в крови натощак ($r = 0,190$, $r = 0,181$, $p = 0,031$, $p = 0,042$) и окружностью талии ($r = 0,184$, $r = 0,219$ см, $p = 0,037$, $p = 0,017$) у пациентов с MetS. Многофакторный регрессионный анализ показал, что уровень ($OR = 1,176$, 95% CI: 1,118–1,235, $p = 0,003$) и активность sPLA2-IIA ($OR = 1,142$, 95% CI: 1,098–1,178, $p = 0,004$) были независимыми факторами риска развития атеросклероза у пациентов с MetS. Это исследование демонстрирует зависимость между повышенным уровнем sPLA2-IIA и атеросклерозом у пациентов с MetS [53].

Следовательно, эти клинические результаты показывают, что sPLA2-IIA может служить прогностическим маркером и потенциальной терапевтической мишенью при атеросклерозе [19].

2.3. sPLA2 при остром воспалительном повреждении легких (ALI) и остром респираторном дистресс-синдроме

Исследования 1980-х и 90-х годов идентифицировали sPLA2-IIA в качестве маркера и медиатора ALI и ARDS [54]. В результате прямого повреждения альвеол и сурфактанта легких при бактериальной (например, *S. aureus*, *Strep. pneumoniae*), вирусной (например, SARS-CoV-2, грипп) инфекциях, кислотной аспирацией или механическим растяжением развивается неконтролируемое нейтрофильное воспаление с отеком при котором эндотоксины (липополисахарид бактерий) и цитокины (TNF α) стимулируют экспрессию sPLA2-IIA в CD11⁺ альвеолярных макрофагах, эпителиоцитах и дендритных клетках [16, 41, 55]. Клинические исследования подтвердили повышенную экспрессию мРНК sPLA2-IIA в жидкости бронхоальвеолярного лаважа, внеклеточных везикулах (в 1,72 раза) и плазме у паци-

ентов с ARDS по сравнению с контролем [20, 57]. При этом уровень sPLA2-IIA в жидкости бронхоальвеолярного лаважа коррелировал с тяжестью ARDS [57]. Помимо sPLA2-IIA, в патогенезе ALI и ARDS установлена роль sPLA2-V [43]. Эта изоформа экспрессируется в эпителиальных клетках легких и активированных нейтрофилах при пневмонии, вызванной *S. aureus* (MRSA) [58]. Активация sPLA2-V индуцирует образование стрессовых волокон в результате перестройки F-актина цитоскелета и разрушение контактов между эпителиальными клетками альвеол [59]. Также sPLA2-V взаимодействуя с интегринами или рецептором PLAR1 активирует высвобождение из нейтрофилов фактора роста эндотелия сосудов (VEGF), разрушающего эндотелиальный барьер [60]. Интересно, что активности sPLA2-IIA, sPLA2-IIIV, sPLA2-IIIX были повышены (430, 253-600 против 149, 61-387 IU/мл, $p = 0,01$) в бронхоальвеолярном лаваже у 24 младенцев с ARDS по сравнению с контрольной группой из 14 детей. Авторами установлены статистически значимые корреляции между активностью sPLA2 и свободными жирными кислотами ($p = 0,823$, $p < 0,001$), поверхностным натяжением легких ($p = 0,55$, $p < 0,028$), продолжительностью их вентиляции ($p = 0,53$, $p = 0,002$), получением кислородной терапии ($p = 0,54$, $p = 0,001$) и длительностью пребывания в отделении интенсивной терапии ($p = 0,54$, $p = 0,001$) [61]. С другой стороны, ингибирование sPLA2-IIA ослабляет защиту организма при бактериальных инфекциях, что может способствовать обострению ALI [16]. Детальное изучение механизмов sPLA2 в патогенезе ALI и ARDS будет способствовать разработке препаратов для терапии этих заболеваний.

2.4. sPLA2 в развитии воспаления при аутоиммунных заболеваниях

2.4.1. Ревматоидный артрит

Уровни sPLA2 в синовиальной жидкости при хронических воспалительных состояниях, таких как ревматоидный артрит (РА) могут достигать нескольких микрограммов на миллилитр [39]. Фосфолипаза sPLA2 может служить биомаркером при РА, поскольку ее концентрации в сыворотке и тканях пропорционально повышаются с тяжестью заболевания [62]. Например, в срезах суставной ткани пациентов с РА с помощью иммуногистохимии установлена экспрессия 6 изоформ sPLA2-IIA, sPLA2-IIID, sPLA2-IIIE, sPLA2-IIIF, sPLA2-V и sPLA2-X. Причем sPLA2-IIA, sPLA2-X присутствовали в синовиоцитах и хондроцитах, sPLA2-IIID – в лимфатических фолликулах и эндотелии капилляров, sPLA2-IIIE – в гладкомышечных клетках сосудов и sPLA2-V – в интерстициальных фибробластах. Причем экспрессия sPLA2-IIA и sPLA2-V в синовиоцитах человека

могла быть индуцирована интерлейкином-1. Тогда как уровни экспрессии изоформ sPLA2-II коррелировали с тяжестью РА [63]. Однако в другом исследовании показано, что sPLA2 также экспрессируется в синовиальной жидкости пациентов с РА, причем sPLA2-IIA оказывает провоспалительное действие, а sPLA2-V обладает противовоспалительным эффектом за счет активации синтеза лейкотриенов и стимуляции ими клиренса иммунных комплексов. Следовательно, sPLA2-V может рассматриваться в качестве потенциального терапевтического средства при иммунных воспалительных заболеваниях [64]. В исследовании Sommerfelt R.M. и соавт. [65] установлено, что изоформы iPLA2, cPLA2 и толл-подобные рецепторы (TLR1-7) экспрессируются в синовиоцитах при РА. При этом активация TLR1/2 и TLR2/6 индуцировала фосфорилирование cPLA2 α и образование АК, PGE2, IL-6, IL-8 и COX2.

2.4.2. Бронхиальная астма и хроническая обструктивная болезнь легких

Massimo Triggiani и коллегами из Неаполитанского университета им. Федерико II (Неаполь, Италия) установлено, что анти-IgE-антитела стимулируют секрецию sPLA2-IB, sPLA2-IIA, sPLA2-IIID, sPLA2-IIIE, sPLA2-IIIF, sPLA2-III, sPLA2-V, sPLA2-X, sPLA2-XIIA и sPLA2-XIIB при дегрануляции тучных клеток легких человека на ранней стадии аллергической реакции [66]. Кроме того, PLA2V активирует эозинофилы астматиков, в которых наблюдается фосфорилирование cPLA2 α и секреция АК, лейкотриена C4 (LTC4), простагландина E2 (PGE2) и эйкозаноидов, индуцирующих сужение бронхов, проницаемость сосудов, рекрутирование и активацию дендритных клеток, Т-лимфоцитов, и нейтрофилов [67]. Активированные LTC4 иммунные клетки секретируют воспалительные цитокины (IL-1 β , IL-2, IL-4) и хемокины, усиливающие повреждение легочного сурфактанта [68]. Напротив, у пациентов с полиморфизмами rs121434634 (Ser111Pro), rs121434635 (Arg485His), rs2307198 (Lys651Arg) в гене PLA2G4A, кодирующим cPLA2 α , наблюдается значительное снижение концентрации эйкозаноидов [69]. В зависимости от взаимодействия PGE2 с одним из 4 типов рецепторов (EP1, EP2, EP3 и EP4), он может стимулировать как дилатацию бронхов, так и оказывать провоспалительные эффекты [70]. Однако АК может служить субстратом для резольвинов и липоксинов (LX), которые ингибируют миграцию и хемотаксис нейтрофилов, дегрануляцию тучных клеток, окислительный взрыв в эозинофилах и секрецию цитокинов эпителиальными клетками бронхов [71]. При этом концентрация резольвина D (RvD) у 60 пациентов с тяжелой реф-

рактерной астмой была ниже ($77,1 \pm 0,86$ пг/мл, $p < 0,0001$), чем в группе здоровых добровольцев ($132,1 \pm 2,56$ пг/мл) [72]. Помимо sPLA2-IIA, в эпителии дыхательных путей и образцах бронхолегочного лаважа наблюдается повышение экспрессии и активности sPLA2X. Причем sPLA2X участвует в выработке провоспалительных цистеиниллейкотриенов (cysLT), PGE2 и коррелирует функцией легких, рекрутированием нейтрофилов и поляризации M2-фенотипа макрофагов у астматиков [68, 73]. При астме, как при других заболеваниях легких, sPLA2-IIA и sPLA2-X гидролизуют фосфатидилхолин — основной компонент сурфактанта с образованием лизофосфолипидов и свободных жирных кислот, которые закупоривают малые дыхательные пути при астме [68]. Группы VII и VIII PLA2 (фактор активации тромбоцитов PAF-AH) проявляют провоспалительные и противовоспалительные свойства. Причем низкий уровень PAF-AH коррелирует с тяжестью астмы [74]. Активность Lp-PLA2 в крови была выше ($224, 191$ – 261 нмоль/мин/мл, $p = 0,006$) у 101 пациента с легкой или средней формой астмы по сравнению с 63 пациентами с тяжелой формой астмы ($203, 181$ – 229 нмоль/мин/мл), т. е. отрицательно коррелирует с тяжестью заболевания ($\beta = -0,15, -0,23$ – $-0,07$, $p = 0,001$). Напротив, активность Lp-PLA2 положительно коррелирует с уровнями глюкозы ($\beta = 0,1$), триглицеридов ($\beta = 0,11$) и LDL ($\beta = 0,1$), и отрицательно коррелирует с уровнями TNF α ($\beta = -0,27$), протромбина ($\beta = -0,16$), фибриногена ($\beta = -0,12$), CRP ($\beta = -0,1$) [75].

В патогенезе COPD участвуют альвеолярные макрофаги, нейтрофилы, тучные клетки и лимфоциты [76]. Активированные макрофаги секретируют sPLA2-IIA, sPLA2-IID, sPLA2-IIIE, sPLA2-IIIF, sPLA2-V, sPLA2-X и sPLA2-XIIA, а также cPLA2-IVA, iPLA2-VIA [68, 77]. Нейтрофилы содержат sPLA2X в азурофильных и sPLA2-V, sPLA2-X в специфических гранулах [68]. Следовательно, активность sPLA2-V, sPLA2-X в бронхолегочном лаваже пациентов с COPD в 3–5 раз выше, чем у лиц контрольной группы [78]. При длительной легочной гипертензии — одном из осложнений COPD, повышенные уровни Lp-PLA2 ($429,1$ против $256,3$ пг/мл в контроле) сочетаются с дисфункцией эндотелия [79]. В недавнем исследовании, проведенном на 92 пациентах с COPD и 16 здоровых курильщиков, установлено, что уровень Lp-PLA2 в сыворотке крови повышается в зависимости от глобального среднего значения стадии COPD (GOLD), а также отрицательно коррелирует с индексом первой секунды форсированного выдоха/полной форсированной жизненной емкости легких (FEV1/FVC. $r = -0,528$, $p < 0,001$), тестом с 6-мин ходьбой (6MWT,

$r = -0,578$, $p = 0,002$), индексами массы тела (BMI, $r = -0,312$, $p = 0,002$) и обезжиренной массы (FFMI, $r = -0,336$, $p = 0,002$) и положительно коррелирует с оценочными тестами на COPD (CAT, $r = 0,339$, $p < 0,001$) и тестом модифицированного Британского совета медицинских исследований (mMRC, $r = 0,339$, $p < 0,001$) (рис. 5). Пороговое значение уровня Lp-PLA2 составило $133,7$ нг/мл. Чувствительность и специфичность для прогнозирования плохого 6MWD на основе порогового значения уровня Lp-PLA2 составляли $88,57\%$ и $61,40\%$ соответственно. Прогностическая эффективность Lp-PLA2 для оценки толерантности к физической нагрузке составила $79,6\%$ (площадь под кривой AUC: $0,796$) и в производной модели номограммы (AUC $0,884$). Авторы делают вывод, что Lp-PLA2 является специфическим биомаркером для оценки толерантности к физическим нагрузкам у пациентов с COPD в клинической практике [80].

2.5. Роль sPLA2 при бактериальных инфекциях

Помимо провоспалительной активности sPLA2-IIA проявляет бактерицидное действие против грамположительных (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus* групп A и B (GAS, GBS), *Bacillus anthracis*, *Listeria monocytogenes*) бактерий, обеспечивая врожденный барьерный механизм защиты от вторжения инфекций [27, 81, 82, 83, 84, 85]. При тяжелых острых бактериальных инфекциях концентрация sPLA2-IIA повышается до 500 раз в плазме крови (250 – 500 нг/мл) у пациентов по сравнению здоровыми людьми (1 – 3 нг/мл) [86]. Индукторами увеличения концентрации sPLA2-IIA при бактериальных инфекциях выступают липополисахарид (LPS) грамотрицательных бактерий *Escherichia coli*, ExoS токсин *Pseudomonas aeruginosa*, флагеллин, ДНК бактерий, а также TNF α , IL-1 β , IL-6 [16, 35]. PLA2-IIA в течение 2 ч лизирует 90% *S. aureus* и 99% *Listeria monocytogenes* в сыворотке пациентов. Даже при физиологических концентрациях PLA2-IIA уничтожает 90% *L. monocytogenes*, но не проявляет бактерицидной активности в отношении *S. aureus* и *E. coli* [86].

2.5.1. Механизмы селективного действия sPLA2 в отношении грамположительных и грамотрицательных бактерий

Считается, что различия в структуре клеточной стенки грамположительных и грамотрицательных бактерий являются основным фактором их чувствительности к sPLA2-IIA. Фермент, обладающий сильно положительным зарядом, присоединяется к отрицательно заряженной бактериальной стенке, содержащей тейхоевые кислоты (WTA), за счет электростатических взаимодействий (рис. 6).

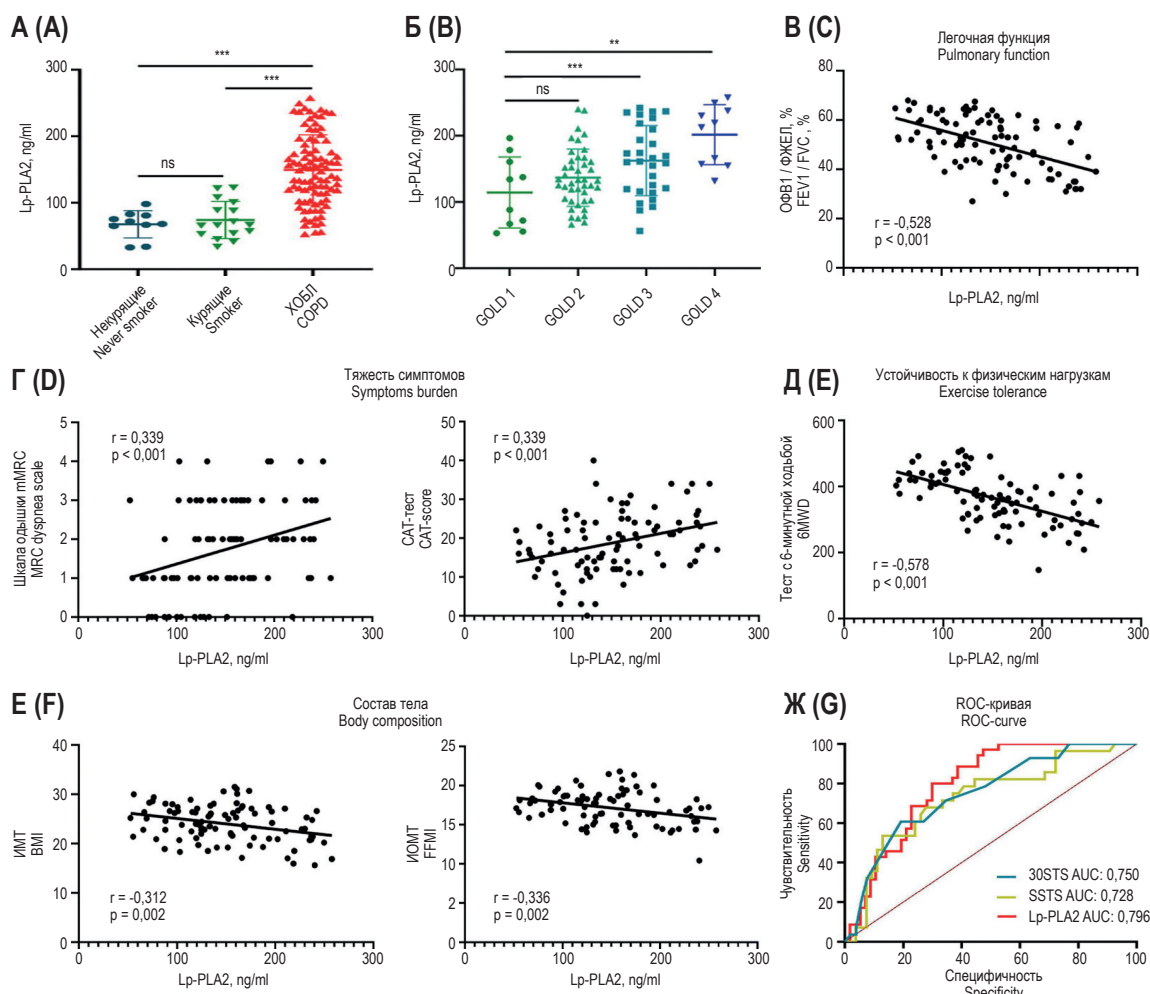


Рисунок 5. Корреляции уровня Lp-PLA2 с клиническими показателями у пациентов с COPD

Примечание. А – уровень Lp-PLA2 в сыворотке крови у пациентов с COPD. Б – повышение уровня Lp-PLA2 в зависимости от стадии GOLD. В – уровень Lp-PLA2 отрицательно коррелирует с индексом FEV1/FVC. Г – уровень Lp-PLA2 положительно коррелирует с оценками mMRC и CAT. Д – уровень Lp-PLA2 отрицательно коррелирует с BMI и FFMI. Е – уровень Lp-PLA2 отрицательно коррелирует с 6MWD. Ж – анализ кривой ROC-уровня Lp-PLA2, ** – $p < 0,01$, *** – $p < 0,001$ [80]. Pulmonary function – легочная функция, exercise tolerance – устойчивость к физическим нагрузкам, Symptom burden – бремя симптомов, body composition – состав тела

Figure 5. Correlations of Lp-PLA2 level with clinical parameters in patients with COPD

Note. (A) Serum Lp-PLA2 levels in patients with COPD. (B) increase in Lp-PLA2 level depending on the GOLD stage. (C) Lp-PLA2 level is negatively correlated with FEV1/FVC index. (D) Lp-PLA2 level positively correlates with mMRC and CAT scores. (E) Lp-PLA2 level is negatively correlated with BMI and FFMI. (F) Lp-PLA2 level is negatively correlated with 6MWD. (G) Analysis of the ROC curve of the Lp-PLA2 level; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$ [80].

Связавшись с WTA, sPLA2-IIA вытесняет связанные с ней ранее автолизины с образованием «пузыря» тейхоевых кислот (WTA), что обеспечивает прохождение sPLA2-IIA через клеточную стенку в результате деградации автолизинами пептидогликана [87].

Такие бактерии, как *S. aureus* могут модифицировать или восстанавливать фосфолипиды своих мембран, гидролизованных sPLA2-IIA, изменяя их поверхностный заряд за счет экспрессии положительно заряженных компонентов (например D-аланина), посредством кодируемого опероном dltABCD механизма, уменьшающего электростатическое взаимодействие. По этой

причине, мутант *S. aureus* dltA в 100 раз чувствительнее к бактерицидному действию sPLA2-IIA, чем D-аланин-содержащий родительский штамм [88]. *Strp. pyogenes*, экспрессируя ферменты сортазу А и транспептидазу, участвующие в закреплении LPXTG белков в клеточной стенке, проявляют устойчивость более чем в 30 раз к воздействию sPLA2-IIA, чем штаммы, лишённые LPXTG протеинов [89]. В другом исследовании с помощью секвенирования транспозонов у GAS и GBS идентифицированы гены чувствительности (dltA и lytR) и гены-устойчивости (gacH и gacI) к sPLA2-IIA. Мутанты GAS потеря по гену gacI, лишённые боковой цепи N-ацетилглюкозамина

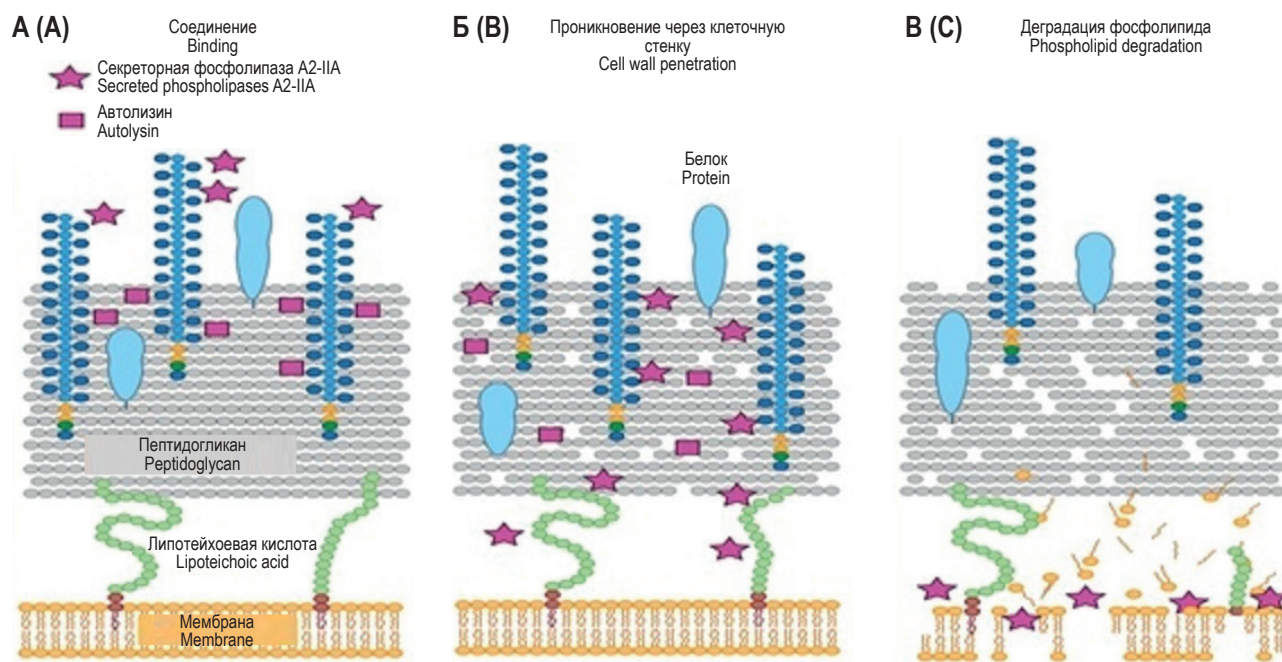


Рисунок 6. Механизм действия sPLA2-IIA против грамположительных бактерий [16]

Примечание. А – Binding – связывание: Autolysin – автолизин, Peptidoglycan – пептидогликан, LTA (WTA) – липотейхоевая кислота, Membrane – мембрана. Б – Cell wall penetration – проникновение через клеточную стенку, Protein – белок. В – Phospholipid degradation – деградация фосфолипида.

Figure 6. Mechanism of action of sPLA2-IIA against Gram-positive bacteria [16]

Note. (A) Binding, (B) Cell wall penetration, (C) Phospholipid degradation.

(GlcNAc) проявляют резистентность в 10 раз к sPLA2-IIA, чем штамм GAS 5448 дикого типа. Также мутанты GBS, лишённые углеводов Ланцефильда, обладают устойчивостью к бактерицидному действию sPLA2-IIA [82]. Кроме того, *B. anthracis* могут защищать себя от литического действия sPLA2-IIA путем выделения edema токсинов (ET), повышающих внутриклеточные уровни циклического аденозинмонофосфата (цАМФ), который ингибирует экспрессию sPLA2-IIA в клетках хозяина [90]. По вышеописанным причинам, в целом грамотрицательные бактерии являются более устойчивыми к активности sPLA2-IIA, чем грамположительные. Однако sPLA2-IIA может лизировать грамотрицательных бактерий в сочетании с мембраноатакующим комплексом комплемента [16].

Устойчивость грамотрицательных бактерий к sPLA2-IIA обеспечивает им преимущество в выживании по сравнению с грамположительными патогенами при их совместной колонизации и способствует дисбиозу [91]. Например, на ранних стадиях дыхательные пути у пациентов с муковисцидозом (CF) колонизируются *S. aureus*, на более поздних стадиях преобладает *P. aeruginosa* [92]. Этот патоген индуцирует секрецию sPLA2-IIA альвеолярными макрофагами, нейтрофилами и эпителиоцитами легких, что обеспечивает эли-

минацию *S. aureus* и сдвиг инфекции в сторону *P. aeruginosa* (рис. 7). [16, 91].

Следует отметить, что sPLA2-IIA может с одинаковой эффективностью лизировать как антибиотикоустойчивые, так и чувствительные штаммы патогенов. Следовательно, sPLA2-IIA может рассматриваться в качестве потенциального средства для борьбы с антибиотикоустойчивыми бактериями [16]. Идентификация sPLA2-устойчивых микроорганизмов и изучение механизмов резистентности к sPLA2 может представлять стратегию борьбы с антибиотикоустойчивыми бактериями [93].

2.5.2. Диагностическая значимость sPLA2-IIA при сепсисе и бактериальных инфекциях

Тан Т.Л. и соавт. [94] проведено проспективное когортное исследование по оценке диагностической значимости sPLA2-IIA у 151 пациента с бактериальной инфекцией (*E. coli*, *S. aureus*, *Proteus spp.*, *P. aeruginosa*, *Candida spp.*, *Klebsiella pneumoniae*, *Bacteroides spp.*, *Morganella morganii*, *Mycoplasmata tuberculosis*, *Strep. Viridans*, *Burkholderia pseudomallei*, *Chlamydia Pneumoniae*, *Enterobacter spp.*, *Salmonella spp.*, *Scytalidium spp.*), поступившего в отделение неотложной помощи в национального университета Малайзии. Эффективность sPLA2-IIA сравнивали по чувствительности, специфичности и расчету площади под кривой

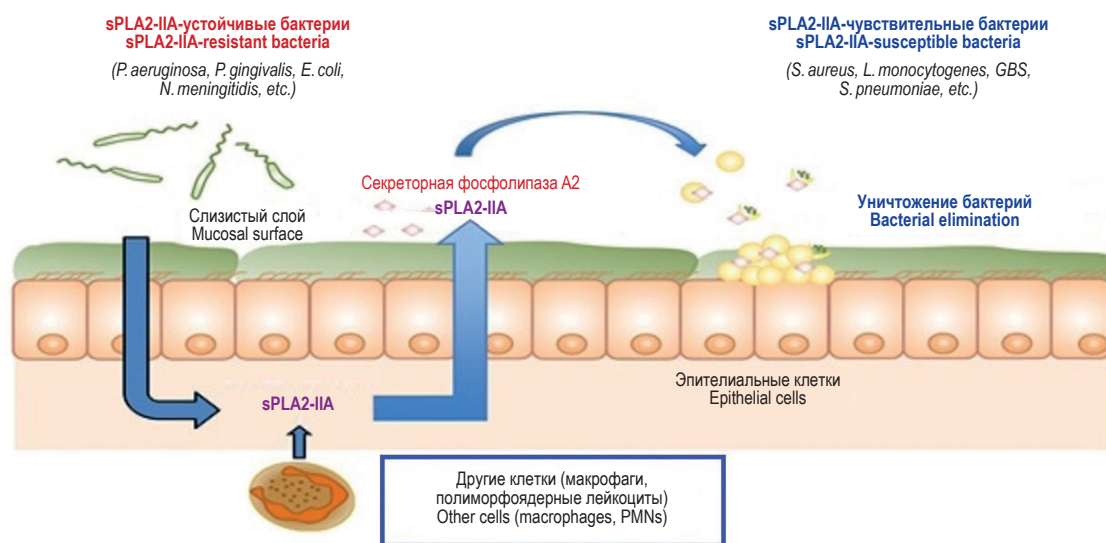


Рисунок 7. Индуцируемая бактериями sPLA2-IIA лизирует бактерии-конкуренты [16]

Примечание. sPLA2-IIA – секреторная фосфолипаза А2-IIА, PMNs – полиморфоядерные лейкоциты.

Figure 7. Bacterially induced sPLA2-IIA lyses competing bacteria [16]

Note. sPLA2-IIA, secretory phospholipase A2-IIA; PMNs, polymorphonuclear leukocytes.

с соответствующими показателями для hsCRP, процентного содержания нейтрофилов (N%), прокальцитонина (PCT) и лактата. Чувствительность 80% (95% CI 72-87%), специфичность 94% (95% CI 81-89%) и площадь под кривой 0,93 (95% CI 0,89-0,97) для sPLA2-IIA при пороговом значении 7,04 мкг/л оказались самыми высокими среди остальных анализов (рис. 8). Авторы считают, что sPLA2-IIA может быть использован наравне с другими клинико-диагностическими показателями в качестве диагностического биомаркера при бактериальных инфекциях [94].

Во время острой фазы сепсиса уровень sPLA2-IIA в плазме может составлять 250-500 нг/мл и коррелирует с тяжестью заболевания [16, 18]. В исследовании, проведенном на 45 взрослых пациентах с синдромом системного воспалительного ответа и 45 добровольцев контрольной группы, установлено, что средний уровень sPLA2-IIA у пациентов составил 123 нг/мл (44-507,75 нг/мл) и был выше ($p < 0,0001$), чем в контрольной группе 0 (0-6,5 нг/мл) (рис. 9) [15].

При пороговой величине 25 нг/мл sPLA-2IIA имеет чувствительность 86,7% (95% CI 72,5-94,5) и специфичность 91,1% (95% CI 77,9-97,1) для диагностики сепсиса [15]. В более раннем исследовании у 52 пациентов с сепсисом и 40 здоровых добровольцев активность sPLA-2IIA в 1-й день составила 78 ± 17 нмоль/мин/мл у пациентов с тяжелым сепсисом и $3,5 \pm 2$ нмоль/мин/мл у лиц контрольной группы. При этом активность фермента оставалась высокой у пациентов с летальным исходом, тогда как у выживших лиц она

уменьшалась ($p = 0,01$). Не было установлено корреляций между уровнем sPLA-2IIA и тромбоксаном B2, IL-1 β , IL-6, TNF α ни для начальных, ни для пиковых величин [95].

2.6. Роль sPLA2 при вирусных инфекциях

2.6.1. Диагностическая значимость sPLA2-IIA при вирусных инфекциях

Установлено, что уровень и активность PLA2 сильно возрастают при инфекциях, вызванных вирусами денге (DENV), коронавирусом SARS-CoV-2, что может быть использовано для диагностики и прогнозирования тяжести и исхода заболевания у пациентов [18, 96].

2.6.1.1. Геморрагическая лихорадка денге (DHF)

Известно, что PAF усиливает проницаемость сосудов при острой DHF [97]. PLA2 образует и регулирует PAF [21]. Jeewandara C. и соавт. изучили активности sPLA2, PAF и их зависимости от тяжести течения геморрагической формы (DHF) и лихорадки денге (DF) у, соответственно, 13 и 30 взрослых пациентов в течение первых 5 сут. заболевания. Ученые установили, что активность sPLA2 была выше у пациентов с DHF (3-5 мкмоль/мин/мл), чем у пациентов с DF и коррелировала с уровнями PAF и степенью вирусемии у пациентов с DHF [96].

2.6.1.2. Коронавирус SARS-CoV-2

sPLA2-IIA усугубляет повреждение тканей и органов всего организма [27, 98, 99]. Это может способствовать тяжести и летальному исходу от COVID-19 инфекции [18]. Действительно, результаты исследований [100, 101] показали, что при тяжелом течении COVID-19 инфекции на-

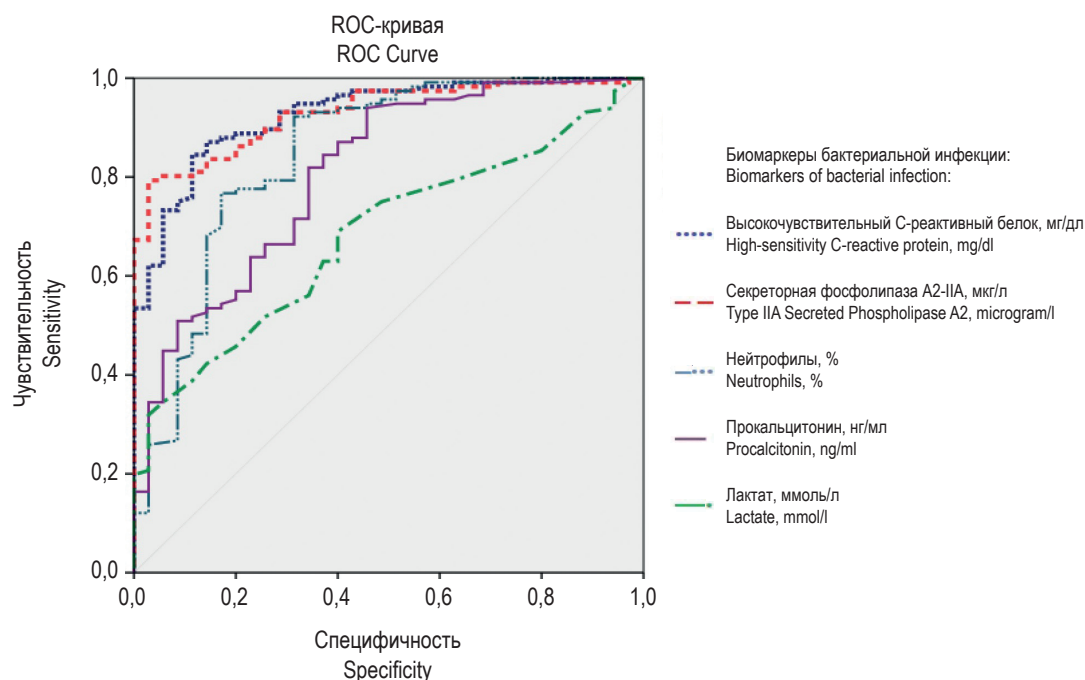


Рисунок 8. Площадь под кривой 5 биомаркеров для дифференциальной диагностики бактериальной инфекции

Примечание. hsCRP – высокочувствительный С-реактивный белок, sPLA2-IIA – секреторная фосфолипаза 2-IIA, N% – процентное соотношение нейтрофилов, PCT – прокальцитонин [94].

Figure 8. Area under the curve of 5 biomarkers for the differential diagnosis of bacterial infection

Note. hsCRP, highly sensitive C-reactive protein; sPLA2-IIA, secretory phospholipase 2-IIA; N%, percentage of neutrophils; PCT, procalcitonin [94].

блюдается снижение уровней фосфолипидов в плазме и увеличивается уровень лизофосфолипидов (лизо-PL), ацилкарнитинов и неэстерифицированных ненасыщенных жирных кислот. Эти изменения липидного профиля указывают на повышение активности sPLA2, лизирующей

фосфолипиды мембран при COVID-19 инфекции [18]. При этом повышенные уровни фосфатидилхолина 16:1_22:6 (AUC = 0,97) и фосфатидилэтаноламина 18:1_20:4 (AUC = 0,94), АК (AUC = 0,99) и олеиновой кислоты (AUC = 0,98) у 103 пациентов с COVID-19 инфекцией корре-

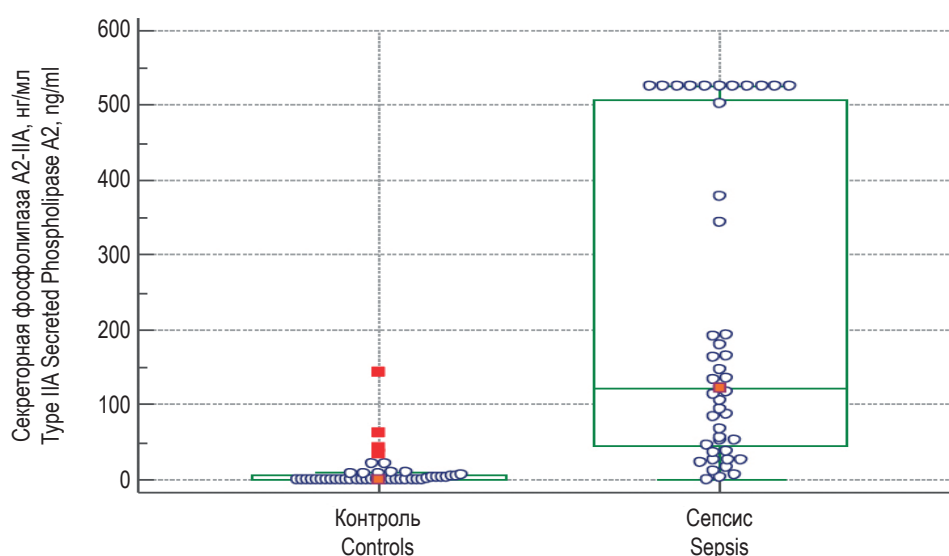


Рисунок 9. Уровни секреторной фосфолипазы А2-IIА у пациентов с сепсисом и контрольной группы [15]

Figure 9. Levels of secretory phospholipase A2-IIA in patients with sepsis and controls [15]

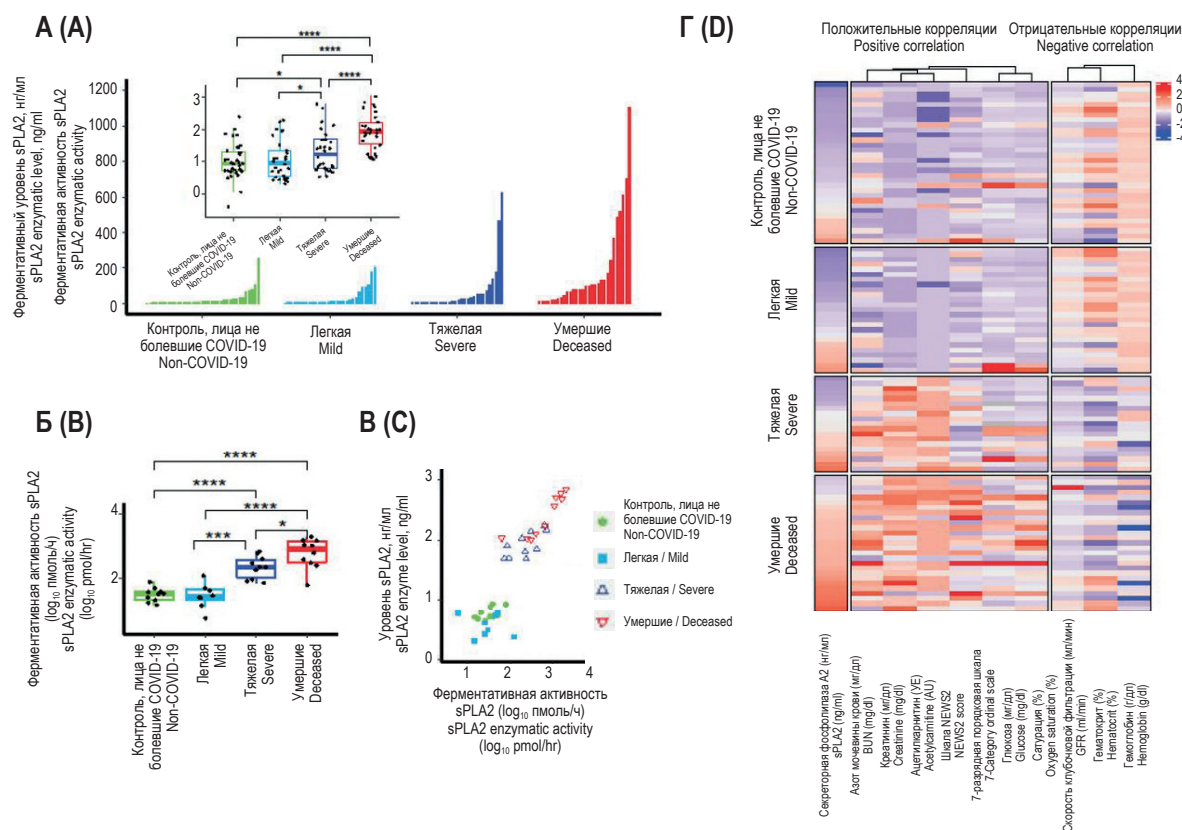


Рисунок 10. Уровень и активность sPLA2-IIA в зависимости от степени тяжести COVID-19 инфекции [18]

Примечание. sPLA2 enzyme level – уровень sPLA2 (нг/мл), sPLA2 enzymatic activity – ферментативная активность sPLA2, Non-COVID-19 – контроль, лица не болеющие COVID-19, Mild – легкая, Severe – тяжелая, Deceased – умершие, Positive correlation – положительные корреляции, negative correlation – отрицательные корреляции, BUN – азот мочевины крови, Creatinine – креатинин, Acetylcarnitine – ацетилкарнитин, NEWS2 score – шкала NEWS2, 7-category ordinal scale – 7-разрядная порядковая шкала, Glucose – глюкоза, Oxygen saturation – сатурация кислородом, GFR – скорость клубочковой фильтрации, Hematocrit – гематокрит, Hemoglobin – гемоглобин.

Figure 10. Level and activity of sPLA2-IIA depending on the severity of COVID-19 infection [18]

Note. BUN, Blood Urea Nitrogen; GFR, glomerular filtration rate.

лируют с тяжестью заболевания. Наблюдается нарушение биосинтеза тирозина, фенилаланина, триптофана и аминокислот-тРНК [102]. Также высокие уровни sPLA2-IIA в плазме крови коррелируют с ее активностью ($r^2 = 0,84$, $p = 1,2 \times 10^{-13}$) и тяжестью COVID-19 инфекции у 127 пациентов. В группе умерших от COVID-19 пациентов уровни sPLA2-IIA могли достигать 1020 нг/мл и были выше (89,3 нг/мл), чем у лиц с тяжелым (17,9 нг/мл), легким (9,3 нг/мл) течением заболевания и без коронавирусной инфекции (8,9 нг/мл) (рис. 10) [18].

Также с помощью модели регрессионного анализа sPLA2-IIA и азот мочевины (BUN) при пороговых значениях 10 нг/мл и 16 мг/дл соответственно определены в качестве основных клинических параметров прогнозирования смертности от COVID-19 инфекции с высокой точностью (площадь под кривой 0,93–1,0) и чувствительностью 75,4% [18]. В другом исследовании уровень sPLA2 был повышен (269±137,3 нг/мл,

$p = 0,01$) в плазме крови у 14 детей с тяжелой формой COVID-19 инфекции по сравнению с бессимптомным (2 ± 3 нг/мл) и легким течением (23 нг/мл). При этом уровень sPLA2 был увеличен ($p = 0,04$) у пациентов в острой фазе заболевания (540 ± 510 нг/мл) по сравнению с периодом выздоровления (2 ± 1 нг/мл). Не было установлено корреляций между sPLA2 и уровнями CRP, D-димера и количеством лейкоцитов [39]. Вместе с тем установлены положительные корреляции уровня sPLA2-IIA с показателями NEWS2, уровнем глюкозы и отрицательные с креатинином, мочевиной, скоростью клубочковой фильтрации, гематокритом, сатурацией гемоглобина, что также подтверждает зависимость sPLA2-IIA от тяжести COVID-19 инфекции [103, 104].

2.6.2. Вирусидная активность sPLA2-IIA

sPLA2-IIA проявляет сильную противовирусную активность в отношении вирусов денге (DENV), гепатита С (HCV), иммунодефицита человека (HIV-1), японского энцефалита (JEV),

ТАБЛИЦА 2. ВИРУЦИДНАЯ АКТИВНОСТЬ sPLA2 ПРОТИВ РАЗНЫХ ВИРУСОВ [17]

TABLE 2. VIRUCIDAL ACTIVITY OF sPLA2 AGAINST VARIOUS VIRUSES [17]

Вирус Viruses	Семейство Family	Место образования вируса Location of the virus	ИК50, нг/мл IC50, ng/ml
HCV	Flaviviridae	ER	0,036±0,004
DENV	Flaviviridae	ER	0,31±0,07
JEV	Flaviviridae	ER	1,34±0,21
MERS-CoV	Coronaviridae	ERGIC	10000
SINV	Togaviridae	PM	> 10000
FLUAV	Orthomyxoviridae	PM	> 10000
SeV	Paramyxoviridae	PM	> 10000
VSNJV	Rhabdoviridae	PM	2300±1333
HIV1	Retroviridae	PM	5,4
HSV-1	Herpesviridae	TGN	> 10000
EMCV	Picornaviridae	Без оболочки	> 10000
CV-B3	Picornaviridae	Без оболочки	> 10000

Примечание. HCV – вирус гепатита С, DENV – вирус денге, JEV – вирус японского энцефалита, MERS-CoV – коронавирус ближневосточного респираторного синдрома, SINV – вирус Синдбис, FLUAV – вирус гриппа А, SeV – вирус Сендай, VSNJV – вирус везикулярного стоматита Нью-Джерси, HIV1 – вирус иммунодефицита человека, HSV-1 – вирус простого герпеса типа 1, EMCV – вирус энцефаломиокардита, CV-B3 – вирус Коксаки В3, ER – эндоплазматический ретикулум, PM – плазматическая мембрана, TGN – сеть аппарата Гольджи, ERGIC – промежуточный компартмент сети везикул эндоплазматического ретикулума и аппарата Гольджи.

Note. HCV, hepatitis C virus; DENV, dengue virus; JEV, Japanese encephalitis virus; MERS-CoV, Middle East respiratory syndrome coronavirus; SINV, Sindbis virus; FLUAV, influenza A virus; SeV, Sendai virus; VSNJV, New Jersey vesicular stomatitis virus; HIV1, human immunodeficiency virus; HSV-1, herpes simplex virus type 1; EMCV, encephalomyocarditis virus; CV-B3, Coxsackie B3 virus; ER, endoplasmic reticulum; PM, plasma membrane; TGN, Golgi network; ERGIC, intermediate compartment networks of vesicles of the endoplasmic reticulum and the Golgi apparatus.

что может новой стать стратегией для разработки противовирусной терапии. Значения 50%-ных ингибирующих концентраций (IC50) sPLA2-ПИА против HCV, DENV и JEV составили соответственно 0,036 нг/мл (0,003 нМ), 0,31 нг/мл (0,023 нМ) и 1,34 нг/мл (0,10 нМ) (табл. 2). Также эффективным оказалось действие sPLA2-ПИА против HIV-1 со значением IC50 5,4 нг/мл [105, 106].

Напротив, sPLA2-ПИА оказывает очень слабую вируцидную активность против вирусов Синдбис, гриппа А, простого герпеса, Сендай, энцефаломиокардита, вируса Коксаки В3 и коронавируса MERS-CoV, для которых значения IC50 и превысили 10000 нг/мл [107, 108, 109, 110]. Предполагается, что такая селективность вирусолитической активности sPLA2-ПИА обусловлена наличием и липидным составом вирусной оболочки. У вирусов HCV, DENV и JEV белково-липидный каспид образуется в результате отпочковывания от цистерн эндоплазматического ретикулума (ER) клетки-хозяина. Тогда как капсиды вирусов гриппа А, Сендай, Синдбис, везикулярного стоматита Нью-Джерси и HSV-1 формируются при отпочковывании от плазматической мембраны и везикул комплекса Гольджи (для HSV-1), ли-

пидный состав которых отличается от ER [17]. Причиной низкой активности sPLA2-ПИА против VSNJV может быть пулевидная конфигурация капсида вируса, которая содержит краевые дефекты упаковки липидов. Очень низкая активность (IC50 > 10000 нг/мл) sPLA2-ПИА в отношении вирусов Коксаки В3 и энцефаломиокардита может быть связана с отсутствием у них внешней липидной оболочки [111]. Слабая вируцидная активность sPLA2-ПИА против коронавируса MERS-CoV может объясняться образованием его липидной оболочки из промежуточного компартмента сети везикул ER и аппарата Гольджи, имеющего схожий состав липидов с ER [112]. При этом могут образовываться два типа вирионов MERS-CoV: чувствительные к sPLA2-ПИА капсиды – из везикул ER, а устойчивые – отпочковываются из везикул аппарата Гольджи и плазматической мембраны [113].

2.6.3. Механизмы действия sPLA2 при вирусных заболеваниях

Считается, что сильная противовирусная активность sPLA2 обусловлена ее способностью лизировать глицерофосфолипиды вирусных кап-

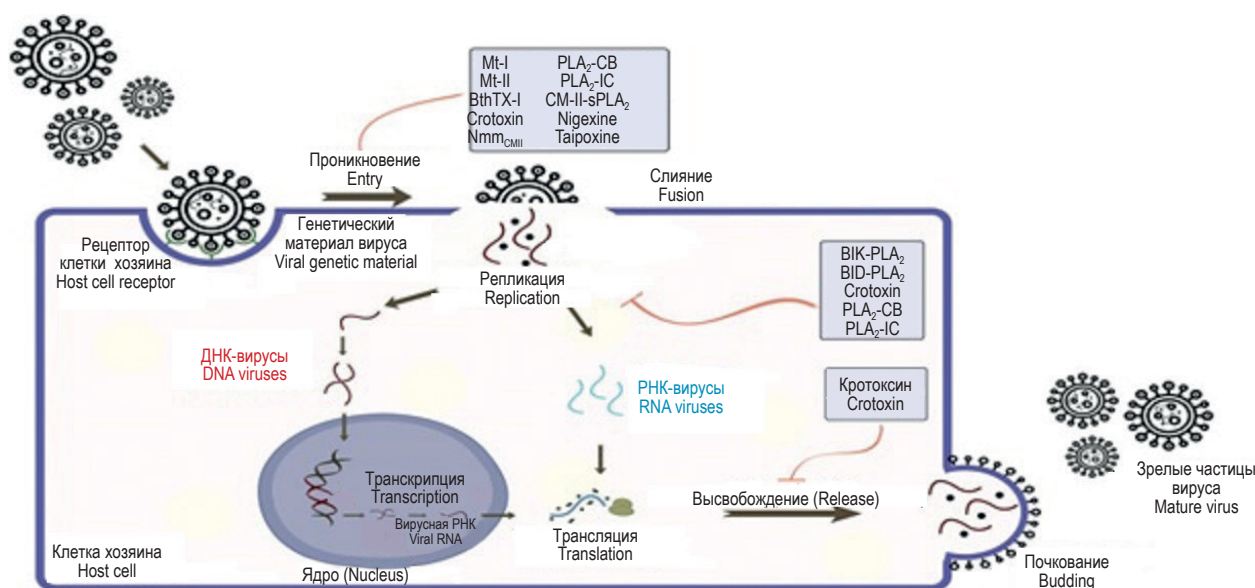


Рисунок 11. Механизм действия sPLA2 на вирусный репликативный цикл [18]

Figure 11. Mechanism of action of sPLA2 on the viral replication cycle [18]

сидов, приводя к инактивации и ингибированию репликации вирусов (рис. 11).

Напротив, 20-нм шипы коронавирусов, образованные S-гликопротеином, препятствуют взаимодействию sPLA2 с липидами оболочки [17]. С другой стороны, цитокины, высвобождаемые активируемыми нейтрофилами, макрофагами, эндотелиальными клетками повышают уровень sPLA2 в крови при вирусной инфекции. Повышенные уровни sPLA2 индуцируют дисфункцию эндотелиоцитов сосудов, например, при COVID-19 инфекции [114]. В свою очередь, инфицирование вирусом клеток вызывает их апоптоз, при котором наблюдается инверсия слоев плазмолеммы и появление на внешней мембране фосфатидилсерина (PS), являющегося мишенью для sPLA2. При гидролизе sPLA2 фосфолипидов мембраны образуются лизофосфолипиды и жирные кислоты, которые повреждают мембраны здоровых клеток. PS активирует протромбиназу, запуская процесс коагуляции (рис. 12) [39]. Этот механизм подтверждается клиническими данными по тромбообразованию и повышенными уровнями D-димера при COVID-19 инфекции [115].

Кроме того, степень тяжести COVID-19 инфекции положительно коррелирует с уровнем виремии и количеством апоптотических клеток, экспрессирующих PS. Следовательно, такие клетки будут разрушаться sPLA2, что еще больше увеличивает системное воспаление [116]. Ингибирование повреждения клеток, вызванного sPLA2, может рассматриваться как новый подход

против неконтролируемого воспаления и цитокинового шторма.

Заключение

Секреторные фосфолипазы A2 — это уникальное семейство липолитических ферментов, выполняющие разносторонние до конца не изученные функции и участвующие в патогенезе широкого спектра заболеваний. С одной стороны, sPLA2, гидролизуя фосфолипиды мембран, способствуют элиминации поврежденных, апоптотических клеток и оказывают сильное бактерицидное, вируцидное действие, в том числе против антибиотикорезистентных штаммов микроорганизмов. В этом плане использование sPLA2 может представлять новую стратегию терапии бактериальных и вирусных инфекций. С другой стороны, в результате действия sPLA2 на ее субстраты образуются биологически активные молекулы (арахидоновая, лизофосфатидная кислоты, лизофосфолипиды, жирные кислоты, простагландины, лейкотриены, тромбоксаны), которые оказывают сильное воспалительное, детергирующее, коагулирующее действие и повышают проницаемость сосудов. Такая провоспалительная роль sPLA2 обуславливает повышение ее уровней и активности при сердечно-сосудистых, дыхательных, аутоиммунных, метаболических, онкологических, бактериальных и вирусных заболеваниях. В этой связи, повышенные концентрация и активность sPLA2 могут использоваться в качестве биомаркера при диагностике и прогнозировании тяжести и исхода этих заболеваний

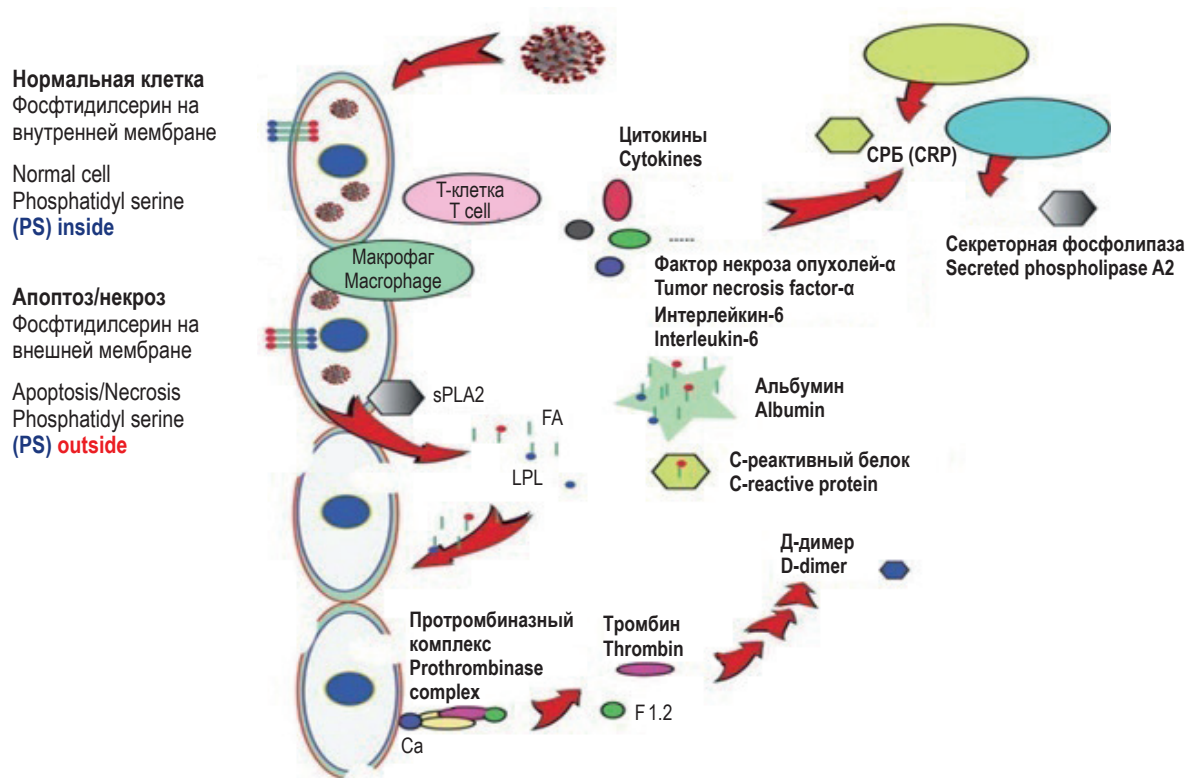


Рисунок 12. Инфламмосома COVID-19, связанная с секреторной фосфолипазой A2 (sPLA2) [39]

Примечание. Normal cell Phosphatidyl serine (PS) inside – в нормальной клетке фосфатидилсерин располагается на внутреннем листе мембраны, Apoptosis/Necrosis Phosphatidyl serine (PS) outside – при апоптозе и некрозе фосфатидилсерин появляется на внешней мембране, T cell – Т-лимфоцит, Macrophage – макрофаг, cytokines – цитокины, CRP – С-реактивный белок, IL-6 – интерлейкин-6, TNFα – фактор некроза опухоли-α, Albumin – альбумин, D-dimer – Д-димер, Thrombin – тромбин, LPL – плацентарная липопропротеин липаза, Prothrombinase complex – комплекс протромбиназы, Ca – кальций.

Figure 12. COVID-19 inflammasome associated with secretory phospholipase A2 (sPLA2) [39]

Note. CRP, C-reactive protein; LPL, Placental lipoprotein lipase; Tumor necrosis factor-α; IL-6, Interleukin-6; Ca, calcium.

у пациентов. Еще следует обратить внимание, что цитозольные формы PLA2 представляют собой внутриклеточный мессенджер, участвующий в MAPK/ERK, PI3K/AKT сигнальных каскадах, стимулирующих пролиферацию и выживаемость

в том числе раковых клеток. Необходимо проведение дальнейших исследований для установления точных механизмов и новых ролей sPLA2 в патогенезе освещенных в данном обзоре и новых заболеваний.

Список литературы / References

1. Adamo L., Rocha-Resende C., Prabhu S.D., Mann D.L. Reappraising the role of inflammation in heart failure. *Nat. Rev. Cardiol.*, 2020, Vol. 17, no. 5, pp. 269-285.
2. Adler D.H., Cogan J.D., Phillips J.A., Schnetz-Boutaud N., Milne G.L., Iverson T., Stein J.A., Brenner D.A., Morrow J.D., Boutaud O., Oates J.A. Inherited human cPLA2α deficiency is associated with impaired eicosanoid biosynthesis, small intestinal ulceration, and platelet dysfunction. *J. Clin. Invest.*, 2008, Vol. 118, no. 6, pp. 2121-2131.
3. Ahmad N.S., Tan T.L., Arifin K.T., Ngah W.Z.W., Yusof Y.A.M. High sPLA2-IIA level is associated with eicosanoid metabolism in patients with bacterial sepsis syndrome. *PLoS One*, 2020, Vol. 15, e0230285. doi: 10.1371/journal.pone.0230285.
4. Akinkuolie A.O., Lawler P.R., Chu A.Y., Caulfield M., Mu J., Ding B., Nyberg F., Glynn R.J., Ridker P.M., Hurt-Camejo E., Chasman D.I., Mora S. Group IIA Secretory Phospholipase A(2), Vascular Inflammation, and Incident Cardiovascular Disease. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 2019, Vol. 39, no. 6, pp. 1182-1190.
5. Astudillo A.M., Balboa M.A., Balsinde J. Selectivity of phospholipid hydrolysis by phospholipase A(2) enzymes in activated cells leading to polyunsaturated fatty acid mobilization. *Biochim. Biophys. Acta. Mol. Cell Biol. Lipids*, 2019, Vol. 1864, pp. 772-783.

6. Atsumi G., Murakami M., Tajima M., Shimbara S., Hara N., Kudo I. The perturbed membrane of cells undergoing apoptosis is susceptible to type II secretory phospholipase A2 to liberate arachidonic acid. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1997, Vol. 1349, no. 1, pp. 43-54.
7. Barabutis N., Verin A., Catravas J.D. Regulation of pulmonary endothelial barrier function by kinases. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.*, 2016, Vol. 311, pp. L832-L845.
8. Barberis E., Timo S., Amede E., Vanella V.V., Puricelli C., Cappellano G., Raineri D., Cittone M.G., Rizzi E., Pedrinelli A.R., Vassia V., Casciaro F.G., Priora S., Nerici I., Galbiati A., Hayden E., Falasca M., Vaschetto R., Sainaghi P.P., Dianzani U., Rolla R., Chiocchetti A., Baldanzi G., Marengo E., Manfredi M. Large-scale plasma analysis revealed new mechanisms and molecules associated with the host response to SARS-CoV-2. *Int. J. Mol. Sci.*, 2020, Vol. 21, no. 22, 8623. doi: 10.3390/ijms21228623.
9. Becker K.A., Fahsel B., Kemper H., Mayeres J., Li C., Wilker B., Keitsch S., Soddemann M., Sehl C., Kohnen M., Edwards M.J., Grassmé H., Caldwell C.C., Seitz A., Fraunholz M., Gulbins E. Staphylococcus aureus alpha-toxin disrupts endothelial-cell tight junctions via acid sphingomyelinase and ceramide. *Infect. Immun.*, 2018, Vol. 86, no. 1, e00606-17. doi: 10.1128/IAI.00606-17.
10. Berg E., Paukovits J., Axelband J., Trager J., Ryan D., Cichonski K., Kopnitsky M., Zweitzig D., Jeanmonod R. Measurement of a novel biomarker, secretory phospholipase A2 group IIA as a marker of sepsis: a pilot study. *J. Emerg. Trauma Shock.*, 2018, Vol. 11, no. 2, pp. 135-139.
11. Bobryshev Y.V., Crozier J.A., Lord R.S., Tran D., Jamal O.S., Parsson H.N., Scott K.F. Expression of secretory group II phospholipase A2 by CD1a positive cells-in human atherosclerotic plaques. *Atherosclerosis*, 1996, Vol. 127, pp. 283-285.
12. Boilard E., Lai Y., Larabee K., Balestrieri B., Ghomashchi F., Fujioka D., Gobeze R., Coblyn J.S., Weinblatt M.E., Massarotti E.M., Thornhill T.S., Divangahi M., Remold H., Lambeau G., Gelb M.H., Arm J.P., Lee D.M. A novel anti-inflammatory role for secretory phospholipase A2 in immune complex-mediated arthritis. *EMBO Mol. Med.*, 2010, Vol. 2, no. 5, pp. 172-187.
13. Boudreau L.H., Duchez A.-C., Cloutier N., Soulet D., Martin N., Bollinger J., Paré A., Rousseau M., Naika G.S., Lévesque T., Laflamme C., Marcoux G., Lambeau G., Farndale R.W., Pouliot M., Hamzeh-Cognasse H., Cognasse F., Garraud O., Nigrovic P.A., Guderley H., Lacroix S., Thibault L., Semple J.W., Gelb M.H., Boilard E. Platelets release mitochondria serving as substrate for bactericidal group IIA-secreted phospholipase A2 to promote inflammation. *Blood*, 2014, Vol. 124, no. 14, pp. 2173-2183.
14. Burke J.E., Dennis E.A. Phospholipase A2 structure/function, mechanism, and signaling. *J. Lipid Res.*, 2009, Vol. 50, pp. S237-S242.
15. Ceriello A. Hyperglycemia and the worse prognosis of COVID-19. Why a fast blood glucose control should be mandatory. *Diabetes Res. Clin. Pract.*, 2020, Vol. 163, 108186. doi: 10.1016/j.diabres.2020.108186.
16. Cervera I.P., Gabriel B.M., Peter Aldiss P., Morton N.M. The phospholipase A2 family's role in metabolic diseases: Focus on skeletal muscle. *Physiol. Rep.*, 2021, Vol. 9, no. 1, e14662. doi: 10.14814/phy2.14662.
17. Chen M., Aoki-Utsubo C., Kameoka M., Deng L., Terada Y., Kamitani W., Sato K., Koyanagi Y., Hijikata M., Shindo K., Noda T., Kohara M., Hotta H. Broad-spectrum antiviral agents: secreted phospholipase A2 targets viral envelope lipid bilayers derived from the endoplasmic reticulum membrane. *Sci. Rep.*, 2017, Vol. 7, 15931. doi: 10.1038/s41598-017-16130-w.
18. Chilton F. Would the real role(s) for secretory PLA2s please stand up. *J. Clin. Invest.*, 1996, Vol. 97, no. 10, pp. 2161-2162.
19. Claar D., Hartert T.V., Peebles Jr.R.S. The role of prostaglandins in allergic lung inflammation and asthma. *Expert Rev. Respir. Med.*, 2015, Vol. 9, no. 1, pp. 55-72.
20. de Luca D., Lopez-Rodriguez E., Minucci A., Vendittelli F., Gentile L., Stival E., Conti G., Piastra M., Antonelli M., Echaide M., Perez-Gil J., Capoluongo E.D. Clinical and biological role of secretory phospholipase A2 in acute respiratory distress syndrome infants. *Crit. Care.*, 2013, Vol. 17, no. 4, R163. doi: 10.1186/cc12842.
21. de Luca D., Capoluongo E., Rigo V., the Study group on Secretory Phospholipase in Paediatrics (SSPP). Secretory phospholipase A2 pathway in various types of lung injury in neonates and infants: a multicentre translational study. *BMC Pediatr.*, 2011, Vol. 11, 101. doi: 10.1186/1471-2431-11-101.
22. Deng M., Yin Y., Zhang Q., Zhou X., Yang T., Hou G., Wang C. Lipoprotein-associated phospholipase A2 predict exercise tolerance in COPD patients. *Front. Immunol.*, 2021, Vol. 12, 670971. doi: 10.3389/fimmu.2021.670971.
23. Dennis E.A., Norris P.C. Eicosanoid storm in infection and inflammation. *Nat. Rev. Immunol.*, 2015, Vol. 15, pp. 511-523.
24. Dore E., Boilard E. Roles of secreted phospholipase A(2) group IIA in inflammation and host defense. *Biochim. Biophys. Acta. Mol. Cell Biol. Lipids.*, 2019, Vol. 1864, no. 6, pp. 789-802.
25. Frasz Z., Tršan J., Banach M. On the present and future role of Lp-PLA2 in atherosclerosis-related cardiovascular risk prediction and management. *Arch. Med. Sci.*, 2020, Vol. 17, no. 4, pp. 954-964.
26. Granata F., Nardicchi V., Loffredo S., Frattini A., Staiano R.I., Agostini C., Triggiani M. Secreted phospholipases A2: a proinflammatory connection between macrophages and mast cells in the human lung. *Immunobiology*, 2009, Vol. 214, no. 9-10, pp. 811-821.

27. Gronroos J.O., Laine V.J.O., Nevalainen T.J. Bactericidal group IIA phospholipase A2 in serum of patients with bacterial infections. *J. Infect. Dis.*, 2002, Vol. 185, pp. 1767-1772.
28. Guidet B., Piot O., Masliah J., Barakett V., Maury E., Bereziat G., Offenstadt G. Secretory non-pancreatic phospholipase A2 in severe sepsis: relation to endotoxin, cytokines and thromboxane B2. *Infection*, 1996, Vol. 24, no. 2, pp. 103-108.
29. Guo Y., Li B., Xu X., Wu R., Li W. sPLA2-IIA Augments oxidized LDL-induced MCP-1 expression *in vitro* through activation of akt. *Cell. Physiol. Biochem.*, 2015, Vol. 37, pp. 1345-1354.
30. Hallstrand T.S., Lai Y., Ni Z., Oslund R.C., Henderson W.R. Jr., Gelb M.H., Wenzel S.E. Relationship between levels of secreted phospholipase A2 groups IIA and X in the airways and asthma severity. *Clin. Exp. Allergy.*, 2011, Vol. 41, no. 6, pp. 801-810.
31. Hamaya R., Mora S., Lawler P.R., Cook N.R., Ridker P.M., Buring J.E., Lee I.-M., Manson J.A.E., Tobias D.K. Association of plasma branched-chain amino acid with biomarkers of inflammation and lipid metabolism in women. *Circ. Genom. Precis. Med.*, 2021, Vol. 14, no. 4, e003330. doi: 10.1161/CIRCGEN.121.003330.
32. Hariyanto T.I., Kurniawan A. Anemia is associated with severe coronavirus disease 2019 (COVID-19) infection. *Transfus. Apher. Sci.*, 2020, Vol. 59, no. 6, 102926. doi: 10.1016/j.transci.2020.102926.
33. Hou S., Xu T., Xu J., Qu L., Xu Y., Chen L., Liu J. Structural basis for functional selectivity and ligand recognition revealed by crystal structures of human secreted phospholipase A2 group IIE. *Sci. Rep.*, 2017, Vol. 7, 10815. doi: 10.1038/s41598-017-11219-8.
34. Hurley B.P., McCormick B.A. Multiple roles of phospholipase A2 during lung infection and inflammation. *Infect. Immun.*, 2008, Vol. 76, pp. 2259-2272.
35. Insuela D.B.R., Ferrero M.R., de Sá Coutinho D., Martins M.A., Carvalho V.F. Could arachidonic acid-derived pro-resolving mediators be a new therapeutic strategy for asthma therapy? *Front. Immunol.*, 2020, Vol. 11, 580598. doi: 10.3389/fimmu.2020.580598.
36. Jeewandara C., Gomes L., Udari S., Paranaivitane S.A., Shyamali N.L.A., Ogg G.S., Malavige G.N. Secretory phospholipase A2 in the pathogenesis of acute dengue infection. *Immun. Inflamm. Dis.*, 2016, Vol. 5, no. 1, pp. 7-15.
37. Ki K.-I.H., Yokota Y., Ono T., Kamitani S., Arita H., Hanasaki K. Identification of a soluble form phospholipase A2 receptor as a circulating endogenous inhibitor for secretory phospholipase A2. *J. Biol. Chem.*, 2002, Vol. 277, pp. 13583-13588.
38. Kim J.-O., Chakrabarti B.K., Guha-Niyogi A., Louder M.K., Mascola J.R., Ganesh L., Nabel G.J. Lysis of human immunodeficiency virus type 1 by a specific secreted human phospholipase A2. *J. Virol.*, 2007, Vol. 81, pp. 1444-1450.
39. Kim R.R., Chen Z., Mann T.J., Bastard K., Scott K.F., Church W.B. Structural and functional aspects of targeting the secreted human group IIA phospholipase A2. *Molecules*, 2020, Vol. 25, no. 19, 4459. doi: 10.3390/molecules25194459.
40. Kitsioulis E., Antoniou G., Gotzou H., Karagiannopoulos M., Basagiannis D., Christoforidis S., Nakos G., Lekka M.E. Effect of azithromycin on the LPS-induced production and secretion of phospholipase A2 in lung cells. *Biochim. Biophys. Acta.*, 2015, Vol. 1852, pp. 1288-1297.
41. Koprivnjak T., Peschel A., Gelb M.H., Liang N.S., Weiss J.P. Role of charge properties of bacterial envelope in bactericidal action of human group IIA phospholipase A2 against *Staphylococcus aureus*. *J. Biol. Chem.*, 2002, Vol. 277, pp. 47636-47644.
42. Kuczia P., Mastalerz L., Potaczek D.P., Cybulska A., Zareba L., Bazan-Socha S., Undas A. Increased activity of lipoprotein-associated phospholipase A2 in non-severe asthma. *Allergol. Int.*, 2019, Vol. 68, no. 4, pp. 450-455.
43. Kuefner M.S., Pham K., Redd J.R., Stephenson E.J., Harvey I., Deng X., Bridges D., Boilard E., Elam M.B., Park E.A. Secretory phospholipase A(2) group IIA modulates insulin sensitivity and metabolism. *J. Lipid Res.*, 2017, Vol. 58, no. 9, pp. 1822-1833.
44. Kuhn R.J. *Togaviridae in fields virology*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2013, Vol. 1, pp. 747-794.
45. Kuypers F.A., Rostad C.A., Anderson E.J., Chahroudi A., Jaggi P., Wrammert J., Mantus G., Basu R., Harris F., Hanberry B., Camacho-Gonzalez A., Manoranjithan S., Vos M., Brown L.A., Morris C.R. Secretory phospholipase A2 in SARS-CoV-2 infection and multisystem inflammatory syndrome in children (MIS-C). *Exp. Biol. Med. (Maywood)*, 2021, Vol. 246, no. 23, pp. 2543-2552.
46. Laine V.J., Grass D.S., Nevalainen T.J. Protection by group II phospholipase A2 against *Staphylococcus aureus*. *J. Immunol.*, 1999, Vol. 162, pp. 7402-7408.
47. Lamb R.A., Parks G.D. *Paramyxoviridae in fields virology*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2013, Vol. 1, pp. 957-995.
48. Lee L.K., Bryant K.J., Bouveret R., Lei P.-W., Duff A.P., Harrop S.J., Huang E.P., Harvey R.P., Gelb M.H., Gray P.P., Curmi P.M., Cunningham A.M., Church W.B., Scott K.F. Selective inhibition of human group IIA-secreted phospholipase A2 (hGIIA) signaling reveals arachidonic acid metabolism is associated with colocalization of hGIIA to vimentin in rheumatoid synoviocytes. *J. Biol. Chem.*, 2013, Vol. 288, no. 21, pp. 15269-15279.
49. Letsiou E., Htwe Y.M., Dudek S.M. Secretory phospholipase A2 enzymes in acute lung injury. *Cell Biochem. Biophys.*, 2021, Vol. 79, pp. 609-617.

50. Li J., Zhou Z., Niu X., Li H. Lipoprotein-associated phospholipase A2 in cardiac disease: a potential early biomarker of unstable coronary artery disease. *Clin. Lab.*, 2020, Vol. 66, no. 5. doi: 10.7754/Clin.Lab.2019.190719.
51. Lin M.K., Farewell V., Vadas P., Bookman A.A., Keystone E.C., Pruzanski W. Secretory phospholipase A2 as an index of disease activity in rheumatoid arthritis. Prospective double blind study of 212 patients. *J. Rheumatol.*, 1996, Vol. 23, pp. 1162-1166.
52. Lindenbac B.D., Murray C.L., Thiel H.-J., Rice C.M. Flaviviridae in fields virology. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2013, Vol. 1, pp. 712-746.
53. Liu L., Bonventre J.V., Rittenhouse A.R. cPLA2 α -/- sympathetic neurons exhibit increased membrane excitability and loss of N-Type Ca²⁺ current inhibition by M1 muscarinic receptor signaling. *PLoS One*, 2018, Vol. 13, no. 12, e0201322. doi: 10.1371/journal.pone.0201322.
54. Liu R., Chen Y., Fu W., Wang S., Cui Y., Zhao X., Lei Z.N., Hettinghouse A., Liu J., Wang C., Zhang C., Bi Y., Xiao G., Chen Z.S., Liu C.J. Fexofenadine inhibits TNF signaling through targeting to cytosolic phospholipase A2 and is therapeutic against inflammatory arthritis. *Ann Rheum. Dis.*, 2019, Vol. 78, no. 11, pp. 1524-1535.
55. Loffredo S., Borriello F., Iannone R., Ferrara A.L., Galdiero M.R., Gigantino V., Esposito P., Varricchi G., Lambeau G., Cassatella M.A., Granata F., Marone G. Group V Secreted phospholipase A 2 induces the release of proangiogenic and antiangiogenic factors by human neutrophils. *Front. Immunol.*, 2017, Vol. 8, 443. doi: 10.3389/fimmu.2017.00443.
56. Lyles D.S., Kuzmin I.V., Rupprecht C.E. Rhabdoviridae in fields virology. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2013, Vol. 1, pp. 885-922.
57. Malavige G.N., Wijewickrama A., Fernando S., Jeewandara C., Gineliya A., Samarasekara S., Madushanka P., Punchihewa C., Paranavitane S., Idampitiya D., Wanigatunga C., Dissanayake H., Prathapan S., Gomes L., Aman S.A.B., John A.S., Ogg G.S. A preliminary study on efficacy of rupatadine for the treatment of acute dengue infection. *Sci. Rep.*, 2018, Vol. 8, 3857. doi: 10.1038/s41598-018-22285-x.
58. Masters P.S., Perlman S. Coronaviridae in fields virology. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2013, Vol. 1, pp. 825-858.
59. Masuda S., Murakami M., Komiyama K., Ishihara M., Ishikawa Y., Ishii T., Kudo I. Various secretory phospholipase A2 enzymes are expressed in rheumatoid arthritis and augment prostaglandin production in cultured synovial cells. *FEBS J.*, 2005, Vol. 272, no. 3, pp. 655-672.
60. McGranaghan P., Kirwan J.A., Garcia-Rivera M.A., Pieske B., Edelmann F., Blaschke F., Appunni S., Saxena A., Rubens M., Emir Veledar E., Trippel T.D. Lipid metabolite biomarkers in cardiovascular disease: discovery and biomechanism translation from human studies. *Metabolites*, 2021, Vol. 11, no. 9, 621. doi: 10.3390/metabo11090621.
61. Meliton A.Y., Munoz N.M., Meliton L.N., Birukova A.A., Leff A.R., Birukov K.G. Mechanical induction of group V phospholipase A(2) causes lung inflammation and acute lung injury. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.*, 2013, Vol. 304, pp. L689-L700.
62. Mouchlis V.D., Dennis E.A. Phospholipase A(2) catalysis and lipid mediator lipidomics. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Biol. Lipids*, 2019, Vol. 1864, pp. 766-771.
63. Mover E., Wu Y., Lambeau G., Kahn F., Touqui L., Areschoug T. Secreted group IIA phospholipase A2 protects humans against the group B Streptococcus: experimental and clinical evidence. *J. Infect. Dis.*, 2013, Vol. 208, pp. 2025-2035.
64. Mover E., Wu Y., Lambeau G., Touqui L., Areschoug T. A novel bacterial resistance mechanism against human group IIA-secreted phospholipase A2: role of Streptococcus pyogenes sortase A. *J. Immunol.*, 2011, Vol. 187, pp. 6437-6446.
65. Munoz N.M., Desai A., Meliton L. N., Meliton A.Y., Zhou T., Leff A.R., Dudek S.M. Group V phospholipase A(2) increases pulmonary endothelial permeability through direct hydrolysis of the cell membrane. *Pulm. Circ.*, 2012, Vol. 2, pp. 182-192.
66. Murakami M., Nakatani Y., Atsumi G.I., Inoue K., Kudo I. Regulatory functions of phospholipase A2. *Crit. Rev. Immunol.*, 2017, Vol. 37, no. 2-6, pp. 127-195.
67. Murakami M., Yamamoto K., Miki Y., Murase R., Sato H., Taketomi Y. The roles of the secreted phospholipase A2 gene family in immunology. *Adv. Immunol.*, 2016, Vol. 132, pp. 91-134.
68. Murakami M. Novel functions of phospholipase A(2)s: overview. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Biol. Lipids.*, 2019, Vol. 1864, pp. 763-765.
69. Murakami M., Sato H., Taketomi Y. Updating phospholipase A(2) biology. *Biomolecules*, 2020, Vol. 10, no. 10, 1457. doi: 10.3390/biom10101457.
70. Murakami M., Sato H., Miki Y., Yamamoto K., Taketomi Y. A new era of secreted phospholipase A(2). *J. Lipid. Res.*, 2015, Vol. 56, pp. 1248-1261.
71. Murakami M., Taketomi Y., Miki Y., Sato H., Yamamoto K., Lambeau G. Emerging roles of secreted phospholipase A2 enzymes: the 3rd edition. *Biochimie*, 2014, Vol. 107, Pt A, pp. 105-113.
72. Neidlinger N.A., Larkin S.K., Bhagat A., Victorino G.P., Kuypers F.A. Hydrolysis of phosphatidylserine-exposing red blood cells by secretory phospholipase A2 generates lysophosphatidic acid and results in vascular dysfunction. *J. Biol. Chem.*, 2006, Vol. 281, pp. 775-781.

73. Nolin J.D., Murphy R.C., Gelb M.H., Altemeier W.A., Henderson Jr. W.R., Hallstrand T.S. Function of secreted phospholipase A(2) group-X in asthma and allergic disease. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Biol. Lipids.*, 2019, Vol. 1864, pp. 827-837.
74. Ohta S., Imamura M., Xing W., Boyce J.A., Balestrieri B. Group V secretory phospholipase A2 is involved in macrophage activation and is sufficient for macrophage effector functions in allergic pulmonary inflammation. *J. Immunol.*, 2013, Vol. 190, no. 12, pp. 5927-5938.
75. Okita Y., Shiono T., Yahagi A., Hamada S., Umemura M., Matsuzaki G. Interleukin-22-induced antimicrobial phospholipase A2 group IIA mediates protective innate immunity of nonhematopoietic cells against *Listeria monocytogenes*. *Infect. Immun.*, 2016, Vol. 84, pp. 573-579.
76. Orenstein J.M., Banach B., Baker S.C. Morphogenesis of coronavirus HCoV-NL63 in cell culture: a transmission electron microscopic study. *Open. Infect. Dis. J.*, 2008, Vol. 2, pp. 52-58.
77. Paganelli F.L., Leavis H.L., He S., van Sorge N.M., Payré C., Lambeau G., Willems R.J.L., Rooijackers S.H.M. Group IIA-secreted phospholipase A2 in human serum kills commensal but not clinical enterococcus faecium isolates. *Infect. Immun.*, 2018, Vol. 86, no. 8, e00180-18. doi: 10.1128/IAI.00180-18.
78. Papadopoulos S., Kazepidou E., Antonelou M.H., Leonaritis G., Tsapinou A., Koulouras V.P., Avgeropoulos A., Nakos G., Lekka M.E. Secretory phospholipase A(2)-IIA protein and mRNA pools in extracellular vesicles of bronchoalveolar lavage fluid from patients with early acute respiratory distress syndrome: a new perception in the dissemination of inflammation? *Pharmaceuticals*, 2020, Vol. 13, no. 11, 415. doi: 10.3390/ph13110415.
79. Pellett P.E., Roizman B. Herpesviridae in fields virology. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2013, Vol. 2, pp. 1802-1822.
80. Pernet E., Guillemot L., Burgel P.-R., Martin C., Lambeau G., Sermet-Gaudelus I., Sands D., Leduc D., Morand P.C., Jeammet L., Chignard M., Wu Y., Touqui L. *Pseudomonas aeruginosa* eradicates *Staphylococcus aureus* by manipulating the host immunity. *Nat. Commun.*, 2014, Vol. 5, 5105. doi: 10.1038/ncomms6105.
81. Piris-Gimenez A., Miguel Paya M., Lambeau G., Chignard M., Mock M., Touqui L., Goossenset P.L. *In vivo* protective role of human group IIA phospholipase A2 against experimental anthrax. *J. Immunol.*, 2005, Vol. 175, pp. 6786-6791.
82. Pniewska E., Pawliczak R. The involvement of phospholipases A2 in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Mediators Inflamm.*, 2013, Vol. 2013, 793505. doi: 10.1155/2013/793505.
83. Qu X.D., Lehrer R.I. Secretory phospholipase A2 is the principal bactericide for staphylococci and other gram-positive bacteria in human tears. *Infect Immun.*, 1998, Vol. 66, no. 6, pp. 2791-2797.
84. Racaniello V.R. Picornaviridae in fields virology. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2013, Vol. 1, pp. 453-489.
85. Raymond B., Leduc D., Ravoux L., le Goffic R., Candela T., Raymondjean M., Goossens P.L., Touqui L. Edema toxin impairs anthracidal phospholipase A2 expression by alveolar macrophages. *PLoS Pathog.*, 2007, Vol. 3, no. 12, e187. doi: 10.1371/journal.ppat.0030187.
86. Razvi S., Quittell L., Sewall A., Quinton H., Marshall B., Saiman L. Respiratory microbiology of patients with cystic fibrosis in the United States, 1995 to 2005. *Chest*, 2009, Vol. 136, no. 6, pp. 1554-1560.
87. Richardson S., Hirsch J.S., Narasimhan M., Crawford J.M., McGinn T., Davidson K.W., The Northwell COVID-19 Research Consortium, Barnaby D.P., Becker L.B., Chelico J.D., Cohen S.L., Cookingham J., Coppa K., Diefenbach M.A., Dominello A.J., Duer-Hefele J., Falzon L., Gitlin J., Hajizadeh N., Harvin T.G., Hirschwerk D.A., Kim E.J., Kozel Z.M., Marrast L.M., Mogavero J.N., Osorio G.A., Qiu M., Zanos T.P. Presenting characteristics, comorbidities, and outcomes among 5700 patients hospitalized with COVID-19 in the New York city area. *JAMA*, 2020, Vol. 323, pp. 2052-2059.
88. Roh J.S., Sohn D.H. Damage-associated molecular patterns in inflammatory diseases. *Immune Netw.*, 2018, Vol. 18, no. 4, e27. doi: 10.4110/in.2018.18.e27.
89. Rosenson R.S., Hurt-Camejo E. Phospholipase A2 enzymes and the risk of atherosclerosis. *Eur. Heart J.*, 2012, Vol. 33, pp. 2899-2909.
90. Samuchiwal S.K., Balestrieri B. Harmful and protective roles of group V phospholipase A(2): Current perspectives and future directions. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Biol. Lipids.*, 2019, Vol. 1864, pp. 819-826.
91. Sapirstein A., Bonventre J.V. Phospholipases A2 in ischemic and toxic brain injury. *Neurochem. Res.*, 2000, Vol. 25, no. 5, pp. 745-753.
92. Sato H., Taketomi Y., Murakami M. Metabolic regulation by secreted phospholipase A2. *Inflamm. Regener.*, 2016, Vol. 36, 7. doi:10.1186/s41232-016-0012-7.
93. Sedlák V., Čáp P., Kačer P., Vlčková Š. Imbalance of anti-inflammatory (resolving D1) and pro-inflammatory (leukotrien B4) arachidonic acid products in exhaled breath condensate of severe refractory asthma. *Eur. Respir. J.* 2017, Vol. 50, PA1134. doi: 10.1183/1393003.congress-2017.PA1134.
94. Seeds M.C., Peachman K.K., Bowton D.L., Sivertson K.L., Chilton F.H. Regulation of arachidonate remodeling enzymes impacts eosinophil survival during allergic asthma. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, 2009, Vol. 41, no. 3, pp. 358-366.

95. Shen B., Yi X., Sun Y., Bi X., Du J., Zhang C., Quan S., Zhang F., Sun R., Qian L., Ge W., Liu W., Liang S., Chen H., Zhang Y., Li J., Xu J., He Z., Chen B., Wang J., Yan H., Zheng Y., Wang D., Zhu J., Kong Z., Kang Z., Liang X., Ding X., Ruan G., Xiang N., Cai X., Gao H., Li L., Li S., Xiao Q., Lu T., Zhu Y., Liu H., Chen H., Guo T. Proteomic and metabolomic characterization of COVID-19 patient sera. *Cell*, 2020, Vol. 182, no.1, pp. 59-72.
96. Silliman C.C., Moore E.E., Zallen G., Gonzalez R., Johnson J.L., Elzi D.J., Meng X., Hanasaki K., Ishizaki J., Arita H., Ao L., England K.M., Banerjee A. Presence of the M-type sPLA(2) receptor on neutrophils and its role in elastase release and adhesion. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, 2002, Vol. 283, pp. C1102-C1113.
97. Snider J.M., You J.K., Wang X., Snider A.J., Hallmark B., Zec M.M., Seeds M.C., Sergeant S., Johnstone L., Wang Q., Sprissler R., Carr T.F., Lutrick K., Parthasarathy S., Bime C., Zhang H.H., Luberto C.L., Kew R.R., Hannun Y.A., Guerra S., McCall C.A., Yao G., del Poeta M., Chilton F.H. Group IIA secreted phospholipase A2 is associated with the pathobiology leading to COVID-19 mortality. *J. Clin. Invest.*, 2021, Vol. 131, no. 19, e149236. doi: 10.1172/JCI149236.
98. Sommerfelt R.M., Feuerherm A.J., Skuland T., Johansen B. Cytosolic phospholipase A2 modulates TLR2 signaling in synoviocytes. *PLoS One*, 2015, Vol. 10, no. 4, e0119088. doi: 10.1371/journal.pone.0119088.
99. Stafforini D.M., Numao T., Tsodikov A., Vaitkus D., Fukuda T., Watanabe N., Fueki N., McIntyre T.M., Zimmerman G.A., Makino S., Prescott S.M. Deficiency of platelet-activating factor acetylhydrolase is a severity factor for asthma. *J. Clin. Invest.*, 1999, Vol. 103, no. 7, pp. 989-997.
100. Sun C.Q., Zhong C.Y., Sun W.W., Xiao H., Zhu P., Lin Y.-Z., Zhang C.-L., Gao H., Song Z.-Y. Elevated type II secretory phospholipase A2 increases the risk of early atherosclerosis in patients with newly diagnosed metabolic syndrome. *Sci. Rep.*, 2016, Vol. 6, 34929. doi: 10.1038/srep34929.
101. Takada Y., Fujita M. Secreted phospholipase A2 type IIA (sPLA2-IIA) activates integrins in an allosteric manner. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 2017, Vol. 925, pp. 103-115.
102. Tan S.T., Ramesh T., Toh X.R., Nguyen L.N. Emerging roles of lysophospholipids in health and disease. *Prog. Lipid. Res.*, 2020, Vol. 80, 101068. doi: 10.1016/j.plipres.2020.101068.
103. Tan T.L., Kang C.W.-L., Ooi K.S., Tan S.T., Ahmad N.S., Nasuruddin D.N., Ithnin A., Arifin K.T., Heng L.Y., Hassan N.I., Gan K.B., Neoh H.-M. Comparison of sPLA2IIA performance with high-sensitive CRP neutrophil percentage PCT and lactate to identify bacterial infection. *Sci. Rep.*, 2021, Vol. 11, no. 1, 11369. doi: 10.1038/s41598-021-90894-0.
104. Tanaseanu C., Tudor S., Tamsulea I., Marta D., Manea G., Moldoveanu E. Vascular endothelial growth factor, lipoprotein-associated phospholipase A2, sP-selectin and antiphospholipid antibodies, biological markers with prognostic value in pulmonary hypertension associated with chronic obstructive pulmonary disease and systemic lupus erythematosus. *Eur. J. Med. Res.*, 2007, Vol. 12, no. 4, pp. 145-151.
105. Thompson B.T., Chambers R.C., Liu K.D. Acute respiratory distress syndrome. *N. Engl. J. Med.*, 2017, Vol. 377, pp. 562-572.
106. Triggiani M., Giannattasio G., Calabrese C., Loffredo S., Granata F., Fiorello A., Santini M., Gelb M.H., Marone G. Lung mast cells are a source of secreted phospholipases A2. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2009, Vol. 124, no. 3, pp. 558-565.e3.
107. van Hensbergen V.P., Mover E., de Maat V., Lüchtenborg C., le Breton Y., Lambeau G., Payré C., Henningham A., Nizet V., van Strijp J.A.G., Brügger B., Carlsson F., McIver K.S., van Sorge N.M. Streptococcal Lancefield polysaccharides are critical cell wall determinants for human Group IIA secreted phospholipase A2 to exert its bactericidal effects. *PLoS Pathog.*, 2018, Vol. 14, no. 10, e1007348. doi: 10.1371/journal.ppat.1007348.
108. van Hensbergen V.P., Wu Y., van Sorge N.M., Touqui L. Type IIA secreted phospholipase A2 in host defense against bacterial infections. *Trends Immunol.*, 2020, Vol. 41, no. 4, pp. 313-326.
109. Varga Z., Flammer A.J., Steiger P., Haberecker M., Andermatt R., Zinkernagel A.S., Mehra M.R., Schuepbach R.A., Ruschitzka F., Moch H. Endothelial cell infection and endotheliitis in COVID-19. *Lancet*, 2020, Vol. 395, pp. 1417-1418.
110. Vecchi L., Araújo T.G., de Vasconcelos Azevedo F.v.P., Soares Mota S.T., Rodrigues Ávila V.d.M., Ribeiro M.A., Goulart L.R. Phospholipase A 2 drives tumorigenesis and cancer aggressiveness through its interaction with annexin A1. *Cells*, 2021, Vol. 10, no. 6, 1472. doi: 10.3390/cells10061472.
111. Wang Y., Xu J., Meng Y., Adcock I.M., Yao X. Role of inflammatory cells in airway remodeling in COPD. *Int. J. Chron. Obstruct. Pulmon. Dis.*, 2018, Vol. 13, pp. 3341-3348.
112. Wang Y., Wang H., Zhang C., Zhang C., Yang H., Gao R., Tong Z. Lung fluid biomarkers for acute respiratory distress syndrome: a systematic review and meta-analysis. *Crit. Care.*, 2019, Vol. 23, 43. doi: 10.1186/s13054-019-2336-6.
113. Weinrauch Y., Abad C., Liang N.S., Lowry S.F., Weiss J. Mobilization of potent plasma bactericidal activity during systemic bacterial challenge. Role of group IIA phospholipase A2. *J. Clin. Invest.*, 1998, Vol. 102, pp. 633-638.
114. Weiss J.P. Molecular determinants of bacterial sensitivity and resistance to mammalian Group IIA phospholipase A2. *Biochim. Biophys. Acta*, 2015, Vol. 1848, pp. 3072-3077.

115. Wu D., Shu T., Yang X., Song J.X., Zhang M., Yao C., Liu W., Huang M., Yu Y., Yang Q., Zhu T., Xu J., Mu J., Wang Y., Wang H., Tang T., Ren Y., Wu Y., Lin S.H., Qiu Y., Zhang D.Y., Shang Y., Zhou X. Plasma metabolomic and lipidomic alterations associated with COVID-19. *Natl Sci. Rev.*, 2020, Vol. 7, no. 7, pp. 1157-1168.

116. Zhang H., Gao Y., Wu D., Zhang D. The relationship of lipoprotein-associated phospholipase A2 activity with the seriousness of coronary artery disease. *BMC Cardiovasc. Disord.*, 2020, Vol. 20, no. 1, 295. doi: 10.1186/s12872-020-01580-4.

Авторы:

Уразов С.П. — врач-кардиолог СПб ГБУЗ «Городская больница № 40 Курортного административного района», г. Сестрорецк, Санкт-Петербург, Россия

Чернов А.Н. — научный сотрудник отдела общей патологии и патологической физиологии ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

Черкас А.В. — инженер-исследователь, лаборатория «Промышленные системы потоковой обработки данных» Центра компетенций Национальной технологической инициативы по направлению «Новые производственные технологии» ФГАОУ ВО «Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого», Санкт-Петербург, Россия

Бойков А.В. — ведущий инженер, инженер-исследователь, лаборатория «Промышленные системы потоковой обработки данных» лаборатория «Промышленные системы потоковой обработки данных» Центра компетенций Национальной технологической инициативы по направлению «Новые производственные технологии» ФГАОУ ВО «Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого», Санкт-Петербург, Россия

Глотов О.С. — к.б.н., заведующий отделом вирусологических и молекулярно-генетических методов диагностики, Детский научно-клинический центр инфекционных болезней Федерального медико-биологического агентства, Санкт-Петербург, Россия

Апалько С.В. — к.б.н., заведующий лабораторией молекулярной диагностики и аналитических методов, начальник НИЛ трансляционной биомедицины СПб ГБУЗ «Городская больница № 40 Курортного административного района», г. Сестрорецк, Санкт-Петербург, Россия

Сушенцева Н.Н. — биолог СПб ГБУЗ «Городская больница № 40 Курортного административного района», г. Сестрорецк, Санкт-Петербург, Россия

Полковникова И.А. — биолог СПб ГБУЗ «Городская больница № 40 Курортного административного района», г. Сестрорецк, Санкт-Петербург, Россия

Смирнов В.В. — к.м.н., заведующий клинико-диагностической лабораторией СПб ГБУЗ «Городская больница № 40 Курортного административного района», г. Сестрорецк, Санкт-Петербург, Россия

Шербак С.Г. — д.м.н., профессор, главный врач СПб ГБУЗ «Городская больница № 40 Курортного административного района», г. Сестрорецк; заведующий кафедрой последипломного медицинского образования ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет», Санкт-Петербург, Россия

Authors:

Urazov S.P., Cardiologist, Municipal City Hospital No. 40 of the Kurort Region, Sestroretsk, St. Petersburg, Russian Federation

Chernov A.N., Research Associate, Department of General Pathology and Pathological Physiology, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

Cherkas A.V., Research Engineer, Laboratory "Industrial Systems for Streaming Data Processing", Industrial Systems of Data Flow Treatment, St. Petersburg Polytechnic University, St. Petersburg, Russian Federation

Boikov A.V., Leading Engineer, Laboratory "Industrial Systems for Streaming Data Processing", Industrial Systems of Data Flow Treatment, St. Petersburg Polytechnic University, St. Petersburg, Russian Federation

Glotov O.S., PhD (Biology), Head, Department of Virological and Molecular Genetic Methods of Diagnostics, Pediatric Research and Clinical Center of Infectious Diseases, St. Petersburg, Russian Federation

Apalko S.V., PhD (Biology), Head, Laboratory of Molecular Diagnostics and Analytical Methods, Head of Research Laboratory of Translational Biomedicine, Municipal City Hospital No. 40 of the Kurort Region, Sestroretsk, St. Petersburg, Russian Federation

Sushentseva N.N., Biologist, Municipal City Hospital No. 40 of the Kurort Region, Sestroretsk, St. Petersburg, Russian Federation

Polkovnikova I.A., Biologist, Municipal City Hospital No. 40 of the Kurort Region, Sestroretsk, St. Petersburg, Russian Federation

Smirnov V.V., PhD (Medicine), Head, Clinical Diagnostic Laboratory, Municipal City Hospital No. 40 of the Kurort Region, Sestroretsk, St. Petersburg, Russian Federation

Shcherbak S.G., PhD, MD (Medicine), Professor, Chief Physician, Municipal City Hospital No. 40 of the Kurort Region, Sestroretsk; Head, Department of Postgraduate Medical Education, St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russian Federation

ИДЕНТИФИКАЦИЯ МУТАЦИЙ ПОВЕРХНОСТНОГО ГЛИКОПРОТЕИНА SARS-CoV-2 В ШТАММАХ, ИЗОЛИРОВАННЫХ В ИРАКЕ

Давуд Али А.¹, Ясим Б.И.², Рияд-аль-Джалили О.¹

¹ Мосульский университет, г. Мосул, Ирак

² Ниневийский университет, г. Мосул, Ирак

Резюме. Глобальная пандемия коронавирусной инфекции стала длительной кризисной ситуацией для общества, экономики и здравоохранения, которая продолжается и сейчас. Спайк-гликопротеин вируса SARS-CoV-2 является одним из первичных компонентов вирулентности, тканевого тропизма и объектов носительства. Целью работы было определение мутаций S-белка в изолятах от больных COVID-19 в Ираке. Методы: полногеномные последовательности линий вируса в Ираке получали из базы GISAID. Используя статистики сатурационного мутагенеза и другие методики биоинформатики, мы изучили 20 последовательностей изолятов SARS-CoV-2 с миссенс-мутацией данного белка, выявленных в Ираке и выбранных из базы данных NCBI. Результаты: во всех линиях вируса, при сравнении с диким типом, были выявлены следующие мутации: L452R, A522V, E583D and D614G. Число мутаций этих линий было различным, в зависимости от места сбора образцов. Мутация D614G была обнаружена в 19 линиях. Одна из линий имела 3 мутации, тогда как другая относилась к дикому типу вируса. Структура мутантного белка существенно изменяется из-за энергетических взаимодействий атомов в зоне стыковки, что влияет на стабильность белка. Выводы: стабильность S-белка может изменяться в зависимости от места мутации. Стыковка молекулы RBD-ACE2 нарушается по-разному при заменах аминокислот L452R and A522V.

Ключевые слова: SARS-CoV-2, спайк-протеин, мутации, поверхностные, ACE2, RBD

IDENTIFICATION OF SURFACE GLYCOPROTEIN MUTATIONS OF SARS-CoV-2 IN ISOLATED STRAINS FROM IRAQ

Ali Adel Dawood^a, Bassam Ismael Jasim^b, Omar Riadh Al-Jalily^a

^a University of Mosul, Mosul, Iraq

^b Ninevah University, Mosul, Iraq

Abstract. Background: The global pandemic of coronavirus disease is a societal, economic, and public-health crisis that is still underway. The spike glycoprotein of SARS-CoV-2 is one of the primary ingredients for virulence, tissue tropism, and host areas. Aim: This study aimed to determine mutations in the S protein of the Iraqi COVID-19 isolates.

Full genome sequences of Iraqi strains were obtained from GISAID. Using statistical saturation mutagenesis and other informatics methods, we investigated 20 sequences of SARS-CoV-2 S protein missense mutation isolates in Iraq selected from NCBI.

Адрес для переписки:

Али А. Давуд
Медицинский колледж Мосульского университета
Аль-Джамаа, 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, Б.П. Ясим, О. Рияд-аль-Джалили
«Идентификация мутаций поверхностного
гликопротеина SARS-CoV-2 в штаммах, изолированных
в Ираке» // Медицинская иммунология, 2022. Т. 24,
№ 4. С. 729-740. doi: 10.15789/1563-0625-IOS-2455
© Давуд Али А. и соавт., 2022

For citation:

Ali Adel Dawood, Bassam Ismael Jasim, Omar Riadh Al-Jalily
“Identification of Surface Glycoprotein Mutations of SARS-
CoV-2 in Isolated Strains from Iraq”, *Medical Immunology
(Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2022, Vol. 24, no. 4,
pp. 729-740. doi: 10.15789/1563-0625-IOS-2455
DOI: 10.15789/1563-0625-IOS-2455

The following mutations were detected for all the strains under study compared to the wild type: L452R, A522V, E583D and D614G. The number of mutations in the strains was different depending on the location of the state from which the sample was collected. The D614G mutation was found in 19 strains. One strain had three mutations, while the other was a wild form strain. The structure of the mutant protein changes dramatically, as does the energy of the atoms concerning the docking position, affecting the protein's stability.

The mutation sites would improve the S protein's stability. Molecular docking of RBD-ACE2 is affected differently by residues L452R and A522V.

Keywords: SARS-CoV-2, Spike, Mutation, Surface, ACE2, RBD

Introduction

The global pandemic of coronavirus disease is an ongoing social, economic, and public health issue. COVID-19 etiologic agent was recently designated SARS-CoV-2 by the Coronavirus Study Group on the International Committee of Virus Taxonomy [6, 16]. The latest member of the coronaviridae family is closely linked to serious acute coronavirus syndrome [5, 28].

The spike glycoprotein of SARS-CoV-2 is one of the primary ingredients for virulence, tissue tropism, and host areas and plays a key role for the neutralization of antibodies and the design of a vaccine [8, 12, 26, 38]. The S protein of SARS-CoV-2 is generally regarded as the most promising immunogenic for eliciting defensive immunity [24]. However, since the S protein has adapted to conduct its functions when evading host neutralizing antibody responses, it should be designed to ensure the best immune response possible [13]. The protein of coronavirus S is split into two domains: S1 and S2 [7, 24]. The domain S1 mediates receptor binding and the domain S2 mediates membrane fusion downstream. In S1 there is a core and receptor binding motif (RBM) that explicitly recognizes ACE2 in the recipient binding domain (RBD) [4, 25]. For the host and cross-species SARS-CoV-2 infections, the RBD-ACE2 interactions are important [1, 3]. The recent experiments have shown that the ACE2 affinity of SARS-CoV-2 S protein and bat coronavirus is greater than that of SARS-CoV [16]. The cryogenic electron microscopy (cryo-EM) work has been used to establish a prefusion ectodomain trimer in open and closed SARS-CoV-2 S conformation states [34, 35]. The computer modeling of the SARS-CoV-2 RBD-ACE2 interaction has found several residues potentially involved in the interaction, although the true residues which mediate the interaction remain unclear [14, 30]. In addition, no isolated SARS-CoV monoclonal antibodies can neutralize SARS-CoV-2 in place of observable SARS-CoV-2 neutralizing serum/plasma activity in patients recovering from the SARS-CoV infections [19, 23].

Compared to other RNA viruses, coronaviruses are at high rates of mutation. New mutations are constantly emerging in SARS-CoV-2 and are the main challenge in the synthesis of wide neutralizing antibodies [17]. Computational mutagenesis for saturation offers a quick technique for investigating all

conceivable mutations and identifying new functional locations. Therefore, it is essential to study RBD-CE2 affinity and S stability.

In this study, the SARS-CoV-2 S missense mutations were investigated with computational saturation mutagenesis. We retrieved 20 completed Iraqi SARS-CoV-2 isolates from various regions. A total of four S-protein mutations and one RBD domain mutation were observed. The future target locations for antiviral drug formulation and vaccines for the latest coronavirus strain study have been identified.

Materials and methods

The current research has conducted complete genome sequence data from the ancestral cladding of SARS-CoV-2 strains presented in GISAID of Iraq viral isolated from Samawa and Erbil (<https://www.gisaid.org>). NCBI Genbank has been retrieved full genome sequences of 20 SARS-CoV-2 isolates corresponding to the following accession numbers: MW290973, MW512847, MW633517, MW546610, MT940504, MT940484, MT940500, MT940492, MT940489, MT940508, MT940497, MT940487, MT940499, MT940486, MT940496, MT940507, MT940494, MT940503, MT940490, and MT940498. The surface glycoprotein sequences were derived from each genome annotation or by locally aligning the SARS-CoV-2 protein in the coding segment (CDS) translation characteristic: QPI19598, QQW45569, QRW43499, QQZ48538, QNL36298, QNL36058, QNL36250, QNL36154, QNL36118, QNL36346, QNL36214, QNL36094, QNL36238, QNL36082, QNL36202, QNL36334, QNL36226, QNL36178, QNL36286, and QNL36130 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>). China-reference entire genome (YP_009724390) and S protein (QQZ48538) were selected as template sequences for alignment and homology modeling.

Multiple sequence alignment and phylogenetic tree analysis

MAFFT 7 server and Clustal-Omega were used for the degree of convergence between sequences. Similarity estimation with Jalview was seen. The phylogenetic tree has been derived with ViPR tool.

Prediction of 2D structure

A PSIPRED webserver was used to identify the secondary structural portion (random coil, alpha helices, beta-strands) of S protein. Imaging and

comparison of protein structure with PyMoL software were conducted.

Predication of homology modeling and 3D structural analysis

The wild and mutant S protein crystal model was created by homology modeling approach using servers from Swiss-Model and Maestro-Schrodinger. PDB (6VXX) reference of S protein has been selected as a template. Models are built based on the target-template alignment using ProMod3. In the structural validation and model accuracy (protein preparation, covalent geometry, angles of torque, protein minimization, residues scanning estimation, energy calculation, hydrogen bond optimization, and whole atomic contact analysis), BioLuminate 4.2 and QMEAN were used to calculate wild and mutant of S proteins. Images were viewed using PyMol.

The ProtParam in the ExPASy portal has calculated the physiochemical characteristics of wild and mutant S proteins. Inelastic network models, changes caused by mutations in the protein dynamic structure were simulated. The DynOmics 1.0 server is used to analyze S protein structure mutations and complex molecule modifications. By comparing experimentally crystallographic results with wild and mutant model data obtained in this analysis, both the

Gaussian network and anisotropic network model measured the collective protein motion and mean quadrangular fluctuations of each residue.

Construction 3D structure of S protein mutations on the molecular docking model

We used Schrodinger sever to build the crystal structure of the detected mutations on the molecular docking region between receptor-binding domain (RBD) and angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) on the host cell membrane. PyMol was used to decipher the images. The RBD-ACE2 model with ID (6M0J) was chosen from the PDB. The distances between the atoms were measured to see whether the mutations influenced the chain of molecular docking or the overall model's conformational changes.

Results

Multiple sequence alignment of 20 S proteins compared with the wild type is shown in Figure (1). Only 1 out of 20 sequences did not notice any changes and adopt the wild form. A total of 4 existing mutations were detected. S gene mutation analysis determined: D614G mutation [aspartic acid (D) substituted with glycine (G) in codon 614]. This mutation is linked to the facilitation of virus transmission and virulence in 19 sequences. Other mutations showed in the S gene

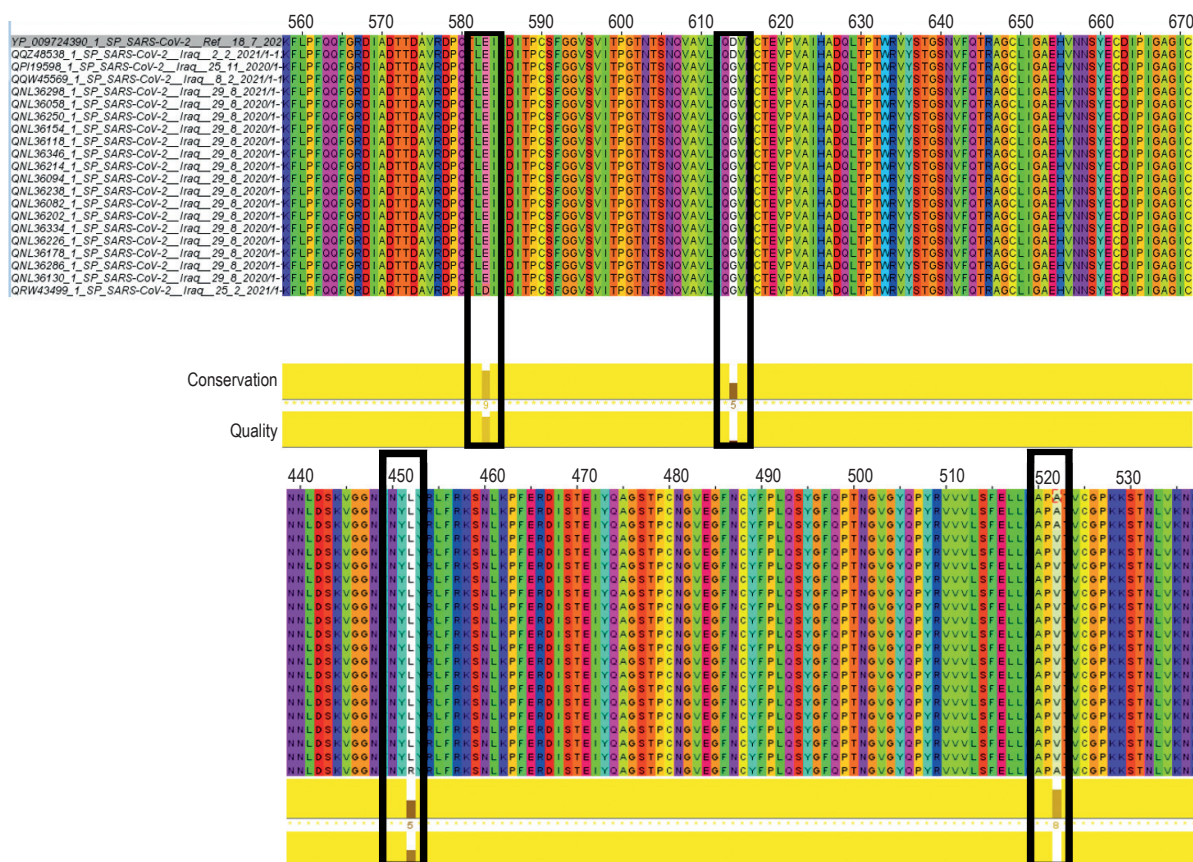


Figure 1. MSA showed 4 mutations in different residues of 19 sequences of S proteins

Note. Mutations are L452R, A522V, E583D and D614G. Each strain shows the numbers of mutations. D614G is found in 19 strains.

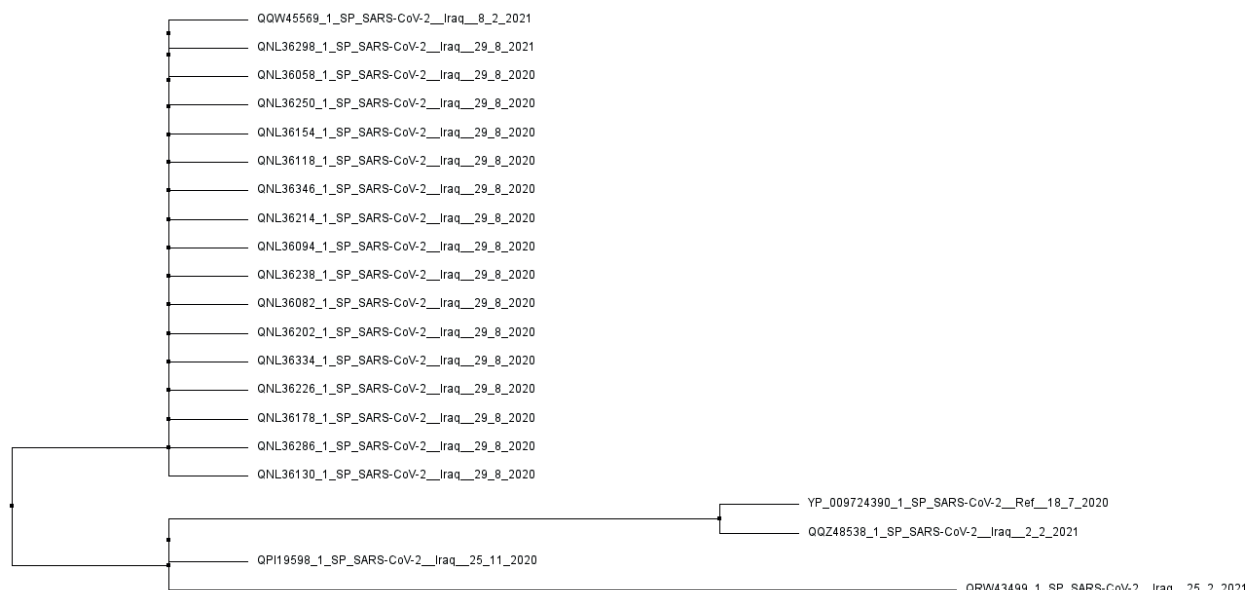


Figure 2. Phylogenetic tree of 21 sequences of S protein

Note. The QNL36238 strain is related to the wild type. 17 strains are not closely related to the wild strain.

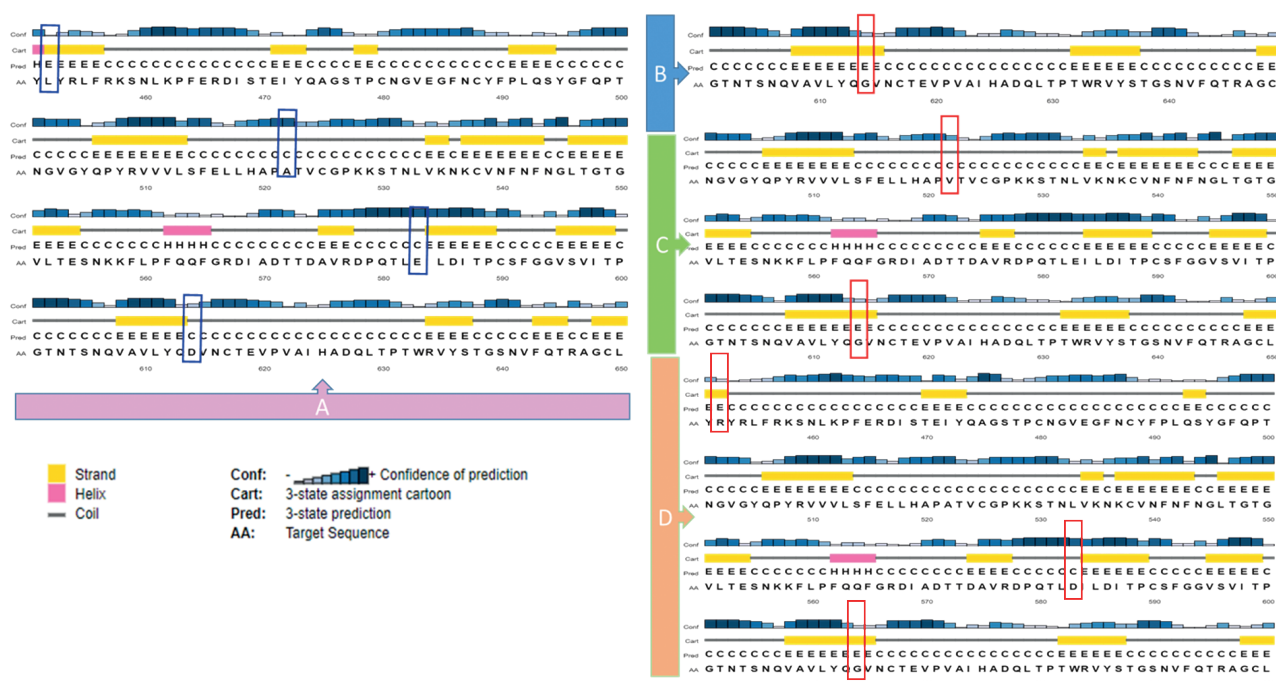


Figure 3. Prediction 2D structure of S protein sequences

Note. (A) the original residues of wild type. (B) site of D614G mutation of the strain QPI19598 in pink color. (C) site of A522V and D614G mutations of 17 strains. (D) site of L452R, E583D, and D614G mutations of the strain QNW43499.

region were: L452R mutation [lysine (L) substituted with arginine (R) in residue 452 of QNW43499. A522V mutation [alanine (A) substituted with valine (V) in residue 522 of 17 sequences. E583D mutation [glutamate (E) substituted with aspartate (D) in residue 583 of QNW43499.

Phylogenetic analyzes of the tree have shown that one genome is entirely linked to the wild form. Other sequences with various similarities in the same cladding are linked to the comparison (Figure 2).

We have shown that there is a conformational change in chains due to mutations in the prediction of two-dimensional structure. Mutations E583D and D614G have changed from the coil to the strand, but we have not seen any difference in the chains in positions L452R and A522V (Figure 3).

In global structures, like expanded random coil protein, with a poor secondary structure or molten globules, the native disorder still occurs, which have normal secondary structure elements that do not

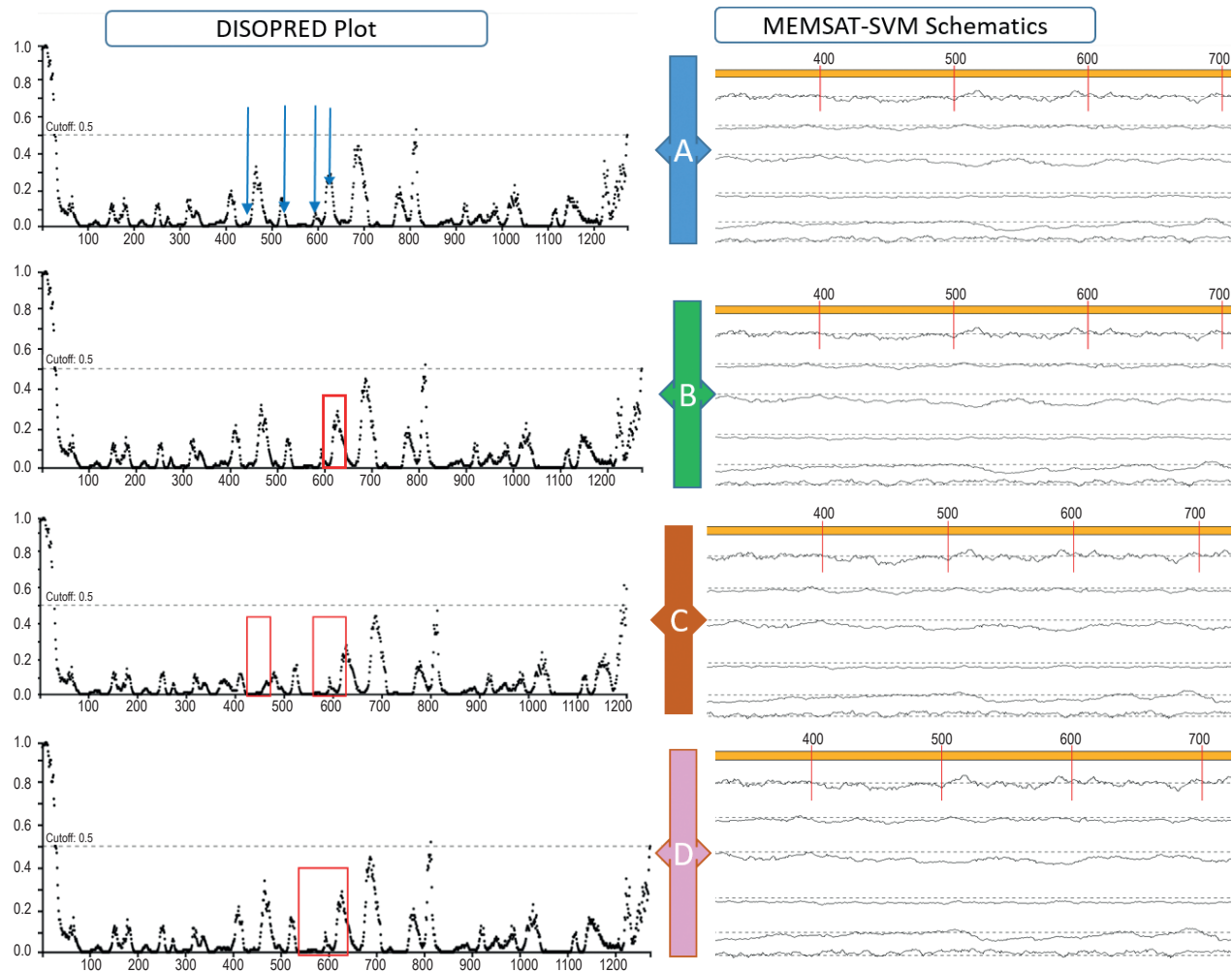


Figure 4. Analysis of Disopred (DISOPRED 3) and membrane helix prediction (MEMSAT-SVM)

Note. (A) wild type shows the original residues with blue lines in the plot and schematic. (B) D614G mutation of the strain QPI19598. (C) L452R, E583D, and D614G mutations of the strain QRW43499. (D) A522V and D614G mutations of 17 strains.

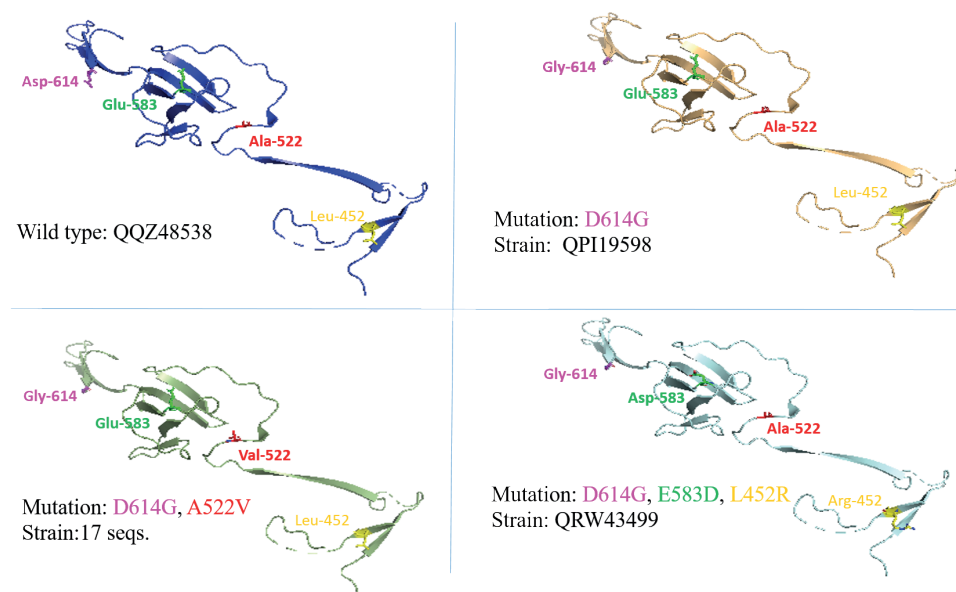


Figure 5. Cartoon 3D structure of wild type and mutant sequences

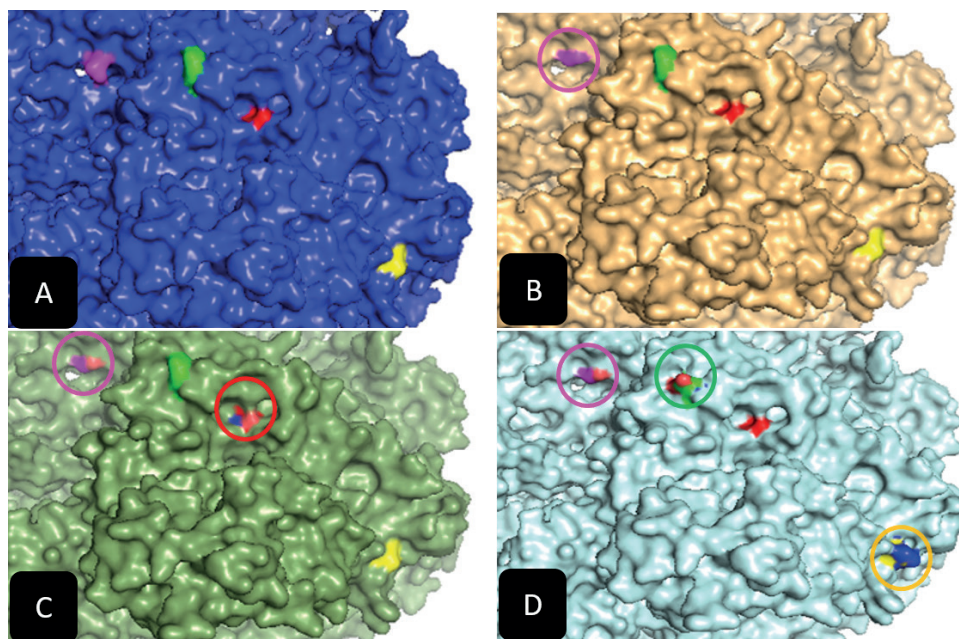


Figure 6. Surface view of the 3D structure of wild type and mutant sequences

Note. (A) wild type. (B) D614G mutation of the strain QPI19598 shows in pink color. (C) A522V and D614G mutations of 17 strains shows in red color. (D) L452R, E583D, and D614G mutations of the strain QRW43499.

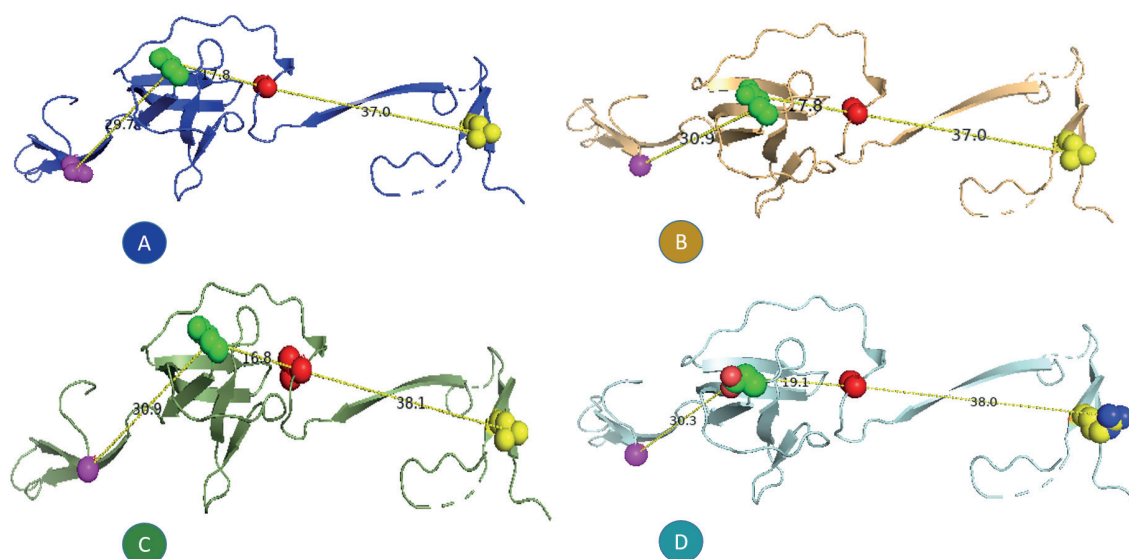


Figure 7. Measurement of distances between atoms of wild type and mutagenic patterns

Note. (A) distances between 4 residues in wild type 29.78Å, 17.8Å and 37Å. (B) distances between none mutated residues and D614G mutation of the strain QPI19598, 30.9Å, 7.8Å and 37Å respectively. (C) distances between wild residues and (A522V and D614G mutations) of 17 strains 30.9Å, 16.8Å and 38.1Å respectively. (D) distances between wild residues and (L452R, E583D, and D614G mutations) of the strain QRW43499, 30.3Å, 19.1Å and 38Å respectively.

condense into a stable globular fold. The change in the protein secondary structure can be observed by analyzing the original disorder concerning the main type and mutant strains using DISOPRED 3 server and membrane helix prediction (MEMSAT-SVM) (Figure 4).

We constructed a three-dimensional structure of the mutagenic strains obtained on the template chosen

for the S protein. In the cartoon and ribbon surface models as shown in Figures 5 and 6, the photographs have shown the proportion of modifications in the protein structure and the morphological changes related to each mutation.

The findings of the study measure the distance between the wild-type atoms and the mutant strains. The current study showed that the distance between

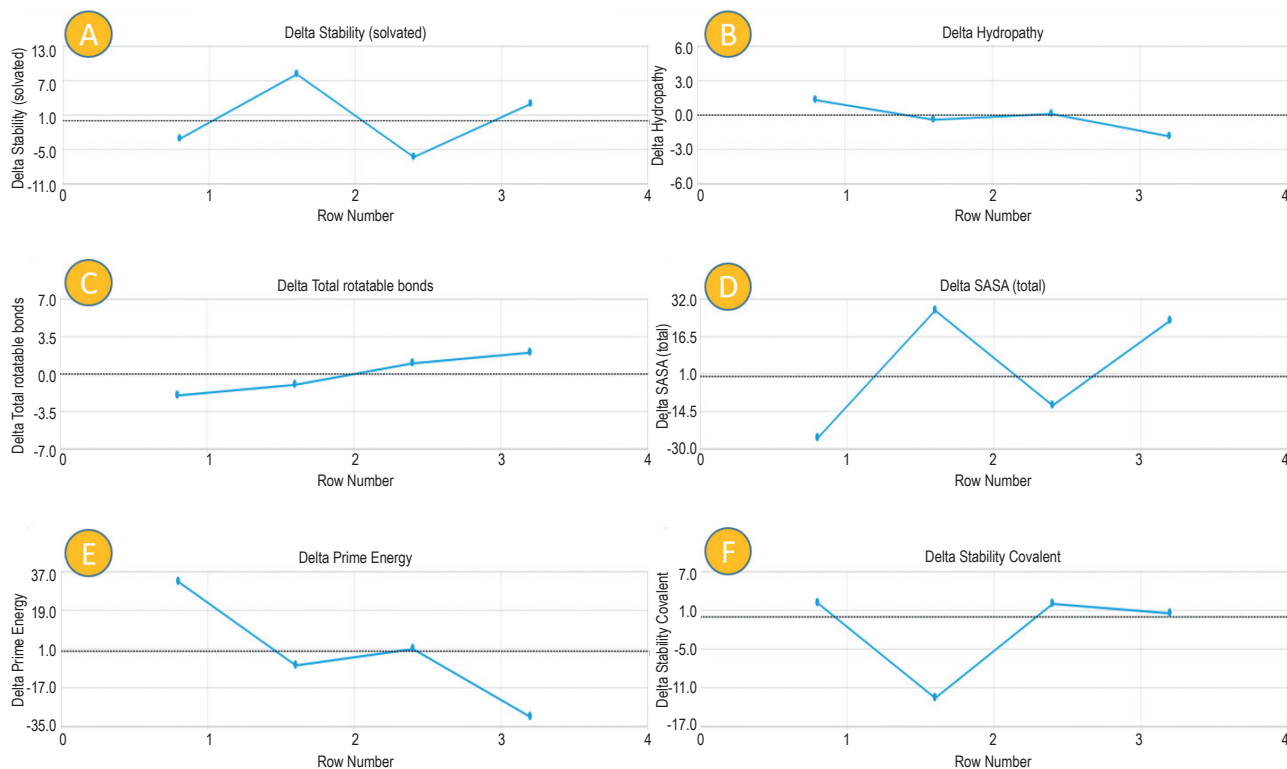


Figure 8. Energy level of 4 mutations

Note. (A) Δ Stability (solvated). (B) Δ Hydropathy. (C) Δ Total rotatable bonds. (D) Δ SASA (total). (E) Δ Prime Energy. (F) Δ Stability Covalent.

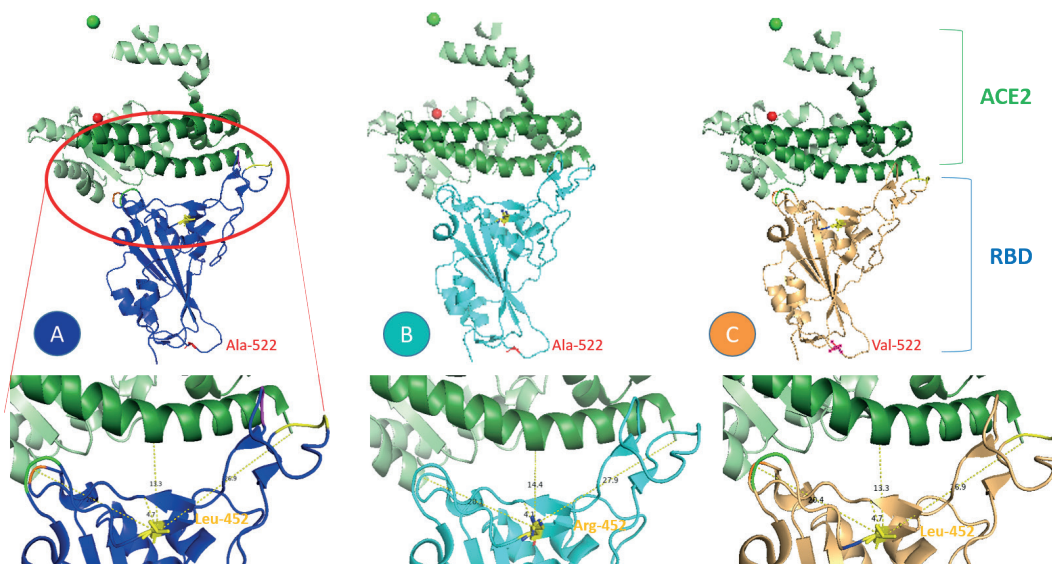


Figure 9. Molecular docking of RBD-ACE2 of wild and mutant sequences show the position of mutations in the docking interaction

Note. (A) wild type. (B) L452R mutation of the strain QRW43499. (C) A522V mutation of 17 strains.

atoms is markedly different. The spacing between residues L452R and A522V of the C3 atoms is 37 for the wild type, while the distance for the mutated type is 38 and 38.1 (Figure 7C and D) respectively. Between A522V and E583D residues, the gap between the wild

and mutant strains was reduced, from 17.8 to 16.8. The interval between C3 atoms, on the other hand, ranged from 29.7 to 30.9 between positions E583D and D614G (Figure 7). The energy calculation of atoms including hydropathy, rotatable bonds, prime

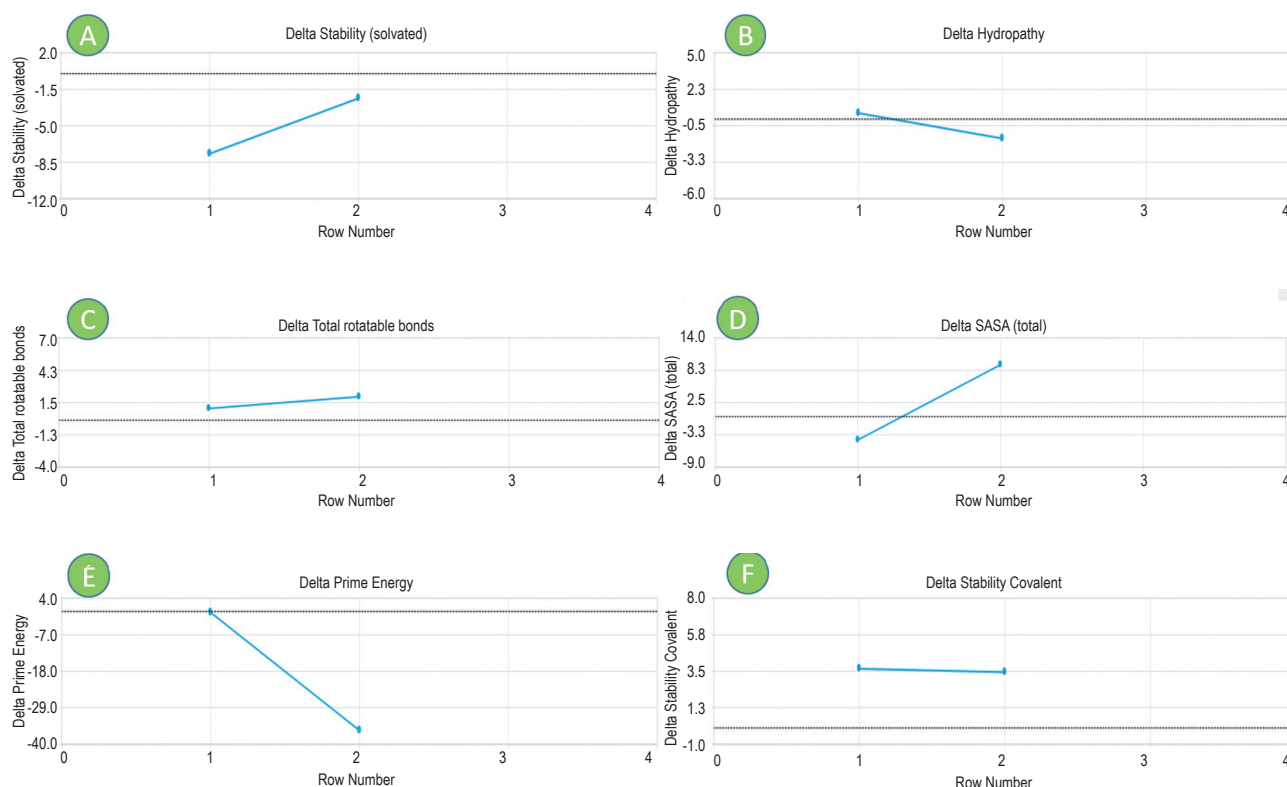


Figure 10. Energy level of 4 mutations

TABLE 1. MODIFICATION OF ENERGY EQUATIONS BETWEEN WILD AND MUTANT RESIDUES

Residue	Original	Mutate	Δ Stability (solvated) kcal/mol	Δ Hydropathy kcal/mol	Δ Total rotatable bonds kcal/mol	Δ SASA (total) kcal/mol	Δ Prime Energy kcal/mol	Δ Stability Covalent kcal/mol
A:614	Asp	Gly	-3.15	1.31	-2	-25.47	32.27	2.13
A:583	Glu	Asp	8.12	-0.41	-1	27.30	-6.60	-12.59
A:522	Ala	Val	-6.34	0.10	1	-11.97	1.03	2.01
A:452	Leu	Arg	2.95	-1.86	2	23.08	-30.55	0.54

energy, stability solvate, and covalent bonds resulting from mutations was shown in table (1). The mutations have led to the protein stability by reading the data, especially for the E583D and D614G mutations (Figure 8).

The receptor-binding domain (RBD), which is part of the S1 subunit, responsible for the docking of S protein to the ACE2 receptor on the host cell membrane. PDB (6M0J) was selected to detect mutation effects and build the three-dimensional structure of new mutations. The RBD region contains residues in the range of (333-526). There are only two detected mutations found in it (Arg-452 and Val-522). RBD interface fusion residues include sites (473-508), while ACE2 molecular docking residues include sites (21-100). Since the observed mutations do not occur inside the fusion site, but rather through the construction of the crystal structure, it became apparent that mutation Arg-452 has an impact on the fusion site. We noticed a change in the distance between the carbon atom no. 3 and the fusion sites for the wild type (26.9 , 13.3 , 4.7 , and 20.4), while for the mutated type it was (27.9Å, 14.4Å, 4.1 , and 20.1Å). In this study, we did not observe a change concerning mutation Val-522 in the coalescence region because it is relatively distant (Figure 9). The energy calculation of atoms including hydrophathy, rotatable bonds, prime energy, stability solvate, and covalent bonds resulting from 2 mutations was shown in table (2). Since the energy of a solvated bond is greater than the energy of a covalent bond, the mutations L452R and A522V result in stability proteins. This finding may affect the total energy of the RBD-ACE2 docking fusion residues (Figure 10).

Discussion

Despite the development of vaccines for the emerging coronavirus, scientists are still trying to figure out how the virus interacts with the host cell. Researchers are also working to restrict the virus by detecting mutations and thereby preventing it from entering the cell [33, 36].

Several genomic regions of increased genetic variation in SARS-CoV-2 isolates were discovered in recent studies of fine-scale sequence variation [20, 23]. We discovered four apparent mutations by studying the amino acid sequence pattern of the selected strains. The most common mutation (D614G) in the second wave of the epidemic in Brazil and the United Kingdom was detected in 19 sequences [15]. In many of the places where it has been detected, the mutant virus with glycine at the residue (G614) has shown to quickly dominate [31, 37]. This finding indicates that the G614 virus may have a propagation advantage over the D614 virus, but we can't rule out the possibility that non-stochastic sampling of virus sequences and spontaneous founder effects contribute to its current dominance [11, 22]. The D614G mutation is thought

to facilitate an open configuration of the S protein that is more conducive to ACE2 association [27, 34].

The wild form was followed by one strain. Three mutations were also discovered (L452R, A522V, and E583D). Three forms of mutations were found in the strains (QRW43499). By predicting the two-dimensional structure of mutated strains, it became clear to us that there is a change in the shape of the chain from the coil to strand for the two mutations (E583D and D614G). This is yet another example of how modifying the protein's two-dimensional structure affects its three-dimensional form. This confirms that using the Disopred server, the mutation frequency for the wild type has increased, particularly for the D614G mutant. An amino acid modification (D614G) outside the RBD was shown to be more contagious in a previous study, but no evidence of being immune to neutralizing antibodies was found. The increasing domination of D614G, on the other hand, needs special consideration [2, 29].

After constructing the mutants' crystal structures and comparing them to the wild form, we discovered that there is a significant difference, especially in the surface view of residue mutation L452R. The conformational change in the distance between the atoms confirms this. On the other hand, variations in energy measurements that were often directed toward protein stability were observed. The solvate energies of D614G and A522V are lesser than those of E583D and L452R. In contrast to the rest of the mutations, the energy of the covalent bonds was lower in the position E583D.

We conducted that the L452R mutation is nearest to the fusion region and has an effect on the protein's structure, while the A522V mutation has little effect on the overall shape due to its distance from the fusion region (473-508). What confirms our perception is the change of the distances between the atoms for the mutated from the wild type. As compared to the energy of covalent bonds, the solvated energy of the two mutations was stronger. When we equate the mutational energy of protein S to the mutagenic energy of RBD-ACE2 molecular docking, we find an important difference. For example, the solvate energy for the L452R mutation in the S protein was (2.95 kcal/mol), while the same mutation in RBD-ACE2 had lower energy (-2.37 kcal/mol). The rotatable energy between S protein mutations and RBD-ACE2 docking was revealed to be unchanged in the current study. Furthermore, the study recorded important variations in the various energies of mutations under study between S protein and RBD-ACE2 molecular docking.

S protein conformational changes that result in membrane fusion include not only receptor binding but also adequate protease activation. It's also helpful to know the rate and pace of mutations because they play a key role in the virus eluding the host immune system and increasing drug resistance [10]. We speculated that since human ACE2 hasn't adapted to

accept the SARS-CoV-2 S enzyme, mutations that increase affinity could be discovered. Without a doubt, mutations in the S protein play the most important role in modifying the virus's pattern of host-cell attachment and interaction. It's also crucial to know the rate and pace of mutations because they play a key role in the virus eluding the host immune system and gaining drug resistance [31].

According to one review, the furin-cleavage site tends to confer a fitness benefit that has yet to be determined. The D614G S-protein mutation that tends to facilitate SARS-CoV-2 transmission in humans also improves functional S-protein integration into SARS-CoV-2 VLP and retroviral PV, increasing PV infectivity [38]. To assess the effect of this transition on the existence and magnitude of COVID-19, further research will be needed.

Our findings suggest that stabilizing mutations will keep S protein stable enough to perform its function and also improving SARS-CoV-2 resistance. Via calculating energy variations, we conducted that the viral mutants are substitutions with minimum and maximum folding.

Conclusions

We investigated 20 sequences of SARS-CoV-2 S protein missense mutation isolates in Iraq using computational saturation mutagenesis. We found 19 strains with the common mutation (D614G) that can stabilize the whole SARS-Cov-2 S protein. Furthermore, we conducted that the majority of mutation sites would improve the S protein's stability. One strain, published on February 25, 2021, included three mutations, which is a dangerous sign that the number of mutations in the S protein may increase. We also revealed that neighboring residues L452R and A522V have distinct effects on RBD-ACE2 binding. The effect of the mutation site on the S protein and the location of docking fusion differs due to differences in the measured energy ratios of atoms, which is essential for this protein-protein interaction.

Acknowledgments

The authors express their gratitude to the medical colleges of Nineveh and Mosul for recording their work.

References

1. Bestle D., Heindl M.R., Limburg H., Pilgram O., Moulton H., Stein D.A., Harges K., Eickmann M., Dolnik O., Rohde C., Klenk H.-D., Garten W., Steinmetzer T., Böttcher-Friebertshäuser E. TMPRSS2 and furin are both essential for proteolytic activation and spread of SARS-CoV-2 in human airway epithelial cells and provide promising drug targets. *Life Sci. Alliance*, 2020, Vol. 3, e202000786. doi: 10.26508/lsa.202000786.
2. Bosch B.J., van der Zee R., de Haan C.A., Rottier P.J. The coronavirus spike protein is a class I virus fusion protein: structural and functional characterization of the fusion core complex. *J. Virol.*, 2003, Vol. 77, no. 16, pp. 8801-8811.
3. Calcagnile M., Forgez P., Lannelli A., Bucci C., Alifano M., Alifano P. Molecular docking simulation reveals ACE2 polymorphisms that may increase the affinity of ACE2 with the SARS-CoV-2 Spike protein. *Biochimie*, 2021, Vol. 180, pp. 143-148.
4. Chan K., Dorosky D., Shamra P., Abbasi S., Dye J., Kranz D., Herbert A.S., Procko E. Engineering human ACE2 to optimize binding to the spike protein of SARS coronavirus 2. *Science*, 2020, Vol. 369, no. 6508, pp. 1261-1265.
5. 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.
6. 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.
7. Dawood A. Mutated COVID-19, May Foretells Mankind in a Great Risk in The Future. *New Microbes New Infect.*, 2020, Vol. 35, 100673. doi: 10.1016/j.nmni.2020.100673.
8. Dawood A., Altobje M. Inhibition of N-linked Glycosylation by Tunicamycin May Contribute to The Treatment of SARS-CoV-2. *Microbiol. Path.*, 2020, Vol. 149, 104586. doi: 10.1016/j.micpath.2020.104586.
9. 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. Wu F., Zhao S., Yu B., Chen Y.M., Wang W., Song Z.G., Hu Y., Tao Z.-W., Tian J.-H., Pei Y.-Y., Yuan M.-L., Zhang Y.-L., Dai F.-H., Liu Y., Wang Q.-M., Zheng J.-J., Xu L., Holmes E.C., Zhang Y.-Z. A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. *Nature*, 2020, Vol. 579, pp. 265-269.
10. Dawood A., Altobje M., Alrassam Z. Molecular Docking of SARS-CoV-2 nucleocapsid protein with angiotensin-converting enzyme II. *Mikrobio Zhu.*, 2021, Vol. 83, no. 2, pp. 82-92.
11. Dieterle M.E., Haslwanter D., Bortz III R.H., Wirchnianski A.S., Lasso G., Vergnolle O., Abbasi S.A., Fels J.M., Laudermilch E., Florez C., Mengotto A., Kimmel D., Malonis R.J., Georgiev G., Quiroz J., Barnhill J., Pirofski L.-A., Daily J.P., Dye J.M., Lai J.R., Herbert A.S., Chandran K., Jangra R.K. A replication-competent vesicular stomatitis virus for studies of SARS-CoV-2 spike-mediated cell entry and its inhibition. *Cell Host Microbe*, 2020, Vol. 28, no. 3, pp. 486-496.e6.

12. Duan L., Zheng Q., Zhang H., Nlu Y., Wang H. The SARS-CoV-2 spike glycoprotein biosynthesis, structure, function, and antigenicity: implications for the design of spike-based vaccine immunogens. *Front. Immunol.* 2020, Vol. 11, 576622. doi: 10.3389/fimmu.2020.576622.
13. Durmaz B., Abdulmajed O., Durmaz R. Mutations observed in the SARS-CoV-2 spike glycoprotein and their effects in the interaction of virus with ACE-2 receptor. *Medeni Med. J.*, 2020, Vol. 35, no. 3, pp. 253-260.
14. Hoffmann M., Kleine-Weber H., Schroeder S., Kruger N., Herrler T., Erichsen S., Schiergens T.S., Herrler G., Wu N.-H., Nitsche A., Müller M.A. Drosten C., Pöhlmann S. SARS-CoV-2 cell entry depends on ACE2 and TMPRSS2 and is blocked by a clinically proven protease inhibitor. *Cell*, 2020, Vol. 181, no. 2, pp. 271-280.e8.
15. Iwanaga N., Cooper L., Rong L., Beddingfield B., Crabtree J., Tripp R.A., Qin X., Kolls J.K. Novel ACE2-IgG1 fusions with increased activity against SARS-CoV-2. *bioRxiv*, 2020. doi: 10.1101/2020.06.15.152157.
16. Lan J., Ge J., Shan S., Zhou H., Fan S., Zhang Q., Shi X., Wang Q., Zhang L., Wang X. Structure of the SARS-CoV-2 spike receptor-binding domain bound to the ACE2 receptor. *Nature*, 2020, Vol. 581, no. 7807, pp. 215-231.
17. Lan J., Ge J., Yu J., Shan S., Zhou H., Fan S., Zhang Q., Shi X., Wang Q., Zhang L., Wang X. Structure of the SARS-CoV-2 spike receptor-binding domain bound to the ACE2 receptor. *Nature*, 2020, Vol. 581, no. 7807, pp. 215-220.
18. Lei C., Qian K., Li T., Zhang S., Fu W., Ding M., Hu S. Neutralization of SARS-CoV-2 spike pseudotyped virus by recombinant ACE2-Ig. *Nat. Commun.*, 2020, Vol. 11, no. 1, 2070. doi: 10.1038/s41467-020-16048-4.
19. Letko M., Marzi A., Munster V. Functional assessment of cell entry and receptor usage for SARS-CoV-2 and other lineage B betacoronaviruses. *Nat. Microbiol.*, 2020, Vol. 5, pp. 562-569.
20. Liang Y., Wang M.-L., Chien C.-S., Yarmishyn A.A., Yang Y.-P., Lai W.-Y., Luo Y.-H., Lin Y.-T., Chen Y.-J., Chang P.-C., Chiou S.-H. Highlight of immune pathogenic response and hematopathologic effect in SARS-CoV, MERS-CoV, and SARS-CoV-2 infection. *Front. Immunol.*, 2020, Vol. 11, 1022. doi: 10.3389/fimmu.2020.01022.
21. Li Q., Wu J., Nie J., Zhang L., Hao H., Liu S., Zhao C., Zhang Q., Liu H., Nie L., Qin H., Wang M., Lu Q., Li X., Sun Q., Liu J., Zhang L., Li X., Huang W., Wang Y. The impact of mutations in SARS-CoV-2 spike on viral infectivity and antigenicity. *Cell*, 2020, Vol. 182, no. 5, pp. 1248-1294.
22. Malik Y.A. Properties of Coronavirus and SARS-CoV-2. *Malays. J. Pathol.*, 2020, Vol. 42, no. 1, pp. 3-11.
23. Monteil V., Kwon H., Prado P., Hagelkruys A., Wimmer R.A., Stahl M., Leopoldi A., Garreta E., Hurtado Del Pozo C., Prosper F., Romero J.P., Wirnsberger G., Zhang H., Slutsky A.S., Conder R., Montserrat N., Mirazimi A., Penninger J.M. Inhibition of SARS-CoV-2 infections in engineered human tissues using clinical-grade soluble human ACE2. *Cell*, 2020, Vol. 181, no. 4, pp. 905-913.e7.
24. Othman H., Bouslama Z., Brandenburg J.T., Rocha J., Hamdi Y., Ghedira K., Srairi-Abid N., Hazelhurst S. Interaction of the spike protein RBD from SARS-CoV-2 with ACE2: Similarity with SARS-CoV, hot-spot analysis and effect of the receptor polymorphism. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 2020, Vol. 527, no. 3, pp. 702-710.
25. Othman H., Bouslama Z., Brandenburg J.T., Rocha J., Hamdi Y., Ghedira K., Srairi-Abid N., Hazelhurst S. In silico study of the spike protein from SARS-CoV-2 interaction with ACE2: similarity with SARS-CoV, hot-spot analysis and effect of the receptor polymorphism. *BioRxiv*, 2020, 339781420. doi: 10.1101/2020.03.04.976027.
26. Ou X., Liu Y., Lei X., Li P., Mi D., Ren L., Guo L., Guo R., Chen T., Hu J., Xiang Z., Mu X., Chen J., Hu K., Jin Q., Wang J., Qian Z. Characterization of spike glycoprotein of SARS-CoV-2 on virus entry and its immune cross-reactivity with SARS-CoV. *Nature Comm.*, 2020, Vol. 11, no. 1, 1620. doi: 10.1038/s41467-020-15562-9.
27. Schmidt F., Weisblum Y., Muecksch F., Hoffmann H.-H., Michailidis E., Lorenzi J.C., Mendoza P., Rutkowska M., Bednarski E., Gaebler C., Agudelo M., Cho A., Wang Z., Gazumyan A., Cipolla M., Caskey M., Robbani D.F., Nussenzweig M.C., Rice C.M., Hatzioannou T., Bieniasz P.D. Measuring SARS-CoV-2 neutralizing antibody activity using pseudotyped and chimeric viruses. *J. Exp. Med.*, 2020, Vol. 217, no. 11, e20201181. doi: 10.1084/jem.20201181.
28. Shang J., Ye G., Shi K., Wan Y., Luo C., Aihara H., Geng Q., Auerbach A., Li F. Structural basis of receptor recognition by SARS-CoV-2. *Nature*, 2020, Vol. 581, no. 7807, pp. 221-239.
29. Tai W., He L., Zhang X., Pu J., Voronin D., Jiang S., Zhou Y., Du L. Characterization of the receptor-binding domain (RBD) of 2019 novel coronavirus: implication for development of RBD protein as a viral attachment inhibitor and vaccine. *Cell. Mole. Immunol.*, 2020, Vol. 17, no. 6, pp. 613-620.
30. Tang T., Bidon M., Jaimes J.A., Whittaker G.R., Daniel S. Coronavirus membrane fusion mechanism offers apotential target for antiviral development. *Antiviral Res.*, 2020, Vol. 178, 104792. doi: 10.1016/j.antiviral.2020.104792.
31. Teng S., Sobitan A., Rhoades R., Liu D., Tang Q. Systemic effects of missense mutations on SARS-CoV-2 spike glycoprotein stability and receptor-binding affinity. *Brief Bioinf.*, 2021, Vol. 22, no. 2, pp. 1239-1253.
32. Ujike M., Huang C., Shirato K., Makino S., Taguchi F. The contribution of the cytoplasmic retrieval signal of severe acute respiratory syndrome coronavirus to intracellular accumulation of S proteins and incorporation of S protein into viruslike particles. *J. Gen. Virol.*, 2016, Vol. 97, no. 8, pp. 1853-1864.
33. Wang Q., Zhang Y., Wu L., Niu S., Song C., Zhang Z., Lu G., Qiao C., Hu Y., Yuen K.-Y., Wang Q., Zhou H., Yan J., Qi J. Structural and Functional Basis of SARS-CoV-2 Entry by Using Human ACE2. *Cell*, 2020, Vol. 181, no. 4, pp. 894-904.e9.
34. Wrapp D., Wang N., Corbett K.S., Goldsmith J.A., Hsieh C.L., Abiona O., Graham B.S., McLellan J.S. Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation. *Science*, 2020, Vol. 367, no. 6483, pp. 1260-1263.
35. Wu F., Zhao S., Yu B., Chen Y.M., Wang W., Song Z.G. A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. *Nature*, 2020, Vol. 579, pp. 265-269.

36. Yan R., Zhang Y., Li Y., Xia L., Guo Y., Zhou Q. Structural basis for the recognition of SARS-CoV-2 by full-length human ACE2. *Science*, 2020, Vol. 367, no. 6485, pp. 1444-1448.
37. Zhang G., Pomplun S., Loftis A.R., Loas A., Pentelute B. The first-in-class peptide binder to the SARS-CoV-2 spike protein. *bioRxiv*. 2020. doi: 10.1101/2020.03.19.999318.
38. Zhang L., Jackson C., Mou H., Ojha A., Quinlan B., Ranarajan E., Izard T., Farzan M., Choe H. SARS-CoV-2 spike protein D614G mutation increases virion spike density and infectivity. *Nature Comm.*, 2020, Vol. 11, 6013. doi: 10.1038/s41467-020-19808-4.

Авторы:

Али А. Давуд — к.микробиол.н., лектор, кафедра анатомии Медицинского колледжа Мосульского университета, г. Мосул, Ирак

Бассам Исмаил Ясим — Ниневийский университет, г. Мосул, Ирак

Омар Рияд-аль-Джалили — Мосульский университет, г. Мосул, Ирак

Authors:

Ali A. Dawood, PhD (Microbiology), Lector, Department of Anatomy, College of Medicine, University of Mosul, Mosul, Iraq

Bassam Ismael Jasim, Ninevah University, Mosul, Iraq

Omar Riadh Al-Jalily, University of Mosul, Mosul, Iraq

Поступила 17.12.2021

Отправлена на доработку 07.01.2022

Принята к печати 07.03.2022

Received 17.12.2021

Revision received 07.01.2022

Accepted 07.03.2022

МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА КЛЕТОК КРОВИ У РЕКОНВАЛЕСЦЕНТОВ ПОСЛЕ ПЕРЕНЕСЕННОГО COVID-19

Клюева С.Н., Кравцов А.Л., Бугоркова С.А.

ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт “Микроб”», г. Саратов, Россия

Резюме. Сложность и многофакторность реализации патогенного потенциала SARS-CoV-2 в организме человека, раскрытие все новых механизмов, посредством которых вирус запускает каскад реакций в клетках макроорганизма, ведущих к формированию полиорганной недостаточности обусловили интерес к морфофункциональному состоянию клеток крови у реконвалесцентов после перенесенного COVID-19. Цель работы – охарактеризовать морфофункциональное состояние клеток крови в различный период реконвалесценции у пациентов в зависимости от степени тяжести перенесенного COVID-19. Обследовано 55 реконвалесцентов после перенесенного COVID-19: I группа – реконвалесценты через 30 дней после болезни (n = 39); II группа – через 60 дней (n = 16); III группа – клинически здоровые добровольцы в анамнезе у которых отсутствовал факт заболевания, обусловленного SARS-CoV-2 (n = 11). Оценку состояния клеток проводили с помощью микроскопа Olympus CX41 (Olympus, Япония) и цифровой камеры VZ-C31S (VideoZavr, Россия) в программе VideoZavr (версия 1.5). Состояние популяции нейтрофильных гранулоцитов оценивали на проточном цитофлуориметре BD Accuri C6 Plus (США) в образцах цельной крови при автоматическом дифференцировании клеток от лимфоцитов и моноцитов по степени гранулярности. Продукцию цитокинов определяли с помощью коммерческих наборов для выявления IFN γ , TNF α , IL-4, IL-8, IL-10 (АО «Вектор-Бест», Россия), IL-17A (eBioscience, Австрия) на автоматическом иммуноферментном анализаторе LAZURIT (Dynex Technologies, США). Среди реконвалесцентов, перенесших средне-тяжелую форму COVID-19 (45,5% и 50% случаев соответственно), на 30-е и 60-е сутки после клинического выздоровления отмечали достоверное увеличение доли трансформированных форм эритроцитов (эхиноциты, овалоциты, дакриоциты, кодоциты) относительно III группы (p = 0,00001 и p = 0,001 соответственно). Независимо от тяжести течения болезни, в среднем у 40,6% реконвалесцентов I и II групп регистрировали умеренное нарушение морфологии нейтрофильных гранулоцитов (цитоплазматическая вакуолизация, деконденсация хроматина на стадии преднетоза, трансформация клеток по типу нетоза), а в 27,4% случаев наблюдали участки нейтрофил-тромбоцитарной агрегации. В супернатантах крови реконвалесцентов выявлено достоверное снижение концентрации IFN γ (p = 0,02), TNF α (p = 0,03), IL-10 (p = 0,04) и IL-17A (p = 0,02). Выявленные морфофункциональные изменения клеток крови у лиц, перенесших COVID-19, свидетельствуют о длительности сохранения токсических повреждений эритроцитов, нейтрофилов и лимфоцитов в течение восстановительного периода. Влияние установленных морфофункциональных нарушений клеток крови реконвалесцентов после перенесенного COVID-19, приводящих к повышению вязкости и микроциркуляции крови, формированию нейтро-

Адрес для переписки:

Клюева Светлана Николаевна
ФКУЗ «Российский научно-исследовательский
противочумный институт “Микроб”»
410005, Россия, г. Саратов, ул. Университетская, 46.
Тел.: 8 (452) 26-21-31.
Факс: 8 (452) 51-52-12.
E-mail: klyueva.cvetlana@mail.ru

Address for correspondence:

Klyueva Svetlana N.
Russian Research Anti-Plague Institute “Microbe”
410005, Russian Federation, Saratov, Universitetskaya str., 46.
Phone: 7 (452) 26-21-31.
Fax: 7 (452) 51-52-12.
E-mail: klyueva.cvetlana@mail.ru

Образец цитирования:

С.Н. Клюева, А.Л. Кравцов, С.А. Бугоркова
«Морфофункциональная характеристика клеток
крови у реконвалесцентов после перенесенного
COVID-19» // Медицинская иммунология, 2022. Т. 24,
№ 4. С. 741-750.
doi: 10.15789/1563-0625-MCO-2507
© Клюева С.Н. и соавт., 2022

For citation:

S.N. Klyueva, A.L. Kravtsov, S.A. Bugorkova
“Morphofunctional characteristics of blood cells
in reconvalescents after suffering COVID-19”, *Medical
Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2022,
Vol. 24, no. 4, pp. 741-750.
doi: 10.15789/1563-0625-MCO-2507
DOI: 10.15789/1563-0625-MCO-2507

фил-тромбоцитарных агрегатов, вероятно, обуславливает риск развития тромботических осложнений в отдаленный период, снижение уровня регуляторных цитокинов, подтверждает медленное восстановление лимфоцитарного звена (Th1, Th2, Th17) иммунной системы.

Ключевые слова: SARS-CoV-2, COVID-19, цитокины, нейтрофилы, нетоз, эритроциты, тромбоциты

MORPHOFUNCTIONAL CHARACTERISTICS OF BLOOD CELLS IN RECONVALESCENTS AFTER SUFFERING COVID-19

Klyueva S.N., Kravtsov A.L., Bugorkova S.A.

Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov, Russian Federation

Abstract. Complexity and multifactorial nature of potential pathogenic consequences of SARS-CoV-2 infection in human body, discovery of new virus-induced mechanisms triggering a cascade of pathological responses in the cells of host organism leading to development of multiple organ failure elicited increasing interest in morpho-functional state of blood cells in convalescent persons after COVID-19 infection. The aim of the present work is to characterize morphofunctional pattern of blood cells at different periods of recovery, depending on the severity of COVID-19. We examined 55 convalescents after bearing COVID-19 infection: Group I included the convalescents 30 days after the disease ($n = 39$); Group II consisted of the persons 60 days after recovery ($n = 16$); Group III included clinically healthy volunteers with no history of clinical SARS-CoV-2 infection ($n = 11$). The cells were examined by means of Olympus CX41 microscope (Olympus, Japan), and VZ-C31S digital videocamera (VideoZavr, Russia) using the VideoZavr software (version 1.5). Assessment of neutrophil populations in the whole blood samples was performed with BD Accuri C6 Plus flow cytometer (USA) with automatic differentiation of cells between lymphocytes and monocytes, according to the degree of granularity. Cytokine production was determined using commercial kits for detection of IFN γ , TNF α , IL-4, IL-8, IL-10 (JSC Vector-Best, Russia), IL-17A (eBioscience, Austria) was assayed with automatic enzyme immunoassay analyzer "LAZURIT" (Dynex Technologies, USA). Among the convalescents who suffered the moderate-degree COVID-19 (45.5% and 50% of cases, respectively) on days +30 and +60 after clinical recovery, a significantly increased ratio of morphologically altered forms of erythrocytes (echinocytes, ovalocytes, dacryocytes, codocytes) was noted as compared with group III ($p = 0.00001$ and $p = 0.001$, respectively). Regardless of clinical severity of the disease; a mean of 40.6% convalescents from groups I and II had moderate disturbances in the neutrophil morphology (cytoplasmic vacuolization, chromatin decondensation at the pre-netosis stage, transformation of cells by the netosis type), and, in 27.4% of cases, the areas of neutrophil-platelet aggregation were seen. In blood supernates from recovered patients, we have revealed a significantly decreased content of IFN γ ($p = 0.02$), TNF α ($p = 0.03$), IL-10 ($p = 0.04$) and IL-17A ($p = 0.02$). The revealed morphological and functional changes in blood cells in the persons who underwent COVID-19 infection suggest long-term maintenance of toxic damage to erythrocytes, neutrophils and lymphocytes over the recovery period. The effects of the detected morphological and functional disorders of blood cells following COVID-19 recovery leading to increase in blood viscosity and microcirculation, formation of neutrophil-platelet aggregates, may cause higher risks of thrombotic complications at the long-range period as well as decreased levels of regulatory cytokines, thus confirming slow recovery of the lymphocyte populations (Th1, Th2, Th17) of the immune system.

Keywords: SARS-CoV-2, COVID-19, cytokines, neutrophils, netosis, erythrocytes, platelets

Введение

Новая коронавирусная инфекция, обусловленная вирусом SARS-CoV-2, вызывает заболевание у людей COVID-19, клинический спектр проявлений которого варьирует от полного отсутствия симптомов до развития состояний выраженной дыхательной и полиорганной недостаточности [17]. Наиболее важные механизмы развития полиорганной дисфункции при COVID-19 об-

условлены, как прямым, так и косвенным воздействием вируса SARS-CoV-2 на клетки и ткани макроорганизма. Один из возможных механизмов запуска каскада реакций, ведущих к полиорганной недостаточности, рассматривается через повреждение эритроцитов [22]. Изменение структуры мембраны и метаболизма эритроцитов при различных патологических состояниях, проявляется нарастанием полиморфизма клеток в популяции и появлением трансформированных

форм [4]. Нарушение целостности мембраны эритроцитов может стать причиной внутрисосудистого гемолиза, выхода свободного гемоглобина в кровеносную систему, что значительно ухудшает внутрисосудистую биодоступность оксида азота и способствует вазоконстрикции, обуславливая эндотелиальную дисфункцию и активацию тромбоцитов [9]. У 20% всех пациентов с диагностированным COVID-19 имеются грубые нарушения гемостаза и часто встречаются тромбоцистные осложнения [8, 15]. Если COVID-19 протекает в тяжелой форме, у 100% пациентов наблюдаются гемостатические нарушения, в результате которых повышается риск тромбоза.

Еще одной особенностью течения COVID-19 является агрегация тромбоцитов с нейтрофилами, моноцитами и Т-клетками [16]. В патогенезе COVID-19 играет роль и чрезмерная активация нейтрофилов, приводящая к трансформации клеток, а как следствие, к нетозу и массивному формированию нейтрофильных внеклеточных ДНК-ловушек (НВЛ), которые становятся каркасом для адгезии тромбоцитов и образования тромбов [8]. Повышение НВЛ в крови больных COVID-19 неблагоприятный прогностический критерий течения заболевания [5].

Более того, тяжелое (критическое) течение COVID-19 обусловлено нарушением регуляции и/или избыточным выделением цитокинов (так называемый «цитокиновый шторм») [18, 26], вследствие неконтролируемой активации нейтрофилов и лимфоцитов сопровождается гипервоспалительными реакциями, ведущими к полиорганной недостаточности [1, 20, 24, 27].

Сложность и многофакторность реализации патогенного потенциала SARS-CoV-2 в организме человека, раскрытие все новых механизмов, посредством которых вирус запускает каскад реакций в клетках макроорганизма, ведущих к формированию полиорганной недостаточности, обусловили интерес к изучению морфофункционального состояния клеток крови у реконвалесцентов после перенесенного COVID-19.

Цель работы — охарактеризовать морфофункциональное состояние клеток крови в различный период реконвалесценции у пациентов в зависимости от степени тяжести перенесенного COVID-19.

Материалы и методы

Было обследовано 55 реконвалесцентов в различные сроки после перенесенного COVID-19. У всех пациентов, вошедших в исследование, вирус был идентифицирован на основании положительного результата ПЦР по обнаружению РНК SARS-CoV-2. Общая характеристика участников исследования представлена в таблице 1.

У всех участников исследование забор крови проводили на основании должным образом оформленного добровольного информированного согласия. Кровь забирали из локтевой вены в утренние часы. Для характеристики морфологии клеток из 2 мкл венозной крови готовили мазки, фиксировали в 96% этаноле и окрашивали по Романовскому–Гимзе. Оценку состояния клеток проводили с помощью микроскопа Olympus CX41 (Olympus, Япония) и цифровой камеры VZ-C31S (VideoZavr, Россия) в программе VideoZavr (версия 1.5). Подсчитывали 200 клеточных структур, включая нативные неразрушенные нейтрофилы и трансформированные по типу нетоза (NETs) клетки. Подсчет эритроцитов с характеристикой морфологии проводили в 5 полях зрения, учитывая не менее 600 клеток.

Иммунофенотипирование лейкоцитов в микрообъемах цельной венозной крови (с гепарином) проводили с использованием Lyse/No Wash процедуры пробоподготовки образцов для проточно-цитофлуориметрического анализа, основанной на использовании реагента FACS Lysing Solution, (BD Bioscience, США) [7, 25]. Популяцию гранулоцитов автоматически дифференцировали на проточном цитофлуориметре BD Accuri C6 Plus (США) от лимфоцитов и моноцитов по степени гранулярности, которую оценивали в условных единицах интенсивности бокового светорассеяния (Mean Side Scatter Intensity — MSSI) [20]. В гейте гранулоцитов крови с помощью реагента CD16 (Becton Dickinson, США) идентифицировали нейтрофилы (CD16⁺) и определяли долю нейтрофильных гранулоцитов в суммарной гранулоцитарной популяции [7]. Поврежденные лейкоциты идентифицировали и подсчитывали в крови как клеточный дебрис — объекты с низким уровнем экспрессии на клетку общего лейкоцитарного антигена CD45 (Becton Dickinson, США) [25].

Для определения продукции цитокинов венозную кровь с гепарином разводили в соотношении 1:5 средой RPMI 1640 (ПанЭко Россия), содержащей 100 мкг/мл гентамицина (ОАО «Мосхимфармпрепараты» им. Н.А. Семашко). Функциональный потенциал клеток оценивали по изменению уровня индуцированной продукции цитокинов [6]. В качестве индуктора использовали стандартный Т-клеточный митоген конканавалин А (КонА) (ПанЭко, Россия) в концентрации 15 мкг. Продукцию цитокинов определяли методом твердофазного иммуноферментного анализа с помощью коммерческих наборов для выявления IFN γ , TNF α , IL-4, IL-8, IL-10 (АО «Вектор-Бест», Россия), IL-17A (eBioscience, Австрия) на автоматическом иммунофермент-

ТАБЛИЦА 1. ХАРАКТЕРИСТИКА УЧАСТНИКОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

TABLE 1. CHARACTERISTICS OF STUDY PARTICIPANTS

Показатель Indicator	I группа Реконвалесценты через 30 дней после болезни Group I Convalescents 30 days after illness	II группа Реконвалесценты через 60 дней после болезни Group II Convalescents 60 days after illness	III группа Клинически здоровые добровольцы Group III Clinically healthy volunteers
Количество участников, n Number of participants, n	39	16	11
А. Реконвалесценты, перенесшие легкую форму COVID-19 (n) A. Convalescents with mild COVID-19 (n)	28	10	–
Б. Реконвалесценты, перенесшие средне-тяжелую форму COVID-19 (n) B. Convalescents who had a moderate form of COVID-19 (n)	11	6	–
Характеристика участников по полу (женщины : мужчины) Characteristics of participants by gender (women : men)	30:9	7:9	8:3
Средний возраст участника (M±m), годы Average age of the participant (M±m), years	50,5±1,8	50,6±2,8	49,2±3,1
Средняя длительность заболевания (M±m), дни Average duration of the disease (M±m), days			
Легкая форма Light form	21,5±1,3		–
Средне-тяжелая форма Medium-severe form	30,0±3,7		

ном анализаторе LAZURIT (Dynex Technologies, США).

Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием стандартного пакета программ Microsoft Office Excel 2016, Statistica 10.0 (StatSoft Inc., 2010). Для расчета межгрупповых ассоциаций использовали U-критерий Манна–Уитни.

Результаты

Из 55 реконвалесцентов, перенесших COVID-19 у 17 человек (31%) было средне-тяжелое течение заболевания, осложнившееся внебольничной пневмонией, остальные 38 добровольцев (69%) перенесли инфекцию в легкой форме с типичными клиническими признаками ОРВИ.

Микроскопическое исследование мазков крови показало, что у 14 реконвалесцентов I группы,

перенесших COVID-19 в легкой (32,1%) и средне-тяжелой (45,5%) формах, существенно увеличена доля (в среднем в 4 раза, $p = 0,00001$) морфологически измененных форм эритроцитов (эхиноциты, овалоциты, дакриоциты) по сравнению с аналогичными показателями у добровольцев из группы III (табл. 2; рис. 1, 2А, см. 3-ю стр. обложки). Во II группе также отмечали увеличение доли ($p = 0,001$) измененных форм эритроцитов у 50% добровольцев, перенесших средне-тяжелую форму COVID-19.

У 15 реконвалесцентов I группы (35,7% – легкая форма и 45,5% – средне-тяжелая) уровень нейтрофилов с дегенеративными изменениями различной степени выраженности (цитоплазматическая вакуолизация, деконденсация хроматина на стадии преднотоза, формирование NETs) значимо превосходил ($p = 0,02$) таковой среди здоровых добровольцев (табл. 2; рис. 1, 2, см. 3-ю

ТАБЛИЦА 2. МОРФОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ЭРИТРОЦИТОВ И НЕЙТРОФИЛОВ ($M \pm m$)

TABLE 2. MORPHOLOGICAL CHARACTERISTICS OF ERYTHROCYTES AND NEUTROPHILS ($M \pm m$)

Показатель Indicator	I группа Group I		II группа Group II		III группа Group III
	A	B	A	B	
Дискоциты, % Discocytes, %	88,4 $\pm$ 1,2*	87,8 $\pm$ 1,1*	96,9 $\pm$ 1,5	95,4 $\pm$ 1,5	97,6 $\pm$ 0,5
Трансформированные формы эритроцитов, % Transformed forms of erythrocytes, %	11,6 $\pm$ 0,4*	12,2 $\pm$ 0,5*	3,1 $\pm$ 0,4	4,6 $\pm$ 0,4*	2,4 $\pm$ 0,3
Дегенеративные формы нейтрофилов, % Degenerative forms of neutrophils, %	5,8 $\pm$ 0,4*	7,1 $\pm$ 1,5*	3,2 $\pm$ 0,3	4,1 $\pm$ 0,3	2,2 $\pm$ 0,9

Примечание. * $p < 0,05$ различия с группой III.

Note. * $p < 0.05$ differences with group III.

ТАБЛИЦА 3. ХАРАКТЕРИСТИКА НЕЙТРОФИЛОВ ПО ДАННЫМ ЦИТОФЛУОРИМЕТРИИ, Me ($Q_{0,25}-Q_{0,75}$)

TABLE 3. CHARACTERISTICS OF NEUTROPHILS ACCORDING TO CYTOFLUORIMETRY DATA, Me ($Q_{0,25}-Q_{0,75}$)

Показатель Indicator	I группа Group I		II группа Group II		III группа Group III
	A	B	A	B	
Содержание в крови гранулоцитов, % Granulocyte content in the blood, %	56,9 (50,2-64,4)	56,9 (52,2-65,0)	58,3 (50,3-67,0)	52,9 (52,8-56,5)	55,3 (48,4-60,8)
Доля нейтрофилов в гранулоцитарной популяции, % Neutrophils in granulocyte population, %	95,1 (92,9-95,7)*	95,8 (94,9-96,7)*	92,6 (92,2-93,3)*	93,2 (90,0-96,6)*	88,5 (86,7-91,0)
Гранулярность нейтрофилов (интенсивность бокового светорассеяния) Neutrophil granularity (MSSI)	4545 (4333-4818)*	4556 (4449-4888)*	4442,5 (4320-5131)*	4512 (4329-5553)*	5100 (4980-5480)
Клеточный дебрис (лизис лейкоцитов крови), % Cell debris (blood leukocytolysis), %	7,0 (5,8-10,1)	8,8 (7,8-12,2)*	5,6 (4,6-10,4)	6,7 (5,0-10,6)*	4,6 (4,0-7,2)

Примечание. * $p < 0,05$ различия с группой III; MSSI – среднее значение интенсивности бокового светорассеяния отдельных клеток неоднородной клеточной популяции в условных единицах (каналах).

Note. * $p < 0.05$ differences with group III; MSSI, Mean Side Scatter Intensity of single cells of heterogeneous population in arbitrary units (channels).

стр. обложки). Во II группе лишь у 4 реконвалесцентов (20% – легкая, 33,3% – средне-тяжелая) обнаружено умеренное нарушение морфологии отдельных нейтрофилов. Однако доля дегенеративных форм в этой группе достоверно не отличалась от показателей в группе III.

Кроме того, у 8 реконвалесцентов I группы (10,7% – легкая форма и 45,5% – средне-тяжелая) и 3 реконвалесцентов II группы (20% – легкая, 33,3% – средне-тяжелая) в мазках крови обнаружены участки нейтрофил-тромбоцитарной агрегации (рис. 2Б, см. 3-ю стр. обложки). Таких конгломератов в одном поле зрения микроскопа насчитывали от 2 до 10.

Методом проточной цитометрии установлено, что у всех реконвалесцентов доля нейтрофилов в суммарной популяции гранулоцитов крови была выше ($p = 0,04$), чем у добровольцев из группы III (табл. 3). При этом регистрировали снижение гранулярности клеток ($p = 0,04$), что, свидетель-

ствовало о развитии в клетках процесса дегрануляции [20]. Доля нейтрофилов в стадии нетоза у реконвалесцентов I и II группы достоверно превышала уровень у добровольцев из группы III ($p = 0,03$). Интересно, что доля нейтрофилов с дегенеративными изменениями, выявленных в мазках крови реконвалесцентов, была близка к фактической доле клеточного дебриса среди полиморфонуклеаров, определенного при цитофлуориметрическом анализе.

По данным иммуноферментного анализа была выявлена различная реакция в отношении продукции ряда цитокинов ($IFN\gamma$, $TNF\alpha$, IL-4, IL-8, IL-10, IL-17A), как при митогенной стимуляции клеток крови, так и без стимуляции (спонтанная продукция).

Из шести исследованных цитокинов в супернатантах крови переболевших COVID-19 обнаружен достоверно сниженный уровень четырех цитокинов ($IFN\gamma$, $TNF\alpha$, IL-17A, IL-10) по срав-

ТАБЛИЦА 4. ХАРАКТЕРИСТИКА ПРОДУКЦИИ ЦИТОКИНОВ В ЦЕЛЬНОЙ КРОВИ, Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)

TABLE 4. CHARACTERIZATION OF CYTOKINE PRODUCTION BY WHOLE BLOOD CELLS, Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)

Цитокин Cytokine		I группа Group I		II группа Group II		III группа Group III
		A	B	A	B	
IFNγ (пг/мл) IFN γ (pg/mL)	1	0 (0,0-3,5)	2,3 (0,0-8,7)*	1,0 (0,0-1,8)**	6,7 (3,8-9,7)*	3,6 (0,8-14,7)
	2	403,8 (213,6-1161,3)	556,6 (409,5-1043,7)	408,4 (235,3-992,9)	357,4 (89,4-538,6)	345,8 (174,2-1045,2)
TNFα (пг/мл) TNF α (pg/mL)	1	0 (0,0-1,5)	0 (0,0-1,4)	0,9 (0,0-1,4)	3,7 (0,0-3,8)	0 (0-0)
	2	262,9 (90,9-338,3)**	274,5 (243,2-371,3)**	227,4 (110,4-305,0)**	241,5 (34,8-263,2)**	382,6 (369,0-413,2)
IL-4 (пг/мл) IL-4 (pg/mL)	1	0,2 (0,0-0,5)	0,06 (0,0-0,3)	0,4 (0,2-1,0)	0,8 (0,0-1,7)	0 (0,0-0,14)
	2	2,4 (0,7-4,5)	2,6 (1,9-4,9)**	3,0 (2,5-6,4)***	1 (0,05-2,00)	1,3 (0,1-2,4)
IL-8 (пг/мл) IL-8 (pg/mL)	1	716,9 (374,2-1223,0)	963,2 (695,4-2831,4)*	604,1 (396,1-1389,0)	333,8 (202,6-693,5)	598,6 (112,0-947,8)
	2	9160,8 (5557,6-10515,0)	9234,4 (7854,6-10391,8)	9933,7 (8115,7-11521,0)	5896,8 (2824,4-8723,2)	4597 (3011-10037)
IL-10 (пг/мл) IL-10 (pg/mL)	1	2,7 (1,9-3,3)**	14,7 (6,3-55,8)*	2,8 (2,1-3,4)**	22,9 (2,5-64,4)*	17,9 (2,1-22,6)
	2	11,5 (8,8-16,1)**	66,1 (36,6-159,6)*	37,2 (25,1-60,8)	27,4 (12,4-74,3)**	55,8 (40,9-94,5)
IL-17A (пг/мл) IL-17A (pg/mL)	1	1,1 (1,0-1,2)	1 (0,0-1,1)	1,1 (1,0-1,2)	1 (0,0-1,1)	0,5 (0,0-1,2)
	2	63,3 (31,5-77,2)	40,5 (31,7-43,6)	15,7 (3,9-39,9)**	92,6 (48,4-181,6)*	53,2 (30,7-66,2)

Примечание. 1 – спонтанная продукция; 2 – индуцированная продукция; * $p < 0,05$ различия между подгруппами A и B; ** $p < 0,05$ различия с группой III.

Note. 1, spontaneous production; 2, induced production; *, $p < 0.05$ differences between subgroups A and B; ** $p < 0.05$ differences with group III.

нению со значениями этих показателей в группе III (табл. 4). Регистрировали снижение: в 3,6 раза ($p = 0,02$) уровня спонтанной продукции $IFN\gamma$ у реконвалесцентов II A группы (легкая форма); в 1,7 раза ($p = 0,03$) митоген-индуцированной продукции $TNF\alpha$ в I и II группах; в 3,4 раза ($p = 0,02$) митоген-индуцированной продукции $IL-17A$ во II A группе (легкая форма); в 6,4 раза ($p = 0,04$) спонтанной продукции $IL-10$ в I A и II A группах (легкая форма), в 4,2 раза ($p = 0,001$) митоген-индуцированной продукции $IL-10$ в I A группе (легкая форма) и в 2 раза ($p = 0,04$) во II B группе (средне-тяжелая форма).

Отмечено, что в I и II группах реконвалесцентов, переболевших в средне-тяжелой форме, уровни спонтанной продукции $IFN\gamma$ ($p = 0,03$, $p = 0,0002$ соответственно) и $IL-10$ ($p = 0,005$, $p = 0,034$ соответственно) достоверно превышали аналогичные показатели тех реконвалесцентов, у которых заболевание протекало в легкой форме.

Обсуждение

На эритроциты приходится до 98% объема клеточной популяции в кровяном русле [3], поэтому любые изменения морфологии этих клеток ведут к нарушениям реологии крови. Доказанным является факт накопления в крови пациентов с COVID-19 патологических форм эритроцитов (эхиноциты, сфероциты, овалоциты, шизоциты, акантоциты, дрепаноциты) [22]. Так, у пациентов с анемией на фоне тяжелого течения COVID-19, в 70% случаев в крови регистрировали трансформированные формы эритроцитов [12], образование которых было обусловлено структурными повреждениями мембраны эритроцитов [14].

По результатам нашего исследования, у 27% переболевших COVID-19, доля морфологически измененных эритроцитов (эхиноциты, овалоциты, дакриоциты) через 1-2 месяца после выздоровления составляла в среднем $9,5 \pm 0,5\%$ и превышала аналогичный показатель у здоровых добровольцев в 4 раза. Эти данные согласуются с результатами других авторов, показавших, что процент эритроцитов с деформацией составляет в среднем 14,6% для выздоровевших пациентов и 32,4% — для госпитализированных пациентов с COVID-19 [14], в то время как у здоровых доноров количество дегенеративно измененных эритроцитов не превышает $2,0 \pm 0,7\%$ [3].

Современные фундаментальные исследования убедительно свидетельствуют о том, что нейтрофильные гранулоциты являются ключевыми эффекторными и регуляторными клетками как врожденного, так и адаптивного иммунитета, и играют решающую роль в иммунопатогенезе широкого спектра заболеваний [10]. После активации подавляющее большинство нейтрофилов

обладает способностью формировать во внеклеточном пространстве сетеподобные структуры НВЛ — уникальный механизм противомикробной защиты. Осуществляя такого рода внеклеточный киллинг микроорганизмов, нейтрофилы погибают в результате нетоза. НВЛ представляют собой структуры, занимающие объем, в 10-15 раз превышающий объем нейтрофилов, и состоящие из нитей деконденсированного хроматина, на поверхности которых иммобилизованы многочисленные антимикробные пептиды и ферменты гранулоцитов [10]. Кроме того, известно, что под влиянием инфекционного или токсического агента наиболее часто встречаются такие изменения в нейтрофилах как тельца Деле и вакуолизация цитоплазмы [11], что мы наблюдали в отдельных случаях в мазках крови реконвалесцентов после перенесенного COVID-19.

По нашим данным, у 40,6% реконвалесцентов через 30 дней после выздоровления количество нейтрофилов с измененной морфологией составило в среднем $6,5 \pm 0,9\%$, что существенно выше, чем в контроле. По данным литературы, высокий уровень НВЛ, в 3 раза превышающий показатели здоровых добровольцев и составляющий 14,5 (2,9-28,6)%, может свидетельствовать о сбое иммунных механизмов защиты и развитии неадекватного воспалительного ответа [5].

Известно, что тяжелое поражение SARS-CoV-2 приводит к острому респираторному дистресс-синдрому, при котором происходит активация нейтрофилов, запускается каскад реакций свертывания крови и образования агрегатов тромбоцитов с нейтрофилами [15, 19]. Активация нейтрофильных гранулоцитов и их дегрануляция способствуют привлечению иммунных клеток и формированию гетероагрегатов тромбоцитов и нейтрофилов, которые регистрировались у пациентов с COVID-19 [21]. По нашим данным, в среднем, у 27,4% переболевших COVID-19, через 1-2 месяца после выздоровления в мазках крови были обнаружены участки нейтрофил-тромбоцитарной агрегации, что, возможно, свидетельствует о длительном сохранении риска тромбоэмболических осложнений у таких лиц.

Формирование системного воспалительного ответа, индуцированного вирусной инфекцией, повреждением тканей и реализуемого в числе прочего посредством «цитокинового шторма», также может приводить к неблагоприятным последствиям и осложнениям в отсроченном и отдаленном периоде [13]. В частности, у большинства пациентов сохраняется стойкое, в течение нескольких недель, нарушение функционирования систем, как врожденного, так и адаптивного иммунного ответа. Все это свидетельствует о необходимости контроля уровня цитокинов у пациентов, перенесших COVID-19.

В результате нашего исследования было показано, что в супернатантах крови реконвалесцентов через 1-2 месяца после выздоровления было выявлено существенное снижение концентрации ряда цитокинов (IFN γ , TNF α , IL-10 и IL-17A) относительно аналогичных показателей у здоровых добровольцев. Вероятно, это является следствием гиперактивации этих цитокинов в период болезни, когда вирус SARS-CoV-2 проникает в клетки дыхательных путей человека и стимулирует выраженную местную воспалительную реакцию, выражающуюся увеличением концентрации многих цитокинов [23]. Достоверное снижение концентрации ряда цитокинов, в том числе IFN γ , TNF α , IL-10 и IL-17A, в плазме крови реконвалесцентов спустя 30-100 дней после выздоровления от COVID-19 по сравнению с острым периодом болезни является установленным фактом [2].

Таким образом, в настоящем исследовании показано, что фаза реконвалесценции характеризуется значительным увеличением числа морфологически измененных эритроцитов, нарастанием дегенеративных изменений в нейтрофилах

и формированием нейтрофил-тромбоцитарных агрегатов на фоне значительного снижения уровня продукции цитокинов IFN γ , TNF α , IL-10 и IL-17A, регулирующих лимфоцитарное звено (Th1, Th2, Th17) и имеющих важное значение для обеспечения механизмов врожденного и приобретенного иммунитета.

Выявленные морфофункциональные изменения клеток крови у лиц, перенесших COVID-19, свидетельствуют о длительности сохранения токсических повреждений эритроцитов, нейтрофилов и лимфоцитов в течение восстановительного периода. Влияние установленных морфофункциональных изменений клеток крови реконвалесцентов после перенесенного COVID-19, приводящих к повышению ее вязкости и нарушению микроциркуляции, формированию нейтрофил-тромбоцитарных агрегатов, вероятно, обуславливает риск развития тромботических осложнений в отдаленный период, а снижение уровня регуляторных цитокинов, подтверждает медленное восстановление лимфоцитарного звена (Th1, Th2, Th17) иммунной системы.

Список литературы / References

1. Алексеева Е.И., Тепаев Р.Ф., Шилькрот И.Ю., Дворяковская Т.М., Сурков А.Г., Криулин И.А. COVID-19-индуцированный «цитокиновый шторм» – особая форма синдрома активации макрофагов // Вестник РАМН, 2021. Т. 76, № 1. С.51-66. [Alexeeva E.I., Tepaev R.F., Shilkrot I.Y. Dvoryakovskaya T.M., Surkov A.G., Kriulin I.A. COVID-19-induced “cytokine storm” – a unique form of macrophage activation syndrome. *Vestnik Rossiyskoy akademii meditsinskikh nauk = Annals of the Russian Academy of Medical Sciences*, 2021, Vol. 76, no. 1, pp. 51-66. (In Russ.)]
2. Арсентьева Н.А., Любимова Н.Е., Бацунов О.К., Коробова З.Р., Станевич О.В., Лебедева А.А., Воробьев Е.А., Воробьева С.В., Куликов А.Н., Лioзнов Д.А., Шарапова М.А., Певцов Д.Э., Тотолян А.А. Цитокины в плазме крови больных COVID-19 в острой фазе заболевания и фазе полного выздоровления // Медицинская иммунология, 2021. Т. 23, № 2. С. 311-326. [Arsentieva N.A., Liubimova N.E., Batsunov O.K., Korobova Z.R., Stanevich O.V., Lebedeva A.A., Vorobyov E.A., Vorobyova S.V., Kulikov A.N., Lioznov D.A., Sharapova M.A., Pevtsov D.E., Totolian A.A. Plasma cytokines in patients with COVID-19 during acute phase of the disease and following complete recovery. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2021, Vol. 23, no. 2, pp. 311-326. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-PCI-2312.
3. Байбеков И.М., Мавлян-Ходжаев Р.Ш., Эрстекис А.Г., Москвин С.В. Эритроциты в норме, патологии и при лазерных воздействиях. Тверь: Триада, 2008. 256 с. [Baibekov I.M., Mavlyan-Khodzhaev R.Sh., Erstekis A.G., Moskvina S.V. Erythrocytes are normal, pathological and under laser exposure]. Tver: Triada, 2008. 256 p.
4. Бугоркова С.А., Клюева С.Н. Топографическая характеристика состояния мембран эритроцитов крови при экспериментальном вакцинном процессе // Морфологические ведомости, 2015. № 2. С. 21-27. [Bugorkova S.A., Klyueva S.N. Topographic characteristics of the state of erythrocyte membranes in the experimental vaccine process. *Morfologicheskie vedomosti = Morphological Statements*. 2015, no. 2, pp. 21-27. (In Russ.)]
5. Кассина Д.В., Василенко И.А., Гурьев А.С., Волков А.Ю., Метелин В.Б. Нейтрофильные внеклеточные ловушки: значение для диагностики и прогноза COVID-19 // Альманах клинической медицины. 2020. № 48. С. 43-50. [Kassina D.V., Vasilenko I.A., Gur'ev A.S., Volkov A.Yu., Metelin V.B. Neutrophil extracellular traps: diagnostic and prognostic value in COVID-19. *Almanakh klinicheskoy meditsiny = Almanac of Clinical Medicine*, 2020, no. 48, pp. 43-50. (In Russ.)]
6. Клюева С.Н., Шуковская Т.Н. Влияние адъювантов нового поколения *in vitro* на продукцию цитокинов клетками крови вакцинированных против чумы лиц // Российский иммунологический журнал. 2015. Т. 9 (18), № 2. С. 201-208. [Klyueva S.N., Shchukovskaya T.N. Influence of new generation adjuvants *in vitro* on cytokine production by blood cells of people vaccinated against plague. *Rossiyskiy immunologicheskii zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2015, Vol. 9 (18), no. 2, pp. 201-208. (In Russ.)]

7. Кравцов А.Л., Бугоркова С.А., Ключева С.Н., Кожевников В.А., Кудрявцева О.М. Определение экспрессии FcγRIIIb (CD16) на поверхности нейтрофилов крови привитых против чумы людей // Молекулярная медицина, 2020. Т. 18, № 2. С. 33-38. [Kravtsov A.L., Bugorkova S.A., Klyueva S.N., Kozhevnikov V.A., Kudryavtseva O.M. Determination of FcγRIIIb (CD16) expression on the surface blood neutrophils in anti-plague vaccinated people. *Molekulyarnaya meditsina = Molecular Medicine*, 2020, Vol. 18, no. 2, pp. 33-38. (In Russ.)]
8. Макацария А.Д., Слуханчук Е.В., Бицадзе В.О., Хизроева Д.Х., Третьякова М.В., Цибизова В.И., Шкода А.С., Грандоне Э., Элалами И., Риццо Д., Грис Ж.-К.Р., Шульман С., Бреннер Б. COVID-19, нарушения гемостаза и риск тромботических осложнений // Вестник РАМН, 2020. Т. 75, № 4. С. 306-317. [Makatsariya A.D., Slukhanchuk E.V., Bitsadze V.O., Khizroeva D.KH., Tretyakova M.V., Tsibizova V.I., Shkoda A.S., Grandone E., Elalamy I., Rizzo G., Gris J.-C.R., Schulman S., Brenner B. COVID-19, hemostasis disorders and risk of thrombotic complications. *Vestnik Rossiyskoy akademii meditsinskikh nauk = Annals of the Russian Academy of Medical Sciences*, 2020, Vol. 75, no. 4, pp. 306-317. (In Russ.)]
9. Мороз В.В., Черныш А.М., Козлова Е.К. Коронавирус SARS-CoV-2: гипотезы влияния на кровеносную систему, перспективы использования перфторуглеродной эмульсии, возможности биофизических методов исследования // Общая реаниматология, 2020. Т. 16, № 3. С. 4-13. [Moroz V.V., Chernysh A.M., Kozlova E.K. Coronavirus SARS-CoV-2: hypotheses of impact on the circulatory system, prospects for the use of perfluorocarbon emulsion, and feasibility of biophysical research methods. *Obshchaya reanimatologiya = General Reanimatology*, 2020, Vol. 16, no. 3, pp. 4-13. (In Russ.)]
10. Нестерова И.В., Колесникова Н.В., Чудилова Г.А., Ломтатидзе Л.В., Ковалева С.В., Евглевский А.А., Нгуен Т.З.Л. Новый взгляд на нейтрофильные гранулоциты: переосмысление старых догм. Часть 1 // Инфекция и иммунитет, 2017. Т. 7, № 3. С. 219-230. [Nesterova I.V., Kolesnikova N.V., Chudilova G.A., Lomtadidze L.V., Kovaleva S.V., Evglevsky A.A., Nguyen T.D.L. The new look at neutrophilic granulocytes: rethinking old dogmas. Part 1. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2017, Vol. 7, no. 3, pp. 219-230. (In Russ.)] doi: 10.15789/2220-7619-2017-3-219-230.
11. Николаева О.В., Кучерявченко М.А., Шутова Н.А., Шевченко А.Н., Литвиненко Е.Ю. Патопфизиология системы крови. Часть II. Нарушения в системе лейкоцитов. Харьков: Типография «Мадрид», 2016. 128 с. [Nikolaeva O.V., Kucheryavchenko M.A., Shutova N.A., Shevchenko A.N., Litvinenko E.Yu. Pathophysiology of the blood system. Part II. Disturbances in the leukocyte system]. Kharkiv: Typography "Madrid", 2016. 128 p.
12. Berzuini A., Bianco C., Migliorini A.C., Maggioni M., Valenti L., Prati D. Red blood cell morphology in patients with COVID-19-related anaemia. *Blood Transfus.*, 2021, Vol. 19, no. 1, pp. 34-36.
13. Costela-Ruiz V., Illescas-Montes R., Puerta-Puerta J., Ruiz C., Melguizo-Rodríguez L. SARS-CoV-2 infection: The role of cytokines in COVID-19 disease. *Cytokine Growth Factor Rev.*, 2020, no. 54, pp. 62-75.
14. Kubánková M., Hohberger B., Hoffmanns J., Fürst J., Herrmann M., Guck J., Kräter M. Physical phenotype of blood cells is altered in COVID-19. *Biophys. J.*, 2021, Vol. 120, no. 14, pp. 2838-2847.
15. Manne B.K., Denorme F., Middleton E.A., Portier I., Rowley J.W., Stubben C., Petrey A.C., Tolley N.D., Guo L., Cody M., Weyrich A.S., Yost C.C., Rondina M.T., Campbell R.A. Platelet gene expression and function in patients with COVID-19. *Blood*, 2020, Vol. 136, no. 11, pp. 1317-1329.
16. Mei H., Luo L., Hu Y. Thrombocytopenia and thrombosis in hospitalized patients with COVID-19. *J. Hematol. Oncol.*, 2020, Vol. 13, no. 1, 161. doi: 10.1186/s13045-020-01003-z.
17. Mokhtari T., Hassani F., Ghaffari N., Ebrahimi B., Yarahmadi A., Hassanzadeh G. COVID-19 and multiorgan failure: A narrative review on potential mechanisms. *J. Mol. Histol.*, 2020, Vol. 51, no. 6, pp. 613-628.
18. Moore J.B., June C.H. Cytokine release syndrome in severe COVID-19. *Science*, 2020, Vol. 368, no. 6490, pp. 473-474.
19. Nicolai L., Leunig A., Brambs S., Kaiser R., Weinberger T., Weigand M., Muenchhoff M., Hellmuth J.C., Ledderose S., Schulz H., Scherer C., Rudelius M., Zoller M., Höchter D., Keppler O., Teupser D., Zwißler B., von Bergwelt-Baildon M., Käb S., Massberg S., Pekayvaz K., Stark K. Immunothrombotic dysregulation in COVID-19 pneumonia is associated with respiratory failure and coagulopathy. *Circulation*, 2020, Vol. 142, no. 12, pp. 1176-1189.
20. Paraskova Z., Zentsova I., Bloomfield M., Vrabцова P., Smetanova J., Klocperk A., Mesežnikov G., Mendez L.F.C., Vymazal T., Sediva A. Disharmonic inflammatory signatures in COVID-19: augmented neutrophils, but impaired monocytes and dendritic cells, responsiveness. *Cell*, 2020, Vol. 9, no. 10, 2206. doi: 10.3390/cells9102206.
21. Rampotas A., Pavord S. Platelet aggregates, a marker of severe COVID-19 disease. *J. Clin. Pathol.*, 2020, jclinpath-2020-206933. doi: 10.1136/jclinpath-2020-206933.
22. Reva I., Yamamoto T., Rasskazova M., Lemeshko T., Usov V., Krasnikov Y., Fisenko A., Kotsyurbiy E., Tudakov V., Tsegolnik E., Oleksenko O., Korobkin A., Slabenko E., Shindina A., Gordzievskaya K., Furgal A., Reva G. Erythrocytes as a target of SARS COV-2 in pathogenesis of COVID-19. *Arch. Euromed.*, 2020, Vol. 10, no. 3, pp. 5-11.
23. Shibabaw T. Inflammatory cytokine: IL-17A signaling pathway in patients present with COVID-19 and current treatment strategy. *J. Inflamm. Res.*, 2020, no. 13, pp. 673-680.
24. Tay M.Z., Poh C.M., Rénia L., MacAry P.A., Ng L.F.P. The trinity of COVID-19: immunity, inflammation and intervention. *Nat. Rev. Immunol.*, 2020, Vol. 20, no. 6, pp. 363-374.

25. Vera E.J., Chew Y.V., Nicholson L., Burns H., Anderson P., Chen H.-T., Williams L., Keung K., Zanjani N.T., Dervish S., Patrick E., Wang X.M., Yi S., Hawthorne W., Alexander S., O'Connell P.J., Hu M. Standardization of flow cytometry for whole blood immunophenotyping of islet transplant and transplant clinical trial recipients. *PLoS One*, 2019, Vol. 22, no. 14 (5), e0217163. doi: 10.1371/journal.pone.0217163.
26. Wu D., Yang X.O. TH17 responses in cytokine storm of COVID-19: an emerging target of JAK2 inhibitor fedratinib. *J. Microbiol. Immunol. Infect.*, 2020, Vol. 53, no. 3, pp. 368-370.
27. Ye Q., Wang B., Mao J. The pathogenesis and treatment of the cytokine storm in COVID-19. *J. Infect.*, 2020, Vol. 80, no. 6, pp. 607-613.

Авторы:

Клюева С.Н. — к.б.н., научный сотрудник
отдела иммунологии ФКУЗ «Российский научно-
исследовательский противочумный институт
“Микроб”», г. Саратов, Россия

Кравцов А.Л. — д.б.н., ведущий научный сотрудник
отдела иммунологии ФКУЗ «Российский научно-
исследовательский противочумный институт
“Микроб”», г. Саратов, Россия

Бугоркова С.А. — д.м.н., и.о. заведующего
отделом иммунологии ФКУЗ «Российский научно-
исследовательский противочумный институт
“Микроб”», г. Саратов, Россия

Authors:

Klyueva S.N., PhD (Biology), Research Associate, Department
of Immunology, Russian Research Anti-Plague Institute
“Microbe”, Saratov, Russian Federation

Kravtsov A.L., PhD, MD (Biology), Leading Research
Associate, Department of Immunology, Russian Research Anti-
Plague Institute “Microbe”, Saratov, Russian Federation

Bugorkova S.A., PhD, MD (Medicine), Acting Chief,
Department of Immunology, Russian Research Anti-Plague
Institute “Microbe”, Saratov, Russian Federation

Поступила 18.04.2022
Принята к печати 22.05.2022

Received 18.04.2022
Accepted 22.05.2022

SNP ГЕНОВ МЕДИАТОРОВ ИММУННОГО ОТВЕТА И ПРЕДРАСПОЛОЖЕННОСТЬ К РАЗВИТИЮ СОЦИАЛЬНО ЗНАЧИМЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

Татаркова Е.А.¹, Тугуз А.Р.¹, Шумилов Д.С.¹, Муженя Д.В.²,
Руденко К.А.², Смольков И.В.¹

¹ ФГБОУ ВО «Адыгейский государственный университет», г. Майкоп, Республика Адыгея, Россия

² ФГБОУ ВО «Майкопский государственный технологический университет», г. Майкоп, Республика Адыгея, Россия

Резюме. Типирование аллельных вариантов SNPs генов может быть использовано в предиктивной медицине и при определении мишеней для наиболее эффективной стратегии лечения различных заболеваний.

Цель работы – исследовать ассоциацию однонуклеотидных полиморфизмов спектра генов воспаления – *IL10* (C819T; rs1800871; C592A; rs1800872), *IL4* (C589T; rs2243250), фиброза – *TGFβ1* (G915C; rs1800471), *MMP1* (1607insG; rs1799750), апоптоза – *TNFRSF11B* (G1181C; rs2073618), вазоконстрикции – *CRP* (C3872T; rs1205), *CYP1A1* (A2454G; rs1048943), эндотелиальной дисфункции – *EDN1* (G925T; rs5370), *NOS3* (C786T; rs2070744) с развитием ИБС, РМЖ, БА и угрожающего выкидыша на ранних сроках беременности у жителей Республики Адыгея.

Образцы ДНК неродственных доноров и больных (n = 74) с верифицированными в условиях лечебно-профилактических учреждений г. Майкопа Республики Адыгея (РА) диагнозами «бронхиальная астма» (n = 13), «ишемическая болезнь сердца» (n = 10), «рак молочной железы» (n = 10), угрожающим выкидышем в первом триместре беременности (n = 8) выделены из лейкоцитов периферической крови и типированы методом аллель-специфичной полимеразной цепной реакции с электрофоретической детекцией результатов на коммерческих тест-системах НПФ «Литех», Москва.

В исследовании на примере жителей РА экспериментально доказана статистическая значимость «нормального» *Arg25*-аллельного варианта гена *TGFβ1* ($p \leq 0,05$; $F = 0,038$; $OR = 3,231$; $95\% CI = 1,081-9,656$) в развитии бронхиальной астмы. Для групп с сердечно-сосудистыми, онкологическими заболеваниями и нарушениями гестационного процесса достоверных различий по SNP *rs1800471* гена *TGFβ1* не выявлено ($p > 0,05$). Распределение частот аллельных вариантов *C786T* гена *NOS3*, *G1181C* гена *TNFRSF11B*, *1607insG* гена *MMP1*, *G925T* гена *EDN1* и *A2454G* гена *CYP1A1* у обследованных больных с ИБС, РМЖ и в контрольной группе достоверно не различаются ($p > 0,05$). Статистическая значимость частот аллельных вариантов *rs1799750* гена *MMP1* при угрозе раннего выкидыша в I три-

Адрес для переписки:

Татаркова Елена Анатольевна
ФГБОУ ВО «Адыгейский государственный университет»
385000, Россия, Республика Адыгея, г. Майкоп,
ул. Первомайская, 208.
Тел.: 8 (962) 872-39-35.
Факс: 8 (8772) 57-02-73.
E-mail: warmwild@yandex.ru

Address for correspondence:

Tatarkova Elena A.
Adyghe State University
385000, Russian Federation, Republic of Adygheya,
Maikop, Pervomayskaya str., 108.
Phone: 7 (962) 872-39-35.
Fax: 7 (8772) 57-02-73.
E-mail: warmwild@yandex.ru

Образец цитирования:

Е.А. Татаркова, А.Р. Тугуз, Д.С. Шумилов,
Д.В. Муженя, К.А. Руденко, И.В. Смольков
«SNP генов медиаторов иммунного ответа и
предрасположенность к развитию социально значимых
заболеваний» // Медицинская иммунология, 2022. Т. 24,
№ 4. С. 751-764.
doi: 10.15789/1563-0625-SGO-2380
© Татаркова Е.А. и соавт., 2022

For citation:

E.A. Tatarkova, A.R. Tuguz, D.S. Shumilov, D.V. Muzhenya,
K.A. Rudenko, I.V. Smolkov "SNP genes of immune response
mediators and predisposition to development of socially
significant diseases", Medical Immunology (Russia)/
Meditsinskaya Immunologiya, 2022, Vol. 24, no. 4,
pp. 751-764.
doi: 10.15789/1563-0625-SGO-2380
DOI: 10.15789/1563-0625-SGO-2380

местре и у женщин с физиологическим течением беременности ($F = 0,096$; $p \leq 0,05\%$; $OR = 6,0$) приближается к достоверной, но с доверительным интервалом, пересекающим единицу ($95\% CI = 0,980-36,716$), что требует дальнейших исследований.

Полученные данные позволяют не только диагностировать предрасположенность к БА, но и разработать комплекс профилактических мероприятий с учётом индивидуальных особенностей каждого больного.

Ключевые слова: *IL10, IL4, TGFβ1, TNFRSF11B, CRP, EDN1, CYP1A1, NOS3, MMP1, бронхиальная астма, угроза прерывания беременности, рак молочной железы, сердечно-сосудистые заболевания, ишемическая болезнь сердца, воспаление*

SNP GENES OF IMMUNE RESPONSE MEDIATORS AND PREDISPOSITION TO DEVELOPMENT OF SOCIALLY SIGNIFICANT DISEASES

Tatarkova E.A.^a, Tuguz A.R.^a, Shumilov D.S.^a, Muzhenya D.V.^b, Rudenko K.A.^b, Smolkov I.V.^a

^a Adyghe State University, Maikop, Republic of Adygeya, Russian Federation

^b Maikop State Technological University, Maikop, Republic of Adygeya, Russian Federation

Abstract. Allele typing of single-nucleotide polymorphisms (SNPs) may be used in predictive medicine and to determine targets for the most effective treatment strategies for various diseases. The purpose of the present work was to investigate the association between the SNPs of inflammatory genes, e.g., *IL10* (*C819T*; *rs1800871*; *C592A*; *rs1800872*); *IL4* (*C589T*; *rs2243250*); fibrosis-related factors – *TGFβ1* (*G915C*; *rs1800471*); *MMP1* (*1607insG*; *rs1799750*); apoptosis-regulators (*TNFRSF11B G1181C*; *rs2073618*); vasoconstricting factors (*CRP C3872T*; *rs1205*); *CYP1A1* (*A2454G*; *rs1048943*), endothelial dysfunction (*EDN1 G925T*; *rs5370*); (*NOS3 C786T*; *rs2070744*) and development of coronary heart disorders, breast cancer, bronchial asthma (BA) and threatened miscarriage in early pregnancy among population of the Republic of Adygea.

DNA samples of unrelated donors and patients ($n = 74$) with verified diagnoses of bronchial asthma ($n = 13$), coronary heart disease ($n = 10$), breast cancer ($n = 10$) and threatened miscarriage in the first trimester of pregnancy ($n = 8$) were isolated from peripheral blood leukocytes and typed by allele-specific polymerase chain reaction with electrophoretic detection of results using commercial tests-systems of NPF “Litech”, Moscow.

The study in a group of Adygea residents has revealed the statistical significance for the “normal” *Arg25*-allelic variant of the *TGFβ1* gene ($p \leq 0.05$; $F = 0.038$; $OR = 3.231$; $95\% CI = 1.081-9.656$) in the development of bronchial asthma. There were no significant differences in SNP *rs1800471* of the *TGFβ1* gene in the groups with cardiovascular, oncological diseases and gestational disorders ($p > 0.05$). The frequency distribution of allelic variants *NOS3 C786T*; *TNFRSF11B G1181C*; *1607insG* of the *MMP1* gene; *G925T* of the *EDN1* gene, and *CYP1A1 2454G* in the examined patients with cardiovascular disease and breast cancer did not significantly differ from the control group ($p > 0.05$). The statistical significance for the frequency of allelic variants *rs1799750* (*MMP1* gene) in cases of threatened early miscarriage and in women with a physiological course of pregnancy ($F = 0.096$; $p \leq 0.05\%$; $OR = 6.0$) was close to reliable, but with a confidence interval > 1.0 ($95\% CI = 0,980-36,716$), thus requiring further research.

The obtained data could be sufficient in order to suggest predisposition for bronchial asthma, as well as to develop a set of preventive measures taking into account the individual characteristics of each patient.

Keywords: *IL10, IL4, TGFβ1, TNFRSF11B, CRP, EDN1, CYP1A1, NOS3, MMP1, single-nucleotide polymorphisms, bronchial asthma, pregnancy loss, breast cancer, cardiovascular diseases, inflammation*

Работа выполнена на базе иммуногенетической лаборатории Научно-исследовательского института комплексных проблем Адыгейского государственного университета.

Введение

Ключевые этапы физиологических и патологических процессов регулируются эндогенными низкомолекулярными соединениями — посредниками (медиаторами), которые продуцируются в очаге повреждения, запускают цитокиновый каскад и действуют синергично на системном уровне. К основным механизмам развития и прогрессирования неинфекционных заболеваний относят: воспаление (*IL10*, *IL4*), фиброз (*TGFβ1*), эндотелиальную дисфункцию (*NOS*), нарушение метаболизма ксенобиотиков (*CYP1A1*) и др. Гиперпродукция про-/противовоспалительных медиаторов, молекул адгезии и других факторов, обусловленная мутациями соответствующих генов, трансформация моноцитов/макрофагов, миоцитов и клеток иммунной системы могут усугублять течение мультифакториальных заболеваний [6, 7, 9].

Генетически детерминированные реакции организма на экзо- и эндогенное флогогенное воздействие повреждающих факторов относятся к фундаментальным общебиологическим проблемам, т.к. большинство (70-80%) нозологий

человека ассоциированы с воспалительными процессами, протекающими с максимальным напряжением компенсаторных механизмов организма [10]. В международных базах данных (NCBI, PubMed, Medline, HuGe Navigator, Elsevir, Springer, Scopus, Science Research Portal, Science Direct, Google Scholar, КиберЛенинка) опубликованы результаты многоцентровых исследований по наследуемым единичным нуклеотидным полиморфизмам (SNPs — single nucleotide polymorphisms) промоторных регионов генов, ассоциированных с мультифакториальными социально значимыми заболеваниями: онкологическими, сердечно-сосудистыми (ССЗ), хроническими неспецифическими воспалительными заболеваниями легких (бронхиальная астма — БА), сахарным диабетом, невынашиванием беременности и другими нозологиями, влияющими на демографические показатели. Аллельные варианты генов, определяющие уникальный генетический профиль, оказывают специфическое модулирующее действие на функционирование биохимических каскадов, индивидуальный ответ организма [2, 3, 6, 7, 9, 13]. Поиск и анализ SNPs, регулирующих экспрессию генов воспалительного ответа, становится важной задачей предиктивной (предсказательной) досимптоматической диагностики для осуществления превентивных мер [2, 3, 4, 6, 7, 10] (табл. 1).

ТАБЛИЦА 1. ОСНОВНЫЕ ГЕНЫ, ВОВЛЕЧЕННЫЕ В РАЗВИТИЕ ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ПРОЦЕССОВ И ПАТОГЕНЕЗ СОЦИАЛЬНО ЗНАЧИМЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ (БАЗА ДАННЫХ HuGE NAVIGATOR)*

TABLE 1. MAIN GENES INVOLVED IN THE DEVELOPMENT OF INFLAMMATORY PROCESSES AND THE PATHOGENESIS OF SOCIALLY SIGNIFICANT DISEASES (HuGE NAVIGATOR DATABASE)*

Ген Gene	Общее количество публикаций Total number of publications	Количество метаанализов Number of meta-analyses	Ген Gene	Общее количество публикаций Total number of publications	Количество метаанализов Number of meta-analyses
<i>TNF</i>	504	19	<i>TGFβ1</i>	128	6
<i>IL6</i>	474	15	<i>IL4</i>	125	4
<i>IL10</i>	347	11	<i>PTGS2</i>	119	6
<i>IL1B</i>	338	9	<i>APOE</i>	118	5
<i>CRP</i>	219	6	<i>NOS3</i>	66	0
<i>IL1RN</i>	162	6	<i>TNFRSF11B</i>	31	2
<i>TLR4</i>	159	3	<i>MMP1</i>	18	0
<i>IL1A</i>	139	5	<i>EDN1</i>	15	0
<i>IL8</i>	133	2	<i>CYP1A1</i>	13	1

Примечание. Указаны названия генов, число публикаций по которым превышает 100 ($n \geq 100$), а также те гены, которые были рассмотрены в данной работе (выделены полужирным шрифтом). Дата обращения: декабрь 2020. * — Поиск: Inflammation [Воспаление].

Note. The names of the genes whose number of publications exceeds 100 ($n \geq 100$), as well as those genes that were considered in this paper are indicated (in bold). Accessed: December 2020. * — Search query: Inflammation.

В связи с вышеизложенным, представляется целесообразным исследовать ассоциацию полиморфизмов генов цитокинов (интерлейкинов *IL10*, *IL4*, фактора некроза опухоли альфа — *TNFα*) и их растворимых рецепторов (*TNFRSF11B*), ростовых факторов (трансформирующий фактор роста бета — *TGFβ1*), молекул адгезии, внеклеточных Zn-зависимых эндопептидаз (матриксных металлопротеиназ — MMP), эндотелиальной синтазы оксида азота третьего типа (*NOS3*) и других медиаторов, вовлеченных в патофизиологические механизмы развития ишемической болезни сердца (ИБС), БА, рака молочной железы (РМЖ), гестационных осложнений. Типирование аллельных вариантов SNPs генов может быть использовано в предиктивной медицине и при определении мишеней для наиболее эффективной стратегии лечения различных заболеваний [6, 25].

Цель исследования — типировать аллельные варианты генов медиаторов иммунной системы *IL10* (C819T; rs1800871; C592A; rs1800872), *IL4* (C589T; rs2243250), *TGFβ1* (G915C; rs1800471), *TNFRSF11B* (G1181C; rs2073618), *CRP* (C3872T; rs1205), *EDN1* (G925T; rs5370), *CYP1A1* (A2454G; rs1048943), *NOS3* (C786T; rs2070744), *MMP1* (1607insG; rs1799750) у жителей Республики Адыгея при ИБС, РМЖ, БА и угрожающем выкидыше на ранних сроках беременности.

Материалы и методы

Всего обследовано 74 жителя Республики Адыгея (РА), распределенных в зависимости от исследуемой нозологии на 6 групп: 1) БА (n = 13) — больные пульмонологического отделения Адыгейской республиканской клинической больницы (АРКБ, г. Майкоп) 24–59 лет (средний возраст $45,5 \pm 11$) с тяжелыми формами бронхиальной астмы, диагностированными в соответствии с критериями GINA (2011); 2) ИБС (n = 10) — пациенты неврологического и нейрохирургического отделений АРКБ, 34–56 лет (средний возраст $42 \pm 6,9$) с верифицированным диагнозом «ишемическая болезнь сердца»; 3) РМЖ (n = 10) — женщины Адыгейского республиканского клинического онкологического диспансера (АРКОД) 34–58 лет (средний возраст $48 \pm 8,6$) с гистологически верифицированными диагнозами «злокачественные новообразования женских репродуктивных органов» (аденокарцинома молочной железы) в период после оперативного вмешательства; 4) угроза выкидыша (n = 8) — женщины 19–31 лет (средний возраст $26,2 \pm 4,4$) с угрозой прерывания беременности на ранних сроках (I триместр — до 13 недель), в анамнезе которых были случаи выкидышей; 5) контрольная группа (n = 18) представлена не-

родственными здоровыми жителями РА (20–45 лет, средний возраст $25 \pm 6,7$), подобранными эмпирически, без клинических проявлений и наследственной отягощенности по ССЗ, БА, что подтверждено данными опроса (анкетирования) и обследования в условиях лечебно-профилактических учреждений РА; 6) контрольная группа (женщины) (n = 15) — здоровые жительницы РА (20–45 лет, средний возраст $26 \pm 5,7$) без гестационных осложнений в анамнезе и прерывания беременности, родившие 1 и более здорового ребенка, а также без наследственной отягощенности и клинических проявлений онкологических и сердечно-сосудистых заболеваний.

При включении больного в исследование фиксировались результаты объективного осмотра, анамнеза, сведения о проводимой терапии, течении заболевания. Диагнозы подтверждены результатами неинвазивных скрининговых и углубленных инструментальных методов исследования.

Критерии исключения пациентов из исследования: острые и хронические воспалительные заболевания, сахарный диабет, алкоголизм, почечная недостаточность. 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 РФ», утвержденными приказом Минздрава РФ от 19.06.2003 г. № 266, все исследования проведены с информированного согласия каждого обследуемого.

Геномная ДНК из лейкоцитов периферической крови жителей РА выделена термокоагуляционным методом с помощью реагента «ДНК-экспресс-кровь» (НПФ «Литех», Москва). Чистота и концентрации образцов ДНК тестированы на спектрофотометре NanoDrop 2000c (Thermo Scientific, США).

Полиморфизмы генов *IL10* (C819T; C592A), *IL4* (C589T), *TGFβ1* (G915C), *TNFRSF11B* (G1181C), *CRP* (C3872T), *EDN1* (G925T), *CYP1A1* (A2454G), *NOS3* (C786T), *MMP1* (1607insG) исследованы SNP-методом на коммерческих тест-системах НПФ «Литех» (Москва) с электрофоретической детекцией результатов. Статистически значимыми считались различия при $p \leq 0,05$. Сила ассоциаций оценивалась в значениях показателя отношения шансов (OR — odds ratio, мера коррелятивной связи), указанного с 95% доверительным интервалом (95% CI — confidence interval).

С помощью программы STRING 10.0 (Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins; доступна по адресу: <http://string-db.org>) *in silico* проанализированы белок-белковые взаимодействия, кодируемые генами *IL10*, *IL4*, *TGFβ1*,

TNFRSF11B, CRP, EDN1, CYP1A1, NOS3 и MMP1. Число узлов (белков) и число ребер (количество взаимодействий) характеризуют соответствующие сети.

Результаты

В экспериментальных исследованиях, проведенных в иммуногенетической лаборатории НИИ КП АГУ (г. Майкоп), в сравнении с международными данными по европейским популяциям (Ensembl, проект «1000 геномов», дата обращения 6.04.2021 г.) проанализировано распределение частот «нормальных» и «минорных» аллелей целевых генов *IL10* (C/T; C/A), *IL4* (C/T), *TGFβ1* (G/C), *TNFRSF11B* (G/C), *CRP* (C/T), *EDN1* (G/T), *CYP1A1* (A/G), *NOS3* (C/T), *MMP1* (1607insG) для жителей Республики Адыгея (табл. 2, 3).

Практически для всех исследованных полиморфизмов генов медиаторов воспаления (за исключением *rs1800872* гена *IL-10* и *rs1799750* гена *MMP1*) частоты аллельных вариантов в контрольных группах не отличались от аналогичных значений в Европейских популяциях (табл. 2, 3). Экспериментально нами установлено, что полиморфные варианты генов *IL10* (C819T и C592A), *CRP* (C3872T), *IL4* (C589T), *NOS3* (C786T), *TNFRSF11B* (G1181C), *EDN1* (G925T) и *CYP1A1* (A2454G) у жителей Республики Адыгея достоверно не ассоциированы с развитием ишемической болезни сердца, бронхиальной астмы, рака молочной железы и угрозы прерывания беременности в I триместре.

В частотном распределении других однонуклеотидных замен — C786T гена *NOS3*, C3872T гена *CRP*, 1607insG гена *MMP1*, G925T гена *EDN1* и A2454G гена *CYP1A1* — у обследованных больных ИБС, БА, РМЖ и в контрольных группах также не выявлено достоверных различий (табл. 3). Однако у женщин с угрозой раннего выкидыша в I триместре и с физиологическим течением беременности установлена статистическая значимость ($F = 0,096$; $p \leq 0,05\%$; $OR = 6,0$) в распределении частот аллельных вариантов *rs1799750* гена *MMP1*, но так как доверительный интервал пересекает единицу ($95\% CI = 0,980-36,716$), это требует проведения дополнительных исследований на большей выборке для подтверждения ассоциации полиморфизма 1607insG гена *MMP1* с осложненным течением беременности.

Преобладающая в европейских популяциях «дикая», или нормальная, A2454-аллель SNP A2454G гена *CYP1A1* (*rs1048943*) типизируется у пациентов с патологиями и у здоровых лиц в 96,5-100% случаев, а «минорная» -2454G аллель — менее чем у 5% во всех исследованных группах, кроме больных с БА (28,6%; табл. 3).

Трансформирующий фактор роста бета (TGF-β1) — важный иммунный медиатор, который оказывает плеiotропные эффекты на контроль пролиферации и дифференцировки различных типов клеток, активацию специфического иммунитета, ангиогенез, функционирование нейронов, регенерацию тканей и эмбриональное развитие, канцерогенез и т.д. [19, 20]. Также TGF-β1 является основным медиатором, участвующим в провоспалительных реакциях и ремоделировании фиброзной ткани при астме [3, 17]. SNP *G915C* гена *TGFβ1* в 1 экзоне приводит к замене аминокислоты аргинин (Arg) на пролин (Pro) в кодоне 25 с последующим снижением экспрессии белкового продукта [9]. Сравнительный анализ распределения частот аллельных вариантов SNP *rs1800471* гена *TGFβ1* в обследованных группах жителей Республики Адыгея представлен в таблице 4.

Достоверность ассоциации исследованного SNP (*rs1800471*) гена *TGFβ1* с риском развития патологии установлена только у больных с бронхиальной астмой: для «нормального» Arg25-полиморфного варианта гена *TGFβ1* $p \leq 0,05$; $F = 0,038$; $OR = 3,231$; $95\% CI = 1,081-9,656$. В обследованных группах больных с сердечно-сосудистыми, онкологическими заболеваниями и нарушениями гестационного процесса достоверных различий в распределении частот *rs1800471* *TGFβ1* не выявлено ($p > 0,05$). У здоровых лиц по сравнению с группами больных незначительное повышение частот патологической -25Pro аллели *TGFβ1* сопоставимо с результатами аналогичных исследований для населения Польши, Туниса, Северной Индии [13, 15, 18]. Популяционные вариации в распределении SNP гена *TGFβ1* в цитируемых источниках могут быть обусловлены этнической спецификой, а также родственными и отдаленными межгенными взаимодействиями [15].

Однонуклеотидные полиморфные варианты в регуляторных участках генов влияют на уровень экспрессии, опосредуя специфику биологических эффектов кодируемых протеинов [6]. Функциональные взаимодействия между белковыми продуктами 9 исследованных генов выявлены в программе STRING database (рис. 1).

Анализ в программе STRING выявил наибольшую силу белок-белковых взаимодействий для *IL4 — IL10*, *NOS3 — EDN1* и *IL10 — CRP* (рис. 1). Девять узлов (или белковых продуктов целевых генов) участвуют в 24 взаимодействиях, что значительно превышает три случайных взаимодействия. 7 из 9 генов (*IL10*, *IL4*, *TGFβ1*, *TNFRSF11B*, *CRP*, *NOS3*, *MMP1*) относятся к реакционному пути (путь сигнализации в иммун-

ТАБЛИЦА 2. ЧАСТОТЫ АЛЛЕЛЬНЫХ ВАРИАНТОВ ПОЛИМОРФИЗМОВ C819T, C592A ГЕНА IL10, C589T ГЕНА IL4 И G1181C ГЕНА TNFRSF11B В ИССЛЕДУЕМЫХ ГРУППАХ ПО СРАВНЕНИЮ С ГРУППАМИ КОНТРОЛЯ

TABLE 2. FREQUENCIES OF ALLELIC VARIANTS OF POLYMORPHISMS C819T, C592A OF THE IL10 GENE, C589T OF THE IL4 GENE, AND G1181C OF THE TNFRSF11B GENE IN THE STUDY GROUPS COMPARED TO THE CONTROL GROUPS

SNP	Анализируемые группы Analyzed groups	Частоты аллелей Allele frequencies		F (p)
		«N», %	«Pt», %	
IL10 rs1800871 (C819T)	Мировые данные (Европа)* World data (Europe)*	0,760	0,240	—
	Контроль (n = 16) Control (n = 16)	0,719	0,281	—
	Контроль (женщины) (n = 7) Control (women) (n = 7)	0,714	0,286	—
	Бронхиальная астма (n = 12) Bronchial asthma (n = 12)	0,750	0,250	1,0 (> 0,05)
	Ишемическая болезнь сердца (n = 10) Coronary heart disease (n = 10)	0,700	0,300	1,0 (> 0,05)
	Рак молочной железы (n = 10) Breast cancer (n = 10)	0,750	0,250	1,0 (> 0,05)
	Женщины с угрозой выкидыша (n = 9) Women with threatened miscarriage (n = 9)	0,556	0,444	0,471 (> 0,05)
IL10 rs1800872 (C592A)	Мировые данные (Европа)* World data (Europe)*	0,760	0,240	—
	Контроль (n = 16) Control (n = 16)	0,469	0,531	—
	Контроль (женщины) (n = 12) Control (women) (n = 12)	0,375	0,625	—
	Бронхиальная астма (n = 11) Bronchial asthma (n = 11)	0,455	0,545	1,0 (> 0,05)
	Ишемическая болезнь сердца (n = 10) Coronary heart disease (n = 10)	0,400	0,600	0,776 (> 0,05)
	Рак молочной железы (n = 10) Breast cancer (n = 10)	0,600	0,400	0,225 (> 0,05)
	Женщины с угрозой выкидыша (n = 7) Women with threatened miscarriage (n = 7)	0,571	0,429	0,318 (> 0,05)
IL4 rs2243250 (C589T)	Мировые данные (Европа)* World data (Europe)*	0,832	0,168	—
	Контроль (n = 16) Control (n = 16)	0,875	0,125	—
	Контроль (женщины) (n = 12) Control (women) (n = 12)	0,857	0,143	—
	Бронхиальная астма (n = 13) Bronchial asthma (n = 13)	0,846	0,154	1,0 (> 0,05)
	Ишемическая болезнь сердца (n = 10) Coronary heart disease (n = 10)	0,900	0,100	1,0 (> 0,05)
	Рак молочной железы (n = 10) Breast cancer (n = 10)	0,722	0,278	0,426 (> 0,05)
	Женщины с угрозой выкидыша (n = 7) Women with threatened miscarriage (n = 7)	0,929	0,071	1,0 (> 0,05)

Таблица 2 (окончание)
Table 2 (continued)

SNP	Анализируемые группы Analyzed groups	Частоты аллелей Allele frequencies		F (p)
		«N», %	«Pt», %	
TNFRSF11B rs2073618 (G1181C)	Мировые данные (Европа)* World data (Europe)*	0,533	0,467	—
	Контроль (n = 12) Control (n = 12)	0,625	0,375	—
	Контроль (женщины) (n = 4) Control (women) (n = 4)	0,625	0,375	—
	Бронхиальная астма (n = 8) Bronchial asthma (n = 8)	0,563	0,437	0,750 (> 0,05)
	Ишемическая болезнь сердца (n = 10) Coronary heart disease (n = 10)	0,700	0,300	0,752 (> 0,05)
	Рак молочной железы (n = 10) Breast cancer (n = 10)	0,550	0,450	1,0 (> 0,05)
	Женщины с угрозой выкидыша (n = 5) Women with threatened miscarriage (n = 5)	0,400	0,600	0,637 (> 0,05)

Примечание. «N» – нормальная аллель, «Pt» – мутантная аллель, F – точный критерий Фишера (двусторонний), OR (odds-ratio) – отношение шансов при уровне значимости $p \leq 0,05$ и 95% доверительном интервале (95% CI).

* По данным международной базы данных Ensembl (проект «1000 геномов», <https://www.ensembl.org/index.html>, дата обращения 11.01.2021).

Note. “N”, normal allele; “Pt”, mutant allele; F, Fisher criterion (two-sided); OR (odds-ratio), the odds ratio at a significance level of $p \leq 0.05$ and a 95% confidence interval (95% CI).

* According to the Ensembl international database (the 1000 Genomes Project, <https://www.ensembl.org/index.html>, accessed 11.01.2021).

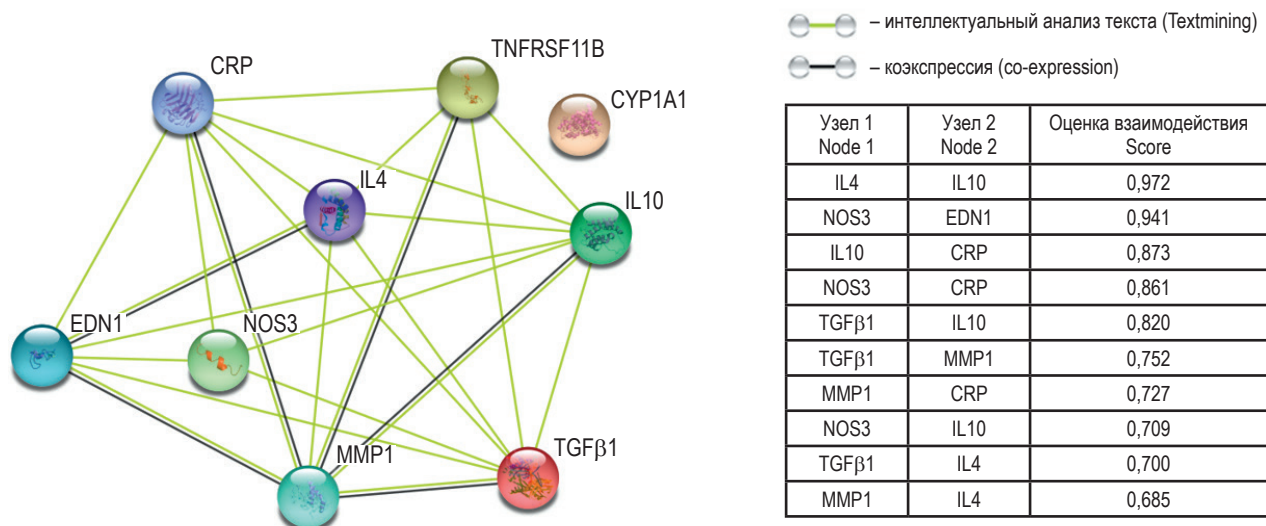


Рисунок 1. STRING анализ взаимодействий между белками, кодируемыми исследованными в работе генами – IL10, IL4, TGFβ1, TNFRSF11B, CRP, EDN1, CYP1A1, NOS3, MMP1

Примечание. Количество узлов: 9; количество ребер: 24; средняя степень узла: 5,33; средний коэффициент локальной кластеризации: 0,796; ожидаемое количество ребер: 3; р-значение обогащения PPI: 3e-15.

Figure 1. STRING analysis of interactions between proteins encoded by the studied genes – IL10, IL4, TGFβ1, TNFRSF11B, CRP, EDN1, CYP1A1, NOS3, MMP1

Note. Number of nodes: 9; number of edges: 24; average node degree: 5,33; avg. local clustering coefficient: 0,796; expected number of edges: 3; PPI enrichment p-value: 3e-15.

ТАБЛИЦА 3. ЧАСТОТЫ АЛЛЕЛЬНЫХ ВАРИАНТОВ ПОЛИМОРФИЗМОВ C786T ГЕНА NOS3, C3872T ГЕНА CRP, 1607insG ГЕНА MMP1, G925T ГЕНА EDN1 И A2454G ГЕНА CYP1 В ИССЛЕДУЕМЫХ ГРУППАХ ПО СРАВНЕНИЮ С ГРУППАМИ КОНТРОЛЯ

TABLE 3. FREQUENCIES OF ALLELIC VARIANTS OF POLYMORPHISMS C786T OF THE NOS3 GENE, C3872T OF THE CRP GENE, 1607insG OF THE MMP1 GENE, G925T OF THE EDN1 GENE, AND A2454G OF THE CYP1 GENE IN THE STUDY GROUPS COMPARED TO THE CONTROL GROUPS

SNP	Анализируемые группы Analyzed groups	Частоты аллелей Allele frequencies		F (p)
		«N», %	«Pt», %	
NOS3 rs2070744 (C786T)	Мировые данные (Европа)* World data (Europe)*	0,438	0,562	—
	Контроль (n = 18) Control (n = 18)	0,417	0,583	—
	Контроль (женщины) (n = 9) Control (women) (n = 9)	0,500	0,500	—
	Бронхиальная астма (n = 12) Bronchial asthma (n = 12)	0,292	0,708	0,416 (> 0,05)
	Ишемическая болезнь сердца (n = 8) Coronary heart disease (n = 8)	0,563	0,437	0,378 (> 0,05)
	РМЖ (n = 10) BC (n = 10)	0,450	0,550	1,0 (> 0,05)
	Женщины с угрозой выкидыша (n = 6) Women with threatened miscarriage (n = 6)	0,250	0,750	0,260 (> 0,05)
CRP rs1205 (C3872T)	Мировые данные (Европа)* World data (Europe)*	0,690	0,310	—
	Контроль (n = 15) Control (n = 15)	0,600	0,400	—
	Контроль (женщины) (n = 13) Control (women) (n = 13)	0,654	0,346	—
	Бронхиальная астма (n = 11) Bronchial asthma (n = 11)	0,636	0,364	1,0 (> 0,05)
	Ишемическая болезнь сердца (n = 10) Coronary heart disease (n = 10)	0,800	0,200	0,217 (> 0,05)
	РМЖ (n = 10) BC (n = 10)	0,550	0,450	0,550 (> 0,05)
	Женщины с угрозой выкидыша (n = 7) Women with threatened miscarriage (n = 7)	0,857	0,143	0,686 (> 0,05)
MMP1 rs1799750 (1607insG)	Мировые данные (Европа)* World data (Europe)*	0,504	0,496	—
	Контроль (n = 15) Control (n = 15)	0,367	0,633	—
	Контроль (женщины) (n = 16) Control (women) (n = 16)	0,333	0,667	—
	Бронхиальная астма (n = 10) Bronchial asthma (n = 10)	0,650	0,350	0,08 (> 0,05)
	Ишемическая болезнь сердца (n = 8) Coronary heart disease (n = 8)	0,389	0,611	1,0 (> 0,05)
	РМЖ (n = 9) BC (n = 9)	0,556	0,444	0,211 (> 0,05)
	Женщины с угрозой выкидыша (n = 4) Women with threatened miscarriage (n = 4)	0,750	0,250	0,096 (≤ 0,05)

Таблица 3 (окончание)
Table 3 (continued)

SNP	Анализируемые группы Analyzed groups	Частоты аллелей Allele frequencies		F (p)
		«N», %	«Pt», %	
EDN1 rs5370 (G925T)	Мировые данные (Европа)* World data (Europe)*	0,787	0,213	–
	Контроль (n = 17) Control (n = 17)	0,794	0,206	–
	Контроль (женщины) (n = 15) Control (women) (n = 15)	0,800	0,200	–
	Бронхиальная астма (n = 5) Bronchial asthma (n = 5)	1,000	0,000	0,177 (> 0,05)
	Ишемическая болезнь сердца (n = 8) Coronary heart disease (n = 8)	0,938	0,062	0,409 (> 0,05)
	РМЖ (n = 9) BC (n = 9)	0,889	0,111	0,692 (> 0,05)
	Женщины с угрозой выкидыша (n = 7) Women with threatened miscarriage (n = 7)	0,786	0,214	1,0 (> 0,05)
CYP1A1 rs1048943 (A2454G)	Мировые данные (Европа)* World data (Europe)*	0,965	0,035	–
	Контроль (n = 17) Control (n = 17)	0,941	0,059	–
	Контроль (женщины) (n = 15) Control (women) (n = 15)	0,967	0,033	–
	Бронхиальная астма (n = 7) Bronchial asthma (n = 7)	0,714	0,286	0,570 (> 0,050)
	Ишемическая болезнь сердца (n = 9) Coronary heart disease (n = 9)	0,944	0,056	1,0 (> 0,05)
	РМЖ (n = 10) BC (n = 10)	0,950	0,050	1,0 (> 0,05)
	Женщины с угрозой выкидыша (n = 7) Women with threatened miscarriage (n = 7)	1,000	0,000	1,0 (> 0,05)

Примечание. См. примечание к таблице 1.

Note. As for Table 2.

ной системе – HSA-168256), упомянутому в базе данных STRING. Три белковых продукта (*IL4*, *EDN1*, *CYP1A1*) вовлечены в биологический процесс метаболизма липидов. Прогнозируемые функциональные партнеры для данной сети включают EDNRA (рецептор эндотелина-1), *EDNRB* (рецептор эндотелина типа B), *IL4R* (субъединица альфа рецептора интерлейкина-4), *TNFSF11* (цитокин семейства факторов некроза опухоли и лиганд для рецепторов *TNFRSF11B/OPG* и *TNFRSF11A/RANK*), *AKT1* (кодирует фер-

мент RAC-альфа-серин/треонин-протеинкиназу, регулирующую многие процессы, в том числе метаболизм, пролиферацию, рост, ангиогенез и выживание клеток).

Обсуждение

Дисрегуляция и трансформация базовой воспалительной реакции с чрезмерным пролонгированным (хроническим) течением приводит к деградации межклеточного матрикса, усилению

ТАБЛИЦА 4. ЧАСТОТЫ АЛЛЕЛЬНЫХ ВАРИАНТОВ ПОЛИМОРФИЗМА *Arg25Pro* (G915C, rs1800471) ГЕНА *TGFβ1* В ИССЛЕДУЕМЫХ ГРУППАХ ПО СРАВНЕНИЮ С ГРУППАМИ КОНТРОЛЯ

TABLE 4. FREQUENCIES OF ALLELIC VARIANTS OF THE *Arg25Pro* (G915C, rs1800471) POLYMORPHISM OF THE *TGFβ1* GENE IN THE STUDY GROUPS COMPARED TO THE CONTROL GROUPS

Аллели Alleles	Больные Patients	Контроли Controls	F (p)	OR	
	n = 12 ¹ ; 9 ² ; 10 ³ ; 7 ⁴	n = 17 ^{1,2} ; 15 ^{3,4}		знач.	95% CI
Бронхиальная астма ¹ Bronchial asthma ¹					
Arg25-, %	0,667	0,382	0,038 (≤ 0,05)	3,231	1,081-9,656
-25Pro, %	0,333	0,618		0,310	0,104-0,925
Ишемическая болезнь сердца ² Coronary heart disease ²					
Arg25-, %	0,556	0,382	0,257 (> 0,05)	2,019	0,634-6,433
-25Pro, %	0,444	0,618		0,495	0,155-1,578
Рак молочной железы ³ Breast cancer ³					
Arg25-, %	0,500	0,500	0,030 (> 0,05)	1,308	0,420-4,071
-25Pro, %	0,500	0,500		0,765	0,246-2,381
Угроза прерывания беременности в I триместре ⁴ Threatened miscarriage in the first trimester ⁴					
Arg25-, %	0,500	0,500	0,774 (> 0,05)	1,308	0,366-4,668
-25Pro, %	0,500	0,500		0,765	0,214-2,730

Примечание. F – точный критерий Фишера (двусторонний), OR (odds-ration) – отношение шансов при уровне значимости $p \leq 0,05$ и 95% доверительном интервале (95% CI).

Note. F, Fisher criterion (two-sided); OR (odds-ration), the odds ratio at a significance level of $p \leq 0.05$ and a 95% confidence interval (95% CI).

фиброза, стимуляции роста опухолей, к гибели жизнеспособных кардиомиоцитов и т.д. [6, 8]. Синдром системной воспалительной реакции (ССВР) на повреждающий стимул развивается с участием гуморальных и клеточных звеньев иммунной системы: медиаторов воспаления (цитокинов и их растворимых рецепторов), ростовых факторов ($TGF-\beta$), С-реактивного белка (СРБ), внеклеточных Zn-зависимых эндопептидаз (матриксных металлопротеиназ – MMP), моноцитов/макрофагов, нейтрофилов, фибробластов, тромбоцитов, эндотелиальных, гладкомышечных и других клеток [1, 14]. Острофазовый ответ при сердечно-сосудистых заболеваниях нарушает работу многих органов (легких, почек, скелетной мускулатуры и т.д.), что, соответственно, приводит к легочной гипертензии, мышечной слабости и задержке ионов натрия [13].

Полиморфизмы генов *IL10*(C819T; C592A), *IL4* (C589T), *TNFRSF11B* (G1181C), *TGFβ1* (G915C), *CRP* (C3872T), *EDN1* (G925T), *CYP1A1* (A2454G), *NOS3* (C786T), *MMP1* (1607insG) могут влиять на развитие патофизиологической стадии и тяжесть клинических проявлений социально значимых

заболеваний, что подтверждается публикациями в международных базах данных (HuGE Navigator, PubMed, NCBI, дата обращения 09.2020). Ассоциация однонуклеотидных полиморфизмов спектра генов с патофизиологическими процессами при воспалении (*IL10*, *IL4*), апоптозе (*TNFRSF11B*), сосудистых реакциях (вазоконстрикции) (*CRP*), эндотелиальной дисфункции (*NOS*, *EDN1*), фиброзе (*TGFβ1*, *MMP1*) и нарушениях метаболизма ксенобиотиков (*CYP1A1*) исследована на примере жителей РА. Отбор генов и SNP, участвующих в трансформации базовой воспалительной реакции при развитии мультифакториальных заболеваний основан на тщательном анализе международных информационных баз данных (МБД) (табл. 1).

Ген *IL10* кодирует плейотропный интерлейкин-10, который подавляет действие предшественника воспалительного транскрипционного фактора NF-κB и проявляет противовоспалительный эффект путем ингибирования синтеза $IFN\gamma$, $TNF\alpha$, IL-6, IL-23. IL-10 усиливает пролиферацию В-клеток и продукцию антител, используемых в иммунотерапевтической страте-

гии [16, 21, 24, 25]. Однако в проведенном Zuo S. и соавт. (2020) метаанализе и у жителей Адыгеи *T819C* полиморфизм гена *IL10* (*rs1800871*) не ассоциирован с риском развития ишемического инсульта (табл. 2) [26]. По результатам метаанализа, проведенного в 2021 году Wang K. и соавт. в Китае, генетический полиморфизм *rs1800872* гена *IL10* в гетерозиготной (*C592A*) и в доминантной модели (*C592A+A592A*) наследования снижает риск развития рака шейки матки [23]. Высокая частота (40-60%) патологической *-592A* аллели (*rs1800872*) гена *IL10* в группах больных и здоровых жителей РА исключает возможность его использования в качестве прогностически значимого фактора.

Регуляторный IL-4 уравнивает эффекты провоспалительных медиаторов I типа и опосредует такие реакции организма-хозяина, как аллергические, антипаразитарные, ранозаживляющие и острые воспаления. Типированный «нормальный» *C589*-аллельный вариант гена *IL4* (*rs2243250*), преобладающий в европейских популяциях и у здоровых жителей РА, не ассоциирован ни с одним из заболеваний, приведенных в таблице 2.

Аналогичные результаты получены и для SNP CRP (C-reactive protein provided — С-реактивный белок) — важного регуляторного белка, участвующего в каскаде воспалительных процессов, включая активацию комплемента, апоптоз, фагоцитоз, высвобождение оксида азота (NO) и секрецию таких цитокинов, как IL-6, TNF α и др. Известны патогенетические механизмы развития ССЗ с участием С-реактивного белка: снижение продукции NO, подавление *in vitro* ангиогенеза, миграции клеток, образования капиллярных сетей, что повышает риск развития сердечно-сосудистых заболеваний, поэтому для жителей РА представляется целесообразным типирование других SNP или секвенирование гена CRP [22].

Эндотелиальная синтаза оксида азота 3 типа (*NOS3*), участвующая в синтезе сигнальной молекулы оксида азота, вовлечена в патогенез заболеваний с неустановленным этиологическим фактором: ССЗ, нарушений имплантации и бронхиальной астмы [12]. Внутриклеточный мессенджер NOS может проявлять двойственный эффект, что в свою очередь зависит от полиморфных вариантов и клеточных линий, продуцирующих маркер атопического воспаления при БА — оксид азота II (NO). Несмотря на участие *NOS3* в патофизиологических процессах и достоверную ассоциацию *C786T* гена *NOS3* с клиническими проявлениями бронхиальной астмы по данным информационных баз (NCBI, PubMed, Medline, «КиберЛенинка»), у жителей РА экспериментально не подтверждена статистическая

значимость связи *C786T* гена *NOS3* с бронхиальной астмой (табл. 3).

Эндотелин-1 (EDN1) — пептид с мощным сосудосуживающим эффектом, а его родственные рецепторы являются терапевтическими мишенями при лечении легочной гипертензии. Аберрантная экспрессия этого гена может способствовать развитию опухолевого процесса, однако у пациентов с гистологически верифицированным диагнозом «аденокарцинома молочной железы», в отличие от здоровых женщин, не выявлено статистически значимых отличий в распределении *G925T* полиморфизма гена *EDN1* (*rs5370*).

Статистическая достоверность различий по частотам «дикого» и «мутантного» аллельных вариантов SNP получены для трансформирующего фактора роста бета-1 (TGF β 1) — основного медиатора, участвующего в провоспалительных реакциях и ремоделировании фиброзной ткани при астме [17]. У жителей РА с бронхиальной астмой повышена частота «нормальной» *Arg25*-аллели гена *TGF β 1* ($p \leq 0,05$; $F = 0,038$; $OR = 3,231$; 95% $CI = 1,081-9,656$) (табл. 4), что подтверждается исследованиями Лебедева А.А. и соавт. (2018). Вероятно, у носителей генотипа *Arg25Arg* по сравнению с носителями генотипа *Pro25Pro* будут наблюдаться более быстрые и существенные изменения структуры тканей бронхов в ответ на действие аллергена и, следовательно, более тяжелое течение заболевания [3]. Для больных сердечно-сосудистыми, онкологическими заболеваниями и нарушениями гестационного процесса достоверных различий по однонуклеотидному полиморфизму *rs1800471* гена *TGF β 1* не выявлено ($p > 0,05$). Незначительное повышение частот патологической *-25Pro* аллели *TGF β 1* у здоровых лиц РА по сравнению с группами больных сопоставимо с результатами аналогичных исследований в Польше, Тунисе, Северной Индии [13, 15, 18].

Эмбриональное развитие, пролиферация, дифференцировка, ремоделирование тканей, метастазирование и другие физиологические/патологические процессы реализуются с участием белков семейства матриксных металлопротеиназ (ММР), разрушающих внеклеточный матрикс и модулирующих взаимодействие «клетка — матрикс» [11]. Например, коллагеназа-1 (матриксная металлопротеиназа-1 — *MMP1*) участвует в фиброзной трансформации миокарда и нарушениях кровообращения у больных ССЗ [5]. В МБД аннотированы публикации об ассоциации инсерции гена *MMP1* (*rs1799750*; *1G/2G*), ассоциированной с хронической обструктивной болезнью легких (ХОБЛ), но не подтвержденной для больных БА в РА. Исследования мышей, нокаутированных по гену *TNFRSF11B*, подтвержда-

ют участие его белкового продукта в стимуляции антиоксидантных путей и защите клеток от апоптоза. Белки цитохрома P450, семейство 1A, регулируются геном *CYP1A1* и являются монооксигеназами, которые катализируют реакции, участвующие в метаболизме лекарственных препаратов и синтезе холестерина, стероидов и других липидов. Несмотря на ключевую роль белковых продуктов генов (*MMP1*, *TNFRSF11B*, *CYP1A1*), упоминаемых в базе данных STRING и участвующих в сигнализации иммунной системы (путь HSA-168256) и метаболизме липидов, нами не установлено достоверных различий в распределении частот аллельных вариантов *1607insG* гена *MMP1*, *G1181* гена *TNFRSF11B* и *A2454G* гена *CYP1A1* при ишемической болезни сердца, бронхиальной астме, раке молочной железы.

Заключение

На примере жителей РА экспериментально доказано, что с развитием бронхиальной астмы

достоверно ассоциирован «нормальный» *Arg25*-полиморфный вариант гена *TGFβ1* ($p \leq 0,05$; $F = 0,038$; $OR = 3,231$; $95\% CI = 1,081-9,656$). Для групп с сердечно-сосудистыми, онкологическими заболеваниями и нарушениями гестационного процесса достоверных различий по SNP *rs1800471* не выявлено ($p > 0,05$).

Распределение частот аллельных вариантов *C786T* гена *NOS3*, *G1181C* гена *TNFRSF11B*, *1607insG* гена *MMP1*, *G925T* гена *EDN1* и *A2454G* гена *CYP1A1* у обследованных больных с ИБС, РМЖ и в контрольной группе достоверно не различаются (табл. 3). Статистическая значимость частот аллельных вариантов *rs1799750* гена *MMP1* при угрозе раннего выкидыша в I триместре и у женщин с физиологическим течением беременности ($F = 0,096$; $p \leq 0,05\%$; $OR = 6,0$) приближается к достоверной, но с доверительным интервалом, пересекающим единицу ($95\% CI = 0,980-36,716$), что требует дальнейших исследований.

Список литературы / References

1. Аймагамбетова А.О. Атерогенез и воспаление. Обзор литературы // Наука и здравоохранение, 2016. № 1. С. 24-39. [Aimagambetova A.O. Atherogenesis and inflammation. Literature review. *Nauka i zdavookhranenie = Science and Healthcare*, 2016, no. 1, pp. 24-39. (In Russ.)]
2. Баранов В.С. Генетический паспорт – основа индивидуальной и предиктивной медицины. СПб.: Н-Л, 2009. 528 с. [Baranov V.S. Genetic passport-the basis of individual and predictive medicine]. St. Petersburg: N-L, 2009. 528 p.
3. Лебеденко А.А., Шкурят Т.П., Машкина Е.В., Семерник О.Е., Дрейзина Т.К. Анализ ассоциации полиморфных вариантов генов факторов роста с риском развития бронхиальной астмы у детей // Пульмонология, 2018. Т. 28, № 1. С. 7-12. [Lebedenko A.A., Shkurat T.P., Mashkina E.V., Semernik O.E., Dreyzina T.K. Analysis of the association of polymorphic variants of growth factor genes with the risk of developing bronchial asthma in children. *Pulmonologiya = Pulmonology*, 2018, Vol. 28, no. 1, pp. 7-12. (In Russ.)]
4. Маркюс Ж.П., Борисов У.В. Персонализированная медицина и кризис классических представлений медицинского права Франции // Образование и право, 2020. № 6. С. 367-374. [Markus Zh.P., Borisov U.V. Personalized medicine and the crisis of classical representations of medical law in France. *Obrazovanie i pravo = Education and Law*, 2020, no. 6, pp. 367-374. (In Russ.)]
5. Медведев Н.В., Хайдаров Ф.С. Значимость фиброзной трансформации миокарда в патогенезе нарушений кровообращения у больных артериальной гипертензией пожилого возраста // Университетская наука: взгляд в будущее, 2020. С. 131-134. [Medvedev N.V., Khaydarov F.S. Significance of fibrotic transformation of the myocardium in the pathogenesis of circulatory disorders in elderly patients with arterial hypertension. *Universitetskaya nauka: vzgliad v budushchee = University Science: a Look Into the Future*, 2020, pp. 131-134. (In Russ.)]
6. Николаева А.М., Бабушкина Н.П., Рябов В.В. Некоторые про- и противовоспалительные цитокины, полиморфные варианты их генов и постинфарктное ремоделирование сердца // Российский кардиологический журнал, 2020. Т. 25, № 10, 4007. [Nikolaeva A.M., Babushkina N.P., Ryabov V.V. Some pro-and anti-inflammatory cytokines, polymorphic variants of their genes and postinfarction remodeling of the heart. *Rossiyskiy kardiologicheskii zhurnal = Russian Journal of Cardiology*, 2020, Vol. 25, no. 10, 4007. (In Russ.)] doi: 10.15829/1560-4071-2020-4007.
7. Овсянников Е.С., Авдеев С.Н., Будневский А.В. Системное воспаление у больных хронической обструктивной болезнью легких и ожирением // Терапевтический архив, 2020. Т. 92, № 3. С. 13-18. [Ovsyannikov E.S., Avdeev S.N., Budnevsky A.V. Systemic inflammation in patients with chronic obstructive pulmonary disease and obesity. *Terapevticheskii arkhiv = Therapeutic Archive*, 2020, Vol. 92, no. 3, pp. 13-18. (In Russ.)]

8. Саранцева К.А., Лактионова Л.В., Реутова Е.В., Черненко П.А., Бредер В.В. Иммунология: формирование иммунного ответа как ведущего фактора противоопухолевой защиты // Злокачественные опухоли, 2016. № 2. С. 5-14. [Sarantseva K.A., Laktionova L.V., Reutova E.V., Chernenko P.A., Breder V.V. Immunology: formation of the immune response as a leading factor of antitumor protection. *Zlokachestvennyye opukholy = Malignant Tumors*, 2016, no. 2, pp. 5-14. (In Russ.)]
9. Типтева Т.А., Чумакова О.С., Бровкин А.Н., Никитин А.Г., Резниченко Н.Е., Затеищников Д.А. Генетические маркеры миокардиального фиброза: возможность прогнозирования неблагоприятных исходов у больных аортальным стенозом // Российский кардиологический журнал, 2018. Т. 154, № 2. С. 32-39. [Tipteva T.A., Chumakova O.S., Brovkin A.N., Nikitin A.G., Reznichenko N.E., Zateishchikov D.A. Genetic markers of myocardial fibrosis: the possibility of predicting adverse outcomes in patients with aortic stenosis. *Rossiyskiy kardiologicheskiy zhurnal = Russian Journal of Cardiology*, 2018, Vol. 154, no. 2, pp. 32-39. (In Russ.)]
10. Черешнева М.В., Черешнев В.А. Иммунологические механизмы локального воспаления // Медицинская иммунология, 2011. Т. 13, № 6. С. 557-568. [Chereshneva M.V., Chereshnev V.A. Immunological mechanisms of local inflammation. *Meditinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2011, Vol. 13, no. 6, pp. 557-568. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2011-6-557-568.
11. Шадрина А.С., Плиева Я.З., Кушлинский Д.Н., Морозов А.А., Филипенко М.Л., Чанг В.Л., Кушлинский Н.Е. Классификация, регуляция активности, генетический полиморфизм матриксных металлопротеиназ в норме и при патологии // Альманах клинической медицины, 2017. Т. 45, № 4. С. 266-279. [Shadrina A.S., Plieva Ya.Z., Kushlinsky D.N., Morozov A.A., Filipenko M.L., Chang V.L., Kushlinsky N.E. Classification, regulation of activity, genetic polymorphism of matrix metalloproteinases in norm and in pathology. *Almanakh klinicheskoy meditsiny = Almanac of Clinical Medicine*, 2017, Vol. 45, no. 4, pp. 266-279. (In Russ.)]
12. Шаханов А.В., Урясьев О.М. Влияние полиморфизма NOS3 786C/T на уровень оксида азота у коморбидных больных бронхиальной астмой и гипертонической болезнью // Вестник Российского государственного медицинского университета, 2018. №3. С. 56-60. [Shakhanov A.V., Uryasev O.M. Effect of the nos3 786c/t polymorphism on the levels of nitric oxide in patients with asthma and comorbid hypertension. *Vestnik Rossiyskogo gosudarstvennogo meditsinskogo universiteta = Bulletin of Russian State Medical University*, 2018, no. 3, pp. 56-60. (In Russ.)]
13. Bielecka-Dabrowa A., Sakowicz A., Pietrucha T., Misztal M., Chruściel P., Rysz J., Banach M. The profile of selected single nucleotide polymorphisms in patients with hypertension and heart failure with preserved and mid-range ejection fraction. *Sci. Rep.*, 2017, Vol. 7, no. 1, pp. 8974. doi: 10.1038/s41598-017-09564-9
14. Duong L., Radley H.G., Lee B., Dye D.E., Pixley F.J., Grounds M.D., Jackaman C. Macrophage function in the elderly and impact on injury repair and cancer. *Immun. Ageing*, 2021, Vol. 18, no. 1, 4. doi: 10.1186/s12979-021-00215-2.
15. Hadj-Ahmed M., Ghali R.M., Bouaziz H., Habel A., Stayoussef M., Ayedi M., Hachiche M., Rahal K., Yacoubi-Loueslati B., Almawi W.Y. Transforming growth factor beta 1 polymorphisms and haplotypes associated with breast cancer susceptibility: a case-control study in Tunisian women. *Tumour Biol.*, 2019, Vol. 41, no. 8, 1010428319869096. doi: 10.1177/1010428319869096
16. Ip W.E., Hoshi N., Shouval D.S., Snapper S., Medzhitov R. Anti-inflammatory effect of IL-10 mediated by metabolic reprogramming of macrophages. *Science*, 2017, Vol. 356, no. 6337, pp. 513-519.
17. Janulaityte I., Januskevicius A., Kalinauskaite-Zukauske V., Bajoriuniene I., Malakauskas K. In vivo allergen-activated eosinophils promote collagen i and fibronectin gene expression in airway smooth muscle cells via TGF-beta1 signaling pathway in asthma. *Int. J. Mol. Sci.*, 2020, Vol. 21, no. 5, 1837. doi: 10.3390/ijms21051837.
18. Manzoor U., Pandith, A.A., Amin I., Wani S., Sanadhya D., Ahmad A., Koul A. Influence of prominent immunomodulatory cytokines TNF- α 308 G > A (rs1800629) and TGF β 1 G > C (rs1800471) sequence variations as an important contributing factor in etiopathogenesis of recurrent miscarriages in Kashmiri women (North India). *J. Obstet. Gynaecol. Res.*, 2021, Vol. 47, no. 5, pp. 1686-1693.
19. Marakhovskaya T.A., Butenko E.V., Kovalenko K.A., Mashkina E.V. Association of growth factors genes with miscarriage. *J. Reprod. Infertil.*, 2018, Vol. 19, no. 4, pp. 219-228.
20. Mishima Y., Oka A., Ishihara S. Detection and quantification of transforming growth factor- β 1 produced by murine b cells: pros and cons of different techniques. *Methods Mol. Biol.*, 2021, Vol. 2270, pp. 113-124.
21. Soheilyfar S., Nikyar T., Fathi Maroufi N., Mohebi Chamkhorami F., Amini Z., Ahmadi M., Haj Azimian S., Isazadeh A., Taefehshokr S., Taefehshokr N. Association of IL-10, IL-18, and IL-33 genetic polymorphisms with recurrent pregnancy loss risk in Iranian women. *Gynecol. Endocrinol.*, 2019, Vol. 35, no. 4, pp. 342-345.
22. Sproston N.R., Ashworth J.J. Role of C-reactive protein at sites of inflammation and infection. *Front. Immunol.*, 2018, Vol. 9, 754. doi: 10.3389/fimmu.2018.00754.
23. Wang K., Jiao Z., Chen H., Liu X., Lu J., Liu X. Wang L. The association between rs1800872 polymorphism in interleukin-10 and risk of cervical cancer: a meta-analysis. *Medicine (Baltimore)*, 2021, Vol. 100, no. 3, e23892. doi: 10.1097/MD.00000000000023892.

24. Wang T., Lu N., Cui Y., Tian L. Polymorphisms in interleukin genes and their association with the risk of recurrent pregnancy loss. *Genes Genet. Syst.*, 2019, Vol. 94, no. 3, pp. 109-116.
25. Wei H., Li B., Sun A., Guo F. Interleukin-10 family cytokines immunobiology and structure. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 2019, Vol. 1172, pp. 79-96.
26. Zuo S., Zheng T., Li H. Association between interleukin-10 -819 T/C polymorphism and risk of ischemic stroke: a meta-analysis. *Medicine (Baltimore)*, 2020, Vol. 99, no. 20, e19808. doi: 10.1097/MD.00000000000019808.

Авторы:

Татаркова Е.А. — к.б.н., старший научный сотрудник отдела медико-биологических проблем НИИ комплексных проблем ФГБОУ ВО «Адыгейский государственный университет», г. Майкоп, Республика Адыгея, Россия

Тугуз А.Р. — д.б.н., профессор, заведующая иммуногенетической лабораторией НИИ комплексных проблем ФГБОУ ВО «Адыгейский государственный университет», г. Майкоп, Республика Адыгея, Россия

Шумилов Д.С. — к.б.н., старший научный сотрудник отдела медико-биологических проблем НИИ комплексных проблем ФГБОУ ВО «Адыгейский государственный университет», г. Майкоп, Республика Адыгея, Россия

Муженя Д.В. — к.б.н., доцент кафедры физиологии и общей патологии медицинского факультета ФГБОУ ВО «Майкопский государственный технологический университет», г. Майкоп, Республика Адыгея, Россия

Руденко К.А. — к.б.н., доцент кафедры физиологии и общей патологии медицинского факультета ФГБОУ ВО «Майкопский государственный технологический университет», г. Майкоп, Республика Адыгея, Россия

Смолков И.В. — к.б.н., старший научный сотрудник НИИ комплексных проблем ФГБОУ ВО «Адыгейский государственный университет», г. Майкоп, Республика Адыгея, Россия

Authors:

Tatarkova E.A., PhD (Biology), Senior Research Associate, Department of Biomedical Problems, Adyghe State University, Maykop, Republic of Adyghe, Russian Federation

Tuguz A.R., PhD, MD (Biology), Professor, Head, Immunogenetic Laboratory, Research Institute of Complex Problems, Adyghe State University, Maykop, Republic of Adyghe, Russian Federation

Shumilov D.S., PhD (Biology), Senior Research Associate, Department of Biomedical Problems, Research Institute of Complex Problems, Adyghe State University, Maykop, Republic of Adyghe, Russian Federation

Muzhenya D.V., PhD (Biology), Associate Professor, Department of Physiology and General Pathology, Faculty of Medicine, Maikop State Technological University, Maykop, Republic of Adyghe, Russian Federation

Rudenko K.A., PhD (Biology), Associate Professor, Department of Physiology and General Pathology, Faculty of Medicine, Maikop State Technological University, Maykop, Republic of Adyghe, Russian Federation

Smolkov I.V., PhD (Biology), Senior Research Associate, Research Institute of Complex Problems, Adyghe State University, Maykop, Republic of Adyghe, Russian Federation

Поступила 01.07.2021
Отправлена на доработку 07.11.2021
Принята к печати 20.11.2021

Received 01.07.2021
Revision received 07.11.2021
Accepted 20.11.2021

ИММУНОЛОГИЧЕСКИЙ ДИСБАЛАНС, ГЕНЕТИЧЕСКИЙ ПОЛИМОРФИЗМ ФЕРМЕНТОВ БИОТРАНСФОРМАЦИИ И РЕЦЕПТОРЫ СТЕРОИДНЫХ ГОРМОНОВ В ОПУХОЛИ У БОЛЬНЫХ РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Глушков А.Н.¹, Поленок Е.Г.¹, Гордеева Л.А.¹, Мун С.А.¹,
Костянко М.В.², Антонов А.В.³, Вержбицкая Н.Е.³, Воронина Е.Н.⁴,
Колпинский Г.И.⁵

¹ ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр угля и углехимии Сибирского отделения Российской академии наук», г. Кемерово, Россия

² ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный университет», г. Кемерово, Россия

³ ГБУЗ «Кузбасский клинический онкологический диспансер имени М.С. Раппопорта», г. Кемерово, Россия

⁴ ФГБУН «Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук», г. Новосибирск, Россия

⁵ ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный медицинский университет», г. Кемерово, Россия

Резюме. Известно, что эффективность гормональной терапии рака молочной железы (РМЖ) зависит от наличия в ткани опухоли рецепторов эстрадиола и прогестерона (ER и PR). Экспрессия стероидных рецепторов снижается при прогрессии РМЖ. Механизмы конверсии ER⁺/PR⁺ опухолей молочной железы в ER⁺/PR⁻ и ER⁻/PR⁻ остаются неизвестными. Очевидно, снижение экспрессии стероидных рецепторов зависит от действия генотоксических метаболитов химических канцерогенов окружающей среды (в частности бензо[а]пирена, Bp) и эндогенных стероидных гормонов (в частности эстрадиола, E2), образование которых регулируется ферментами биотрансформации. С другой стороны, образование аддуктов генотоксических метаболитов с ДНК может индуцировать синтез специфических антител. Ранее было показано, что превышение уровней сывороточных антител класса А против Bp и E2 над уровнями антител против прогестерона (IgA-Bp/IgA-Pg > 1 и IgA-E2/IgA-Pg > 1), обозначенное как иммунологический дисбаланс, ассоциировано с высоким риском возникновения РМЖ.

Цель исследования — выявить предполагаемые ассоциации конверсии ER⁺/PR⁺ опухолей в ER⁺/PR⁻ и ER⁻/PR⁻ с иммунологическим дисбалансом у больных РМЖ с различными генетическими вариантами ферментов биотрансформации: CYP1A1*2A (rs4646903), CYP1B1 (rs1056836), CYP19A1 (rs2470152), GSTT1 (del), GSTP1 (rs1695).

Исследование IgA-Bp, IgA-E2 и IgA-Pg в сыворотке крови 1321 некурящей женщины с диагнозом РМЖ проводили с помощью неконкурентного твердофазного иммуноферментного анализа. Конъю-

Адрес для переписки:

Мун Стелла Андреевна
Институт экологии человека
650065, Россия, г. Кемерово, Ленинградский пр., 10.
Тел.: 8 (3842) 57-50-79.
E-mail: stellamun@yandex.ru

Address for correspondence:

Mun Stella A.
Institute of Human Ecology
650065, Russian Federation, Kemerovo,
Leningradsky ave., 10.
Phone: 7 (3842) 57-50-79.
E-mail: stellamun@yandex.ru

Образец цитирования:

А.Н. Глушков, Е.Г. Поленок, Л.А. Гордеева, С.А. Мун, М.В. Костянко, А.В. Антонов, Н.Е. Вержбицкая, Е.Н. Воронина, Г.И. Колпинский «Иммунологический дисбаланс, генетический полиморфизм ферментов биотрансформации и рецепторы стероидных гормонов в опухоли у больных раком молочной железы» // Медицинская иммунология, 2022. Т. 24, № 4. С. 765-778. doi: 10.15789/1563-0625-IIG-2493
© Глушков А.Н. и соавт., 2022

For citation:

A.N. Glushkov, E.G. Polenok, L.A. Gordeeva, S.A. Mun, M.V. Kostyanko, A.V. Antonov, N.E. Verzhbitskaya, E.N. Voronina, G.I. Kolpinskiy "Immunological imbalance, gene polymorphism of biotransformation enzymes, and steroid hormone receptors in tumors in breast cancer patients", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2022, Vol. 24, no. 4, pp. 765-778. doi: 10.15789/1563-0625-IIG-2493
DOI: 10.15789/1563-0625-IIG-2493

югаты Bp, E2 и Pg с бычьим сывороточным альбумином использовали в качестве адсорбированных на пластике антигенов и меченные пероксидазой хрена козьи антитела против IgA — для проявления связавшихся с гаптенами антител. Генетические полиморфизмы ферментов биотрансформации исследовали с помощью ПЦР в режиме реального времени. Наличие в ткани опухоли ER и PR определяли с помощью стандартного иммуно-гистохимического анализа.

У больных РМЖ I стадии ($N = 534$) ER^+/PR^+ опухоли обнаружены в 68,7% случаев, ER^+/PR^- в 15,6%, ER^-/PR^- в 15,7%. У больных II-IV стадий ($N = 787$) частота ER^+/PR^+ опухолей снижалась до 60,2%, частота ER^+/PR^- не изменялась (15,8%), частота ER^-/PR^- возрастала до 24,0% ($p < 0,0001$). Такие изменения статуса стероидных рецепторов имели место только у больных с высокими значениями индивидуальных соотношений $IgA-Bp/IgA-Pg > 1$ и $IgA-E2/IgA-Pg > 1$ ($p < 0,001$). У больных с низкими значениями указанных соотношений не было разницы между I и II-IV стадиями по удельному весу ER^+/PR^+ , ER^+/PR^- и ER^-/PR^- ($p = 0,28$).

У гомозигот $TT\ CYP19A1$ частота ER^+/PR^+ опухолей при I стадии была выше (77,1%), чем при II-IV стадиях (60,1%). Соответственно у больных II-IV стадий повышалась частота ER^-/PR^- опухолей (с 11,8% до 26,1%, $p < 0,001$). У носителей генотипа $GSTT1$ «+» ER^+/PR^+ опухоли обнаружены в 68,7% при I стадии и в 58,6% при II-IV стадиях, соответственно ER^-/PR^- обнаружены в 16,6% и в 24,5% случаев ($p < 0,004$). У гомозигот $GG\ GSTP1$ ER^+/PR^+ опухоли обнаружены в 57,1% при I стадии и в 60,7% при II-IV стадиях, частота ER^+/PR^- опухолей была ниже (14,3% против 20,2%), а ER^-/PR^- — выше (28,6% против 19,0%, $p < 0,001$). Удельный вес низких или высоких значений соотношений $IgA-Bp/IgA-Pg$ и $IgA-E2/IgA-Pg$ был одинаковым при любом генотипе исследованных генов.

Таким образом, конверсия стероидных рецепторов опухоли у больных РМЖ независимо ассоциирована с иммунологическим дисбалансом и с полиморфизмом некоторых генов ферментов биотрансформации.

Ключевые слова: рак молочной железы, антитела, бензо[а]пирен, эстрадиол, прогестерон, CYP, GST

IMMUNOLOGICAL IMBALANCE, GENE POLYMORPHISM OF BIOTRANSFORMATION ENZYMES, AND STEROID HORMONE RECEPTORS IN TUMORS IN BREAST CANCER PATIENTS

Glushkov A.N.^a, Polenok E.G.^a, Gordeeva L.A.^a, Mun S.A.^a,
Kostyanko M.V.^b, Antonov A.V.^c, Verzhbitskaya N.E.^c, Voronina E.N.^d,
Kolpinskiy G.I.^e

^a Federal Research Center of Coal and Coal Chemistry, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Kemerovo, Russian Federation

^b Kemerovo State University, Kemerovo, Russian Federation

^c Kuzbass Clinical Oncology Dispensary, Kemerovo, Russian Federation

^d Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russian Federation

^e Kemerovo State Medical University, Kemerovo, Russian Federation

Abstract. It is well known that results of breast cancer (BC) hormonal therapy depend on expression of tumor estradiol and progesterone receptors (ER and PR) in tumor tissue. Mechanisms of ER^+/PR^+ tumors conversion to ER^+/PR^- and ER^-/PR^- tumors remain scarcely studied. The decrease of steroid receptors expression seems to depend on action of genotoxic metabolites of environmental carcinogens (particularly, benzo[a]pyrene, BP) and endogenous steroids (in particular, estradiol, E2). The formation of these metabolites is regulated by the biotransformation enzymes. On the other hand, the formation of DNA-adducts with genotoxic metabolites may induce the synthesis of specific antibodies. Previously, it was shown that increase of the serum IgA-antibodies levels against Bp and E2 over the levels of IgA-antibodies against progesterone ($IgA-Bp/IgA-Pg > 1$ and $IgA-E2/IgA-Pg$), could be interpreted as immunological imbalance associated with high BC risk in healthy women. The purpose of this study was to detect the suggested associations between ER^+/PR^+ tumors conversion

to ER⁺/PR⁺ and ER⁻/PR⁻ tumors and immunological imbalance in the BC patients with distinct gene variants of biotransformation enzymes: *CYP1A1**2A (rs 4646903), *CYP1B1* (rs1056836), *CYP19A1* (rs2470152), *GSTT1* (*del*), *GSTP1* (rs1695). The IgA-Bp, IgA-E2 and IgA-Pg were studied in 1321 non-smoking BC patients by non-competitive solid phase immunoassay. The conjugates of Bp, E2 and Pg with bovine serum albumin were adsorbed as target antibodies. The goat antibodies against human IgA conjugated with horseradish peroxidase were used for detection of the studied specific antibodies. Gene polymorphisms of biotransformation enzymes were analyzed by the real-time PCR. Tumor ER and PR were detected by the standard immunohistochemical methods.

ER⁺/PR⁺ tumors in BC patients at the stage I (N = 534) were found in 68.7%, ER⁺/PR⁻ in 15.6%, ER⁻/PR⁻ in 15.7%. In BC patients at the II-IV stage (N = 787), frequency of ER⁺/PR⁺ tumors decreased to 60.2%, ER⁺/PR⁻ was similar (15.8%), and ER⁻/PR⁻ increased to 24.0% (p < 0.0001). These alterations were revealed in BC patients at the IgA-Bp/IgA-Pg ratios > 1, and IgA-E2/IgA-Pg > 1 only. There were no differences found between BC patients at stage I and II-IV at the ER⁺/PR⁺, ER⁺/PR⁻, ER⁻/PR⁻ frequencies when these ratios were low.

The frequency of ER⁺/PR⁺ tumors in homozygotes TT of *CYP19A1* was 77.1% at the I stage and 60.1% at the II-IV stages. Respectively the frequencies of ER⁻/PR⁻ tumors were 11.8% and 26.1% (p < 0.001). ER⁺/PR⁺ tumors were revealed in *GSTT1* “+” BC patients at the I stage in 68.7% and at the II-IV stages in 58.0%. Respectively ER⁻/PR⁻ tumors were found in 16.6% and 24.5% (p < 0.0004). The frequency of ER⁺/PR⁺ tumors was 57.1% in homozygotes GG of *GSTP1* at the I stage and 60.7% at the II-IV stages. Respectively the frequencies of ER⁺/PR⁻ were 14.3% and 22.2% and ER⁻/PR⁻ were 28.6% and 19.0% (p < 0.001). Proportions of low and high IgA-Bp/IgA-Pg and IgA-E2/IgA-Pg ratios were the same at the any enzyme genotype of studied *CYP* or *GST* variants. In conclusion, we have revealed a sufficient contribution of immunological imbalance to the conversion of steroid receptors in breast cancer growth, being independent of several *CYP* and *GST* gene polymorphisms.

Keywords: breast cancer, antibodies, benzo[a]pyrene, estradiol, progesterone, *CYP*, *GST*

Работа выполнена в рамках проекта VI.59.1.1 Программы фундаментальных научных исследований СО РАН (гос. задание № 0286-2022-0008).

Введение

Самой распространенной онкопатологией у женщин в мире и в России является рак молочной железы (РМЖ) [4, 20]. Эффективность комплексного лечения РМЖ зависит в том числе от наличия в опухоли рецепторов эстрогенов и прогестерона (ER и PR). Прогноз заболевания ухудшается при конверсии ER⁺ и PR⁺ опухолей в ER⁻ и PR⁻ в процессе прогрессии РМЖ [5, 12, 23]. Механизмы прекращения или снижения экспрессии стероидных рецепторов клетками опухоли остаются неизвестными.

Очевидно, это происходит вследствие генотоксического действия реактивных метаболитов химических канцерогенов окружающей среды и эндогенных стероидных гормонов. Метаболиты бензо[а]пирена (Bp) и эстрадиола (E2) образуют аддукты с ДНК, которые обнаружены в клетках опухоли и в крови у больных РМЖ [6, 10, 17, 22]. Поскольку образование аддуктов взаимосвязано с активностью ферментов биотрансформации [9, 15, 18, 21], можно предположить наличие ассоциаций между полиморфными вариантами генов ферментов биотрансформации и экспрессией стероидных рецепторов при росте РМЖ. Однако

такие взаимосвязи до сих пор не были исследованы.

С другой стороны, химические канцерогены и стероидные гормоны, будучи гаптенами в составе макромолекулярных аддуктов, индуцируют синтез специфических антител. Ранее было обнаружено, что превышение уровней сывороточных антител класса А, специфичных к Bp и E2, над уровнями антител к прогестерону (Pg) ассоциировано с высоким риском возникновения РМЖ у женщин [1]. У больных РМЖ с таким иммунологическим дисбалансом (IgA-Bp/IgA-Pg > 1 и IgA-E2/IgA-Pg > 1) имело место снижение количества ER⁺ и PR⁺ опухолей при II-IV стадиях по сравнению с опухолями I стадии и соответствующее увеличение количества ER⁻ и PR⁻ опухолей [2]. Однако при этом изменение ER и PR в процессе роста опухоли рассматривалось по отдельности, в то время как большое значение имеет их одновременная экспрессия и ее нарушения.

Вместе с тем не были исследованы особенности баланса между IgA-Bp и IgA-E2 с IgA-Pg, а также нарушения экспрессии стероидных рецепторов при росте опухолей у больных РМЖ с генетическим полиморфизмом ферментов биотрансформации химических канцерогенов окружающей среды и эндогенных стероидных гормонов.

Цель настоящей работы — выявить предполагаемые ассоциации конверсии ER^+/PR^+ опухолей в ER^+/PR^- и ER^-/PR^- с иммунологическим дисбалансом у больных РМЖ с разными генетическими вариантами ферментов биотрансформации (*CYP1A1*2A* (rs4646903), *CYP1B1* (rs1056836), *CYP19A1* (rs2470152), *GSTP1* (rs1695), *GSTT1* (del)).

Материалы и методы

В настоящем исследовании приняли участие 1321 некурящая женщина в постменопаузе. Все женщины с первично выявленным диагнозом «инвазивная карцинома молочной железы» поступили на лечение в Кузбасский клинический онкологический диспансер г. Кемерово. Диагноз РМЖ в каждом случае был подтвержден гистологически. Информация о наличии эстрогеновых и прогестероновых рецепторов в опухоли ($ER^{+/-}$, $PR^{+/-}$) у больных РМЖ была взята из протоколов патологоанатомического отделения. В зависимости от рецепторного статуса опухоли были выделены 3 подгруппы больных РМЖ: женщины с ER^+/PR^+ опухолями ($n = 841$), женщины с ER^+/PR^- опухолями ($n = 207$) и женщины с ER^-/PR^- опухолями ($n = 273$). У большинства женщин была выявлена I и II стадии заболевания (40,4% и 42,0%), III+IV стадии составили 17,6%. Медиана возраста всех женщин с РМЖ составила 63 года (интерквартильный размах 58–69).

Периферическую кровь для исследования забирали согласно этическим стандартам в соответствии с Хельсинкской декларацией 1975 г. и «Правилами клинической практики в Российской Федерации», утвержденными Приказом Минздрава РФ № 266 от 19.06.2003 г. Все женщины дали информированное письменное согласие на участие в исследовании. Образцы сыворотки крови женщин забирались в аликвоты и хранились при -70°C .

Исследование IgA-антител, специфичных к Bp, E2 и Pg, проводили с помощью неконкурентного иммуноферментного анализа согласно методике, описанной в работе [1]. Уровень IgA-антител к исследуемым гаптенам выражали в относительных единицах и вычисляли по формуле:

$$IgA-X = (OD_{X-BCA} - OD_{BCA}) / OD_{BCA},$$

где X = Bp, E2, Pg; BCA — бычий сывороточный альбумин, OD_{X-BCA} — связывание антител с конъюгатом гаптен-BCA, OD_{BCA} — фоновое связывание антител с BCA.

Генотипирование

Образцы ДНК выделяли из лимфоцитов периферической крови с помощью метода фенол — хлороформной экстракции с последующим осаждением этанолом, образцы ДНК хранили при -20°C .

Типирование гена *GSTT1*(del) проводили мультиплексной Real-time ПЦР с флуоресцентной детекцией и анализом кривых плавления (табл. 1). Олигонуклеотидные праймеры для ПЦР были выбраны внутри области делеции в гене *GSTT1* таким образом, что обуславливало отсутствие синтеза соответствующего продукта ПЦР при анализе образцов ДНК с генотипом *GSTT1* «0/0» соответственно. Для того чтобы отличить наличие гомозиготной делеции в гене *GSTT1* от отсутствия ДНК матрицы или ингибирования реакции ПЦР, в амплификационную смесь вводили праймеры для амплификации короткого легкоплавкого А/Т-богатого фрагмента ДНК (*LTM* — low temperature melting).

Размеры амплифицируемых фрагментов: *GSTT1* — 287 пар оснований, *LTM* — 127 пар оснований, расчетная температура отжига всех праймеров составляет $64-66^\circ\text{C}$, ожидаемая температура плавления продуктов амплификации составляет *GSTT1* — $92,5^\circ\text{C}$, *LTM* — $78,5^\circ\text{C}$.

ПЦР проводилась в смеси, содержащей следующие компоненты: 65 mM Tris-HCl (pH = 8,9); 0,05% Tween 20; 16 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 2,4 mM MgCl_2 ; 0,2 mM dNTP; 0,3 мкМ растворы олигонуклеотидных праймеров; 0,8X SYBR GreenI; 20-100 нг матрицы ДНК; 0,5 единиц активности термостабильной Taq-полимеразы. Объем реакционной смеси составлял 20 мкл.

Отсутствие флуоресцентного сигнала указывало на гомозиготность индивидуума по делеции гена *GSTT1* — «0/0». Гетерозиготы по мутации (генотип «+/0») рассматривались в одной группе с носителями нормальных генов («+»).

Типирование полиморфных локусов *CYP1A1*2A* (3801 T > C, rs4646903), *CYP1B1* (Leu432Val, rs1056836), *CYP19A1* (c.-39+15658 C > T, rs2470152), *GSTP1* (Ile105Val, rs1695) проводили методом Real-time ПЦР с использованием технологии конкурирующих TaqMan-зондов. Реакции амплификации проводили с помощью амплификатора CFX-96 (Bio-Rad, США). Каждый образец амплифицировался с использованием пары специфических праймеров и двух зондов (табл. 1), несущих «гаситель» на 3'-конце и флуоресцентных красителей (FAM и R6G) на 5'-конце. Результаты интерпретировали исходя из анализа графиков накопления флуоресценции. Общий объем реакционной смеси составлял 20 мкл, смесь содержала 40-100 нг ДНК; 300 нМ каждого праймера; по 100-200 нМ Taqman-зондов, конъюгированных с FAM или R6G; 200 мкМ-ные dNTP, амплификационный буфер, термостабильную Taq-полимеразу — 0,5 ед. акт./реакц.

Распределение частот генотипов генов *CYP* и *GSTP1* у исследуемых женщин соответствовало

ТАБЛИЦА 1. ПРАЙМЕРЫ И ЗОНДЫ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ НУКЛЕОТИДНОЙ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНОВ CYP И GSTP1

TABLE 1. PRIMERS AND PROBES FOR DETERMINING THE NUCLEOTIDE SEQUENCE OF CYP AND GSTP1 GENE POLYMORPHISMS

Гены Genes	Праймеры Primers	Последовательность праймеров Primers sequence	Последовательность зондов Probes sequence
CYP1A1*2A (rs4646903)	direct	5'-AGTGAGAAGGTGATTATCTTTGG-3'	5'-FAM-TGAGACCATTGCCCGCTG-BHQ-3'
	reverse	5'-AGCAGGATAGCCAGGAAGAG-3'	5'-R6G-TGAGACCGTTGCCCGCTG-BHQ-3'
CYP1B1 (rs1056836)	direct	5'-GCTACCACATTCCCAAGG-3'	5'-FAM-CATGACCCACTGAAGTGGC-BHQ-3'
	reverse	5'-TTAGAAAGTTCTTCGCCAATG-3'	5'-HEX-CATGACCCAGTGAAGTGGC-BHQ-3'
CYP19A1 (rs2470152)	direct	5'-GGCAATTTCAAGGGTTGTG-3'	5'-FAM-CCAGCCCACATCTTTCTCTC-BHQ-3'
	reverse	5'ATGCGACCTCCTCTGGCAG-3'	5'-R6G-CCAGCCCACGTCCTTTCTCTC-BHQ-3'
GSTP1 (rs1695)	direct	5'-GATGCTCACATAGTTGGTGTAG-3'	5'-FAM-CTGCAAATACATCTCCCTCAT-BHQ-3'
	reverse	5'-GGTGGACATGGTGAATGAC-3'	5'-R6G-CTGCAAATACGTCCTCCCTCAT-BHQ-3'
GSTT (del)	direct	5'GCTAGTTGCTGAAGTCCTGCTTA3'	—
	reverse	5'CTTGGCCTTCAGAATGACCT3'	—
LTM	direct	5'TGGGTGCTAGAGGTATAATCG3'	—
	reverse	5'TTAGAGGAAGCTGGGTAAGAG3'	—

ожидаемым согласно равновесию Харди–Вайнберга ($p > 0,05$).

Статистический анализ полученных результатов проводился с помощью пакета статистических программ Statistica 8.0, (StatSoft Inc., США). Соответствие частот генотипов изучаемых генов равновесию Харди–Вайнберга (HWE) оценивали с помощью критерия χ^2 Пирсона. Нулевую гипотезу отвергали при $p < 0,05$. Характер распределения количественных признаков определяли с помощью критерия Шапиро–Уилка и в дальнейшем статистически значимые различия между группами выявляли с помощью непараметрического критерия χ^2 с поправкой Йейтса (Yates) на непрерывность вариации. За критический уровень значимости принималось значение $p < 0,05$. Для определения пороговых значений соотношений уровней антител (cut-off) был использован ROC-анализ [11].

Результаты

Исследование конверсии ER^+/PR^+ опухолей в ER^+/PR^- и ER^-/PR^- в процессе роста РМЖ показало следующее (табл. 2).

Удельный вес больных РМЖ с ER^+/PR^- опухолями снижался с 68,7% при I стадии до 62,2% и 55,6% при II и III-IV стадиях. Удельный вес больных РМЖ с ER^+/PR^- опухолями при I и II стадиях (15,6% и 14,1%) повышался к III-IV стадии (19,8%). Соответствующий рост удельного числа больных от 15,7% до 23,7% и 24,6% имел место в

случае с ER^-/PR^- опухолями. Обнаруженная разница в числе опухолей с разным статусом стероидных рецепторов между больными I, II и III-IV стадиями опухолевого процесса оказалась статистически значимой ($p < 0,0001$).

Дальнейшие исследования искомых ассоциаций выполняли, объединив больных РМЖ со II и III-IV стадиями процесса, учитывая незначительные различия между ними с ER^-/PR^- опухолями и относительно небольшое количество больных с ER^+/PR^- опухолями.

С помощью ROC-анализа были рассчитаны пороговые значения (cut-off) индивидуальных соотношений уровней антител: $IgA-Bp/IgA-Pg = 1$, $IgA-E2/IgA-Pg = 1$. В таблице 3 представлены результаты сопоставления больных РМЖ с опухолями I и II-IV стадий и различным статусом стероидных рецепторов в зависимости от низких и высоких индивидуальных соотношений IgA -антител, специфичных к Bp, E2 и Pg. У больных с превышением уровня $IgA-Pg$ над уровнем $IgA-Bp$ ($IgA-Bp/IgA-Pg \leq 1$) не выявлено различий между I и II-IV стадиями по распределению ER^+/PR^+ , ER^+/PR^- и ER^-/PR^- опухолей ($p = 0,285$).

Напротив, удельный вес больных с ER^+/PR^+ опухолями при II-IV стадиях (59,8%) был ниже, чем при I стадии (72,3%), когда уровни $IgA-Bp$ превышали уровни $IgA-Pg$ ($IgA-Bp/IgA-Pg > 1$). Соответственно, повышался удельный вес больных с ER^+/PR^- опухолями (15,8% против 13,2%) и с ER^-/PR^- опухолями (24,4% против 14,5%). Уста-

ТАБЛИЦА 2. ЧИСЛО (n) И УДЕЛЬНЫЙ ВЕС (%) БОЛЬНЫХ РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ (РМЖ) С ER⁺/PR⁺, ER⁺/PR⁻ И ER⁻/PR⁻ ОПУХОЛЯМИ ПРИ I, II И III-IV СТАДИЯХ ЗАБОЛЕВАНИЯ

TABLE 2. CASES NUMBERS (n) AND FREQUENCIES (%) OF BREAST CANCER PATIENTS (BCP) WITH ER⁺/PR⁺, ER⁺/PR⁻ AND ER⁻/PR⁻ TUMORS AT THE I, II AND III-IV STAGES

Стадии Stages	РМЖ BCP ER ⁺ /PR ⁺	РМЖ BCP ER ⁺ /PR ⁻	РМЖ BCP ER ⁻ /PR ⁻
	n/%	n/%	n/%
I	367,0/68,7	83,0/15,6	84,0/15,7
II	345,0/62,2	78,0/14,1	132,0/23,7
III-IV	129,0/55,6	46,0/19,8	57,0/24,6
χ^2 (p), df = 4	18,800 (< 0,001)		

ТАБЛИЦА 3. ЧИСЛО (n) И УДЕЛЬНЫЙ ВЕС (%) БОЛЬНЫХ РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ С ER⁺/PR⁺, ER⁺/PR⁻ И ER⁻/PR⁻ ОПУХОЛЯМИ ПРИ I И II-IV СТАДИЯХ С НИЗКИМИ (≤ 1) И ВЫСОКИМИ (> 1) ЗНАЧЕНИЯМИ ИНДИВИДУАЛЬНЫХ СООТНОШЕНИЙ ИССЛЕДУЕМЫХ АНТИТЕЛ (IgA-Bp/IgA-Pg И IgA-E2/IgA-Pg)

TABLE 3. CASES NUMBERS (n) AND FREQUENCIES (%) OF BREAST CANCER PATIENTS WITH ER⁺/PR⁺, ER⁺/PR⁻ AND ER⁻/PR⁻ TUMORS AT THE I AND II-IV STAGES WITH LOW (≤ 1) AND HIGH (> 1) STUDIED ANTIBODIES RATIOS (IgA-Bp/IgA-Pg И IgA-E2/IgA-Pg)

Соотношения антител Antibodies ratios	I стадия I stage N = 534			II-IV стадии II-IV stages N = 787			χ^2 (p), df = 2
	ER ⁺ /PR ⁺	ER ⁺ /PR ⁻	ER ⁻ /PR ⁻	ER ⁺ /PR ⁺	ER ⁺ /PR ⁻	ER ⁻ /PR ⁻	
	n/%	n/%	n/%	n/%	n/%	n/%	
1.1. IgA-Bp/IgA-Pg ≤ 1	77,0/57,9	30,0/22,6	26,0/19,5	114,0/61,6	29,0/15,7	42,0/22,7	2,510 (0,285)
1.2. IgA-Bp/IgA-Pg > 1	290,0/72,3	53,0/13,2	58,0/14,5	360,0/59,8	95,0/15,8	147,0/24,4	18,560 ($< 0,001$)
χ^2 (p), df = 2	10,270 (0,006)			0,250 (0,882)			
2.1. IgA-E2/IgA-Pg ≤ 1	91,0/64,1	22,0/15,5	29,0/20,4	130,0/63,4	33,0/16,1	42,0/20,5	0,030 (0,988)
2.2. IgA-E2/IgA-Pg > 1	276,0/70,4	61,0/15,6	55,0/14,0	344,0/59,1	91,0/15,6	147,0/25,3	18,940 ($< 0,001$)
χ^2 (p), df = 2	3,310 (0,191)			1,920 (0,383)			

новленные различия оказались высоко значимыми статистически ($p < 0,001$).

Между пациентками с низким (≤ 1) и высоким (> 1) соотношением IgA-Bp/IgA-Pg при I стадии РМЖ обнаружены статистически значимые различия ($p = 0,006$) в распределении опухолей по статусу стероидных рецепторов. Удельный вес больных с ER⁺/PR⁺ опухолями у больных с IgA-Bp/IgA-Pg ≤ 1 оказался ниже, чем у больных с IgA-Bp/IgA-Pg > 1 (57,9 против 72,3%), в то время как удельный вес больных с опухолями ER⁺/PR⁻ и ER⁻/PR⁻ (22,6% и 19,5%) был выше (против 13,2% и 14,5% соответственно).

Аналогичные особенности распределения больных РМЖ I и II-IV стадий по статусу стероидных рецепторов в опухоли выявлены в зависимости от индивидуальных соотношений IgA-E2/IgA-Pg. При низких значениях (≤ 1) разницы между ними не было ($p = 0,988$). При высоких значениях (> 1) удельный вес больных с ER⁺/PR⁺ опухолями при II-IV стадиях оказался ниже (59,1%), чем при I стадии (70,4%). Удельный вес больных с ER⁺/PR⁻ опухолями не имел различий (15,6%), зато значительно возросло удельное количество больных с ER⁻/PR⁻ опухолями: с 14,0% при I стадии до 25,3% при II-IV стадиях ($p < 0,001$). Не об-

ТАБЛИЦА 4. ЧИСЛО (n) И УДЕЛЬНЫЙ ВЕС (%) БОЛЬНЫХ РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ С ER⁺/PR⁺, ER⁺/PR⁻ И ER⁻/PR⁻ ОПУХОЛЯМИ ПРИ I И II-IV СТАДИЯХ С РАЗЛИЧНЫМИ ГЕНОТИПАМИ ФЕРМЕНТОВ БИОТРАНСФОРМАЦИИ

TABLE 4. CASES NUMBERS (n) AND FREQUENCIES (%) OF BREAST CANCER PATIENTS WITH ER⁺/PR⁺, ER⁺/PR⁻ AND ER⁻/PR⁻ TUMORS AT THE I AND II-IV STAGES WITH DIFFERENT GENOTYPES OF BIOTRANSFORMATION ENZYMES

Гены, генотипы Genes, genotypes	I стадия I stage			II-IV стадии II-IV stages			χ^2 (p), df = 2
	ER+/PR+	ER+/PR-	ER-/PR-	ER+/PR+	ER+/PR-	ER-/PR-	
	n/%	n/%	n/%	n/%	n/%	n/%	
CYP1A1*2A (rs4646903)							
CC	0,0/0,0	0,0/0,0	0,0/0,0	4,0/80,0	0,0/0,0	1,0/20,0	-
TC	30,0/68,2	10,0/22,7	4,0/9,1	29,0/61,7	8,0/17,0	10,0/21,3	2,720 (0,258)
TT	337,0/68,8	73,0/14,9	80,0/16,3	441,0/60,0	116,0/15,8	178,0/24,2	12,410 (0,003)
χ^2 (p), df = 4	2,940 (0,231)			0,220 (0,895)			
CYP1B1 (rs1056836)							
CC	122,0/64,2	37,0/19,5	31,0/16,3	179,0/60,3	45,0/15,2	73,0/24,6	5,280 (0,072)
CG	183,0/70,7	35,0/13,5	41,0/15,8	227,0/62,2	55,0/15,1	83,0/22,7	5,550 (0,063)
GG	62,0/72,9	11,0/12,9	12,0/14,1	68,0/54,4	24,0/19,2	33,0/26,4	7,560 (0,023)
χ^2 (p), df = 4	4,050 (0,399)			2,640 (0,620)			
CYP19A1 (rs2470152)							
CC	67,0/62,0	19,0/17,6	22,0/20,4	90,0/61,2	22,0/15,0	35,0/23,8	0,600 (0,740)
CT	182,0/66,7	47,0/17,2	44,0/16,1	214,0/59,9	63,0/17,6	80,0/22,4	4,240 (0,121)
TT	118,0/77,1	17,0/11,1	18,0/11,8	170,0/60,1	39,0/13,8	74,0/26,1	14,660 (< 0,001)
χ^2 (p), df = 4	8,190 (0,085)			2,520 (0,641)			
GSTT1(del)							
«0/0»	69,0/69,0	19,0/19,0	12,0/12,0	88,0/63,3	21,0/15,1	30,0/21,6	3,850 (0,146)
«+»	298,0/68,7	64,0/14,7	72,0/16,6	386,0/59,6	103,0/15,9	159,0/24,5	11,310 (0,004)
χ^2 (p), df = 2	2,040 (0,362)			0,730 (0,696)			
GSTP1 (rs1695)							
AA	170,0/69,4	39,0/15,9	36,0/14,7	223,0/61,6	57,0/15,7	82,0/22,7	6,130 (0,047)
AG	169,0/70,4	37,0/15,4	34,0/14,2	200,0/58,7	50,0/14,7	91,0/26,7	13,390 (0,002)
GG	28,0/57,1	7,0/14,3	14,0/28,6	51,0/60,7	17,0/20,2	16,0/19,0	19,250 (< 0,001)
χ^2 (p), df = 4	6,820 (0,146)			3,740 (0,442)			

наружено различий между пациентками с низкими и высокими соотношениями IgA-E2/IgA-Pg в распределении опухолей по статусу стероидных рецепторов при I стадии заболевания ($p = 0,191$) в отличие от выше описанной разницы по соотношению IgA-Bp/IgA-Pg.

Результаты анализа взаимосвязей полиморфных вариантов генов ферментов биотрансформации с реверсией стероидных рецепторов опухоли у больных РМЖ представлены в таблице 4.

Снижение удельного количества ER⁺/PR⁺ опухолей у больных II-IV стадиями по сравнению

ТАБЛИЦА 5. ЧИСЛО (n) И УДЕЛЬНЫЙ ВЕС (%) БОЛЬНЫХ РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ I И II-IV СТАДИЙ С НИЗКИМИ (≤ 1) И ВЫСОКИМИ (> 1) IgA-Bp/IgA-Pg ИНДИВИДУАЛЬНЫМИ СООТНОШЕНИЯМИ И ОТДЕЛЬНЫМИ ГЕНОТИПАМИ ФЕРМЕНТОВ БИОТРАНСФОРМАЦИИ

TABLE 5. CASES NUMBERS (n) AND FREQUENCIES (%) OF BREAST CANCER PATIENTS I AND II-IV STAGES WITH LOW (≤ 1) AND HIGH (> 1) PERSONAL IgA-Bp/IgA-Pg RATIOS AND DIFFERENT GENOTYPES OF BIOTRANSFORMATION ENZYMES

Гены, генотипы Genes, genotypes	I стадия I stage		II-IV стадии II-IV stages		χ^2 (p)
	IgA-Bp/IgA-Pg ≤ 1	IgA-Bp/IgA-Pg > 1	IgA-Bp/IgA-Pg ≤ 1	IgA-Bp/IgA-Pg > 1	
	n/%	n/%	n/%	n/%	
CYP1A1*2A (rs4646903)					
CC	0,0/0,0	0,0/0,0	2,0/40,0	3,0/60,0	-
TC	11,0/25,0	33,0/75,0	14,0/29,8	33,0/70,2	0,080 (0,783)
TT	122,0/24,9	368,0/75,1	169,0/23,0	566,0/77,0	0,490 (0,485)
χ^2 (p), df = 2	—		1,890 (0,388)		
CYP1B1 (rs1056836)					
CC	49,0/25,8	141,0/74,2	64,0/21,5	233,0/78,5	0,940 (0,332)
CG	61,0/23,6	198,0/76,4	93,0/25,5	272,0/74,5	0,210 (0,649)
GG	23,0/27,1	62,0/72,9	28,0/22,4	97,0/77,6	0,370 (0,543)
χ^2 (p), df = 2	0,540 (0,762)		1,510 (0,471)		
CYP19A1 (rs2470152)					
CC	27,0/25,0	81,0/75,0	34,0/23,1	113,0/76,9	0,040 (0,844)
CT	76,0/27,8	197,0/72,2	88,0/24,6	269,0/75,4	0,660 (0,417)
TT	30,0/19,6	123,0/80,4	63,0/22,3	220,0/77,7	0,270 (0,601)
χ^2 (p), df = 2	3,550 (0,170)		0,520 (0,773)		
GSTT1(del)					
«0/0»	27,0/27,0	73,0/73,0	24,0/17,3	115,0/82,7	2,730 (0,099)
«+»	106,0/24,4	328,0/75,6	161,0/24,8	487,0/75,2	0,010 (0,932)
χ^2 (p)	0,170 (0,683)		3,250 (0,072)		
GSTP1 (rs1695)					
AA	55,0/22,4	190,0/77,6	92,0/25,4	270,0/74,6	0,550 (0,460)
AG	64,0/26,7	176,0/73,3	81,0/23,8	260,0/76,2	0,490 (0,483)
GG	14,0/28,6	35,0/71,4	12,0/14,3	72,0/85,7	3,160 (0,076)
χ^2 (p), df = 2	1,540 (0,463)		4,720 (0,095)		

ТАБЛИЦА 6. ЧИСЛО (n) И УДЕЛЬНЫЙ ВЕС (%) БОЛЬНЫХ РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ I И II-IV СТАДИЙ С НИЗКИМИ (≤ 1) И ВЫСОКИМИ (> 1) IgA-E2/IgA-Pg ИНДИВИДУАЛЬНЫМИ СООТНОШЕНИЯМИ И ОТДЕЛЬНЫМИ ГЕНОТИПАМИ ФЕРМЕНТОВ БИОТРАНСФОРМАЦИИ

TABLE 6. CASES NUMBERS (n) AND FREQUENCIES (%) OF BREAST CANCER PATIENTS I AND II-IV STAGES WITH LOW (≤ 1) AND HIGH (> 1) PERSONAL IgA-E2/IgA-Pg RATIOS AND DIFFERENT GENOTYPES OF BIOTRANSFORMATION ENZYMES

Гены, генотипы Genes, genotypes	I стадия I stage		II-IV стадии II-IV stages		χ^2 (p), df = 1
	IgA-E2/IgA-Pg ≤ 1	IgA-E2/IgA-Pg > 1	IgA-E2/IgA-Pg ≤ 1	IgA-E2/IgA-Pg > 1	
	n/%	n/%	n/%	n/%	
CYP1A1*2A (rs4646903)					
CC	0,0/0,0	0,0/0,0	1,0/20,0	4,0/80,0	-
TC	14,0/31,8	30,0/68,2	13,0/27,7	34,0/72,3	0,040 (0,839)
TT	128,0/26,1	362,0/73,9	191,0/26,0	544,0/74,0	0,000 (0,990)
χ^2 (p), df = 2	—		0,160 (0,924)		
CYP1B1 (rs1056836)					
CC	50,0/26,3	140,0/73,7	79,0/26,6	218,0/73,4	0,001 (0,972)
CG	73,0/28,2	186,0/71,8	97,0/26,6	268,0/73,4	0,130 (0,724)
GG	19,0/22,4	66,0/77,6	29,0/23,2	96,0/76,8	0,001 (0,981)
χ^2 (p), df = 2	1,130 (0,570)		0,630 (0,732)		
CYP19A1 (rs2470152)					
CC	29,0/26,9	79,0/73,1	32,0/21,8	115,0/78,2	0,630 (0,429)
CT	75,0/27,5	198,0/72,5	103,0/28,9	254,0/71,1	0,090 (0,771)
TT	38,0/24,8	115,0/75,2	70,0/24,7	213,0/75,3	0,010 (0,927)
χ^2 (p), df = 2	0,350 (0,838)		3,110 (0,212)		
GSTT1(del)					
«0/0»	27,0/27,0	73,0/73,0	38,0/27,3	101,0/72,7	0,010 (0,929)
«+»	115,0/26,5	319,0/73,5	167,0/25,8	481,0/74,2	0,040 (0,845)
χ^2 (p), df = 1	0,001 (0,982)		0,080 (0,784)		
GSTP1 (rs1695)					
AA	60,0/24,5	185,0/75,5	95,0/26,2	267,0/73,8	0,150 (0,696)
AG	66,0/27,5	174,0/72,5	91,0/26,7	250,0/73,3	0,150 (0,903)
GG	16,0/32,7	33,0/67,3	19,0/22,6	65,0/77,4	1,130 (0,288)
χ^2 (p), df = 2	1,580 (0,455)		0,590 (0,744)		

с I стадией и соответствующее увеличение ER⁻/PR⁻ опухолей имело место при ТС и ТТ вариантах гена *CYP1A1*2A*, статистически достоверное только у гомозигот ТТ ($p = 0,003$).

Аналогичные ассоциации обнаружены при анализе вариантов гена *CYP1B1*, наиболее значимые для гомозиготного генотипа GG ($p = 0,023$).

У носителей гетерозиготного СТ и гомозиготного ТТ генотипов гена *CYP19A1* также снижалось удельное количество ER⁺/PR⁺ опухолей и повышалось количество ER⁻/PR⁻ опухолей, наиболее значимое для людей с генотипом ТТ ($p < 0,001$). При этом у больных с генотипом СС разница между I и II-IV стадиями процесса по удельному весу ER⁺/PR⁺, ER⁺/PR⁻ и ER⁻/PR⁻ опухолей не превышала 1-3%.

Наличие генотипа *GSTT1*«+» было ассоциировано со значительным и статистически значимым снижением удельного количества ER⁺/PR⁺ опухолей и увеличением ER⁻/PR⁻ опухолей ($p = 0,004$), в то время как при делеционном генотипе *GSTT1* (0/0) разница между I и II-IV стадиями болезни по статусу стероидных рецепторов была статистически недостоверной.

У носителей гомозиготного AA и гетерозиготного AG генотипов гена *GSTP1* также имело место снижение удельного веса ER⁺/PR⁺ опухолей и соответствующее повышение ER⁻/PR⁻ опухолей при II-IV стадиях болезни по сравнению с I стадией ($p = 0,047$ и $p = 0,002$ соответственно). В то же время у больных с генотипом GG гена *GSTP1* разница по удельному количеству ER⁺/PR⁺ опухолей оказалось незначительной. При этом существенно возрастало удельное количество ER⁺/PR⁻ опухолей и снижалось количество ER⁻/PR⁻ опухолей ($p < 0,001$).

Анализ распределения больных РМЖ с низкими (≤ 1) и высокими (> 1) соотношениями IgA-Bp/IgA-Pg при отдельных генотипах исследуемых генов ферментов биотрансформации показал отсутствие предполагаемых взаимосвязей (табл. 5). Как у пациенток с I стадией заболевания, так и при II-IV стадиях, частота обнаружения низких и высоких соотношений IgA-Bp/IgA-Pg не имела значимых различий в зависимости от полиморфных локусов генов *CYP1A1*2A*, *CYP1B1*, *CYP19A1*, *GSTT1* и *GSTP1* ($p > 0,05$). Также не обнаружили различий по частоте выявления указанных соотношений при каждом исследуемом генотипе между больными с опухолями I и II-IV стадий ($p > 0,05$).

Аналогичное отсутствие искомым взаимосвязей полиморфных вариантов генов ферментов биотрансформации с индивидуальными соотношениями IgA-E2/IgA-Pg продемонстрировано в таблице 6.

Обсуждение

Результаты настоящего исследования подтверждают хорошо известные данные о конверсии ER⁺/PR⁺ опухолей в ER⁺/PR⁻ и ER⁻/PR⁻ в процессе роста РМЖ. Удельный вес ER⁺/PR⁺ опухолей при I стадии заболевания снижался при II-IV стадиях. Соответственно повышался удельный вес ER⁻/PR⁻ опухолей. Частота обнаружения ER⁺/PR⁻ опухолей при II-IV стадиях РМЖ почти не отличалась от таковой при I стадии. Таким образом, конверсия стероидных рецепторов при прогрессии РМЖ происходила главным образом за счет одновременного снижения или прекращения экспрессии и ER, и PR.

Выявленные изменения экспрессии стероидных рецепторов оказались характерными только для больных РМЖ, у которых уровни IgA-Bp и IgA-E2 превышали уровни IgA-Pg. При индивидуальных соотношениях IgA-Bp/IgA-Pg > 1 удельный вес ER⁺/PR⁺ опухолей на II-IV стадиях заболевания был меньше, чем на I стадии, а удельный вес ER⁻/PR⁻ опухолей был соответственно больше. По удельному весу ER⁺/PR⁻ больные РМЖ I и II-IV стадий не различались. В то же время у больных с индивидуальными соотношениями IgA-Bp/IgA-Pg ≤ 1 существенных различий между сравниваемыми стадиями по статусу стероидных рецепторов не обнаружено.

Аналогичные взаимосвязи изменения экспрессии стероидных рецепторов были выявлены при анализе IgA-E2/IgA-Pg. Снижение частоты ER⁺/PR⁺ опухолей и соответствующее повышение частоты ER⁻/PR⁻ опухолей при неизменной частоте ER⁺/PR⁻ опухолей имело место только у больных РМЖ с IgA-E2/IgA-Pg > 1 . У больных с IgA-E2/IgA-Pg ≤ 1 удельные веса ER⁺/PR⁺, ER⁺/PR⁻ и ER⁻/PR⁻ опухолей при I и II-IV стадиях не различались. Полученные результаты свидетельствуют о том, что состояние иммунологического дисбаланса, ассоциированное с высоким риском возникновения РМЖ у здоровых женщин, взаимосвязано и с конверсией стероидных рецепторов в опухоли при росте РМЖ.

Ранее было показано [3], что иммунологический дисбаланс (IgA-Bp/IgA-Pg > 1 и IgA-E2/IgA-Pg > 1) у больных РМЖ ассоциирован с гормональным дисбалансом, снижением содержания в сыворотке Pg по отношению к E2 (Pg/E2 ≤ 5). Известно также, что Pg ингибирует E2-зависимый рост ER⁺ клеточных линий РМЖ и ER⁺ опухолевых эксплантов [16]. Поэтому можно предположить, что избыточное образование IgA-Bp и IgA-E2 по сравнению с образованием IgA-Pg стимулирует пролиферацию ER⁺/PR⁺ клеток РМЖ и конверсию их в ER⁻/PR⁻ клетки за счет снижения в сыворотке содержания Pg по сравнению с E2 и торможения антипролиферативного действия Pg.

Кроме того, повышение уровней IgA-Bp и IgA-E2, отражает взаимно усиливающие канцерогенные эффекты Bp и E2, как было показано в экспериментах на различных клеточных культурах [7, 14], в том числе и образование Bp-ДНК аддуктов [13].

Поскольку очевидными индукторами синтеза антител, специфичных к Bp и E2, являются аддукты их метаболитов с макромолекулярными носителями, целесообразно исследовать взаимосвязи индивидуальных иммунных реакций на химические канцерогены и стероидные гормоны с активностью ферментов биотрансформации, от которой зависит образование указанных аддуктов. В настоящей работе не выявлено предполагаемых ассоциаций иммунологического баланса/дисбаланса с полиморфными локусами генов ферментов биотрансформации у больных РМЖ. Удельный вес женщин с низкими и высокими соотношениями IgA-Bp/IgA-Pg и IgA-E2/IgA-Pg не имел различий между носителями отдельных генотипов генов *CYP1A1*2A*, *CYP1B1*, *CYP19A1*, *GSTT1* и *GSTP1*. Однако это не говорит о том, что такие взаимосвязи действительно отсутствуют. Возможно их обнаружение с расширением спектра генов ферментов биотрансформации и использованием методов нейросетей.

Целесообразность продолжения исследований в этом направлении подтверждается тем, что в настоящей работе впервые выявлены особенности конверсии стероидных рецепторов при росте РМЖ у больных с отдельными генотипами *CYP* и *GST*. Так, у носителей генотипа CC *CYP19A1* различия по распределению ER⁺/PR⁺, ER⁺/PR⁻ и ER⁻/PR⁻ опухолей между I и II-IV стадиями были незначительными. Статистически значимая выраженная конверсия ER⁺/PR⁺ опухолей в ER⁻/PR⁻ обнаружена у носителей генотипа TT *CYP19A1*. Таким образом, генотип CC можно считать протективным, а генотип TT — стимулирующим «утрату» ER и PR в процессе роста РМЖ. Конверсия ER⁺/PR⁺ опухолей в ER⁻/PR⁻ наблюдались у больных с генотипами AA и AG гена *GSTP1*. В то же время у носителей генотипа GG удельный вес ER⁺/PR⁺ и ER⁺/PR⁻ опухолей II-IV стадий был выше, а ER⁻/PR⁻ значительно ниже, чем при I стадии, т. е. имело место усиление конверсии ER⁺/PR⁺ опухолей в ER⁺/PR⁻ и торможение

в ER⁻/PR⁻. Полученные результаты авторы считают предварительными и нуждающимися в уточнении на большем количестве наблюдений.

Заключение

В результате проведенных исследований впервые был выявлен феномен иммуностимуляции конверсии ER⁺/PR⁺ опухолей в ER⁻/PR⁻ у больных РМЖ с преимущественным образованием IgA-Bp и IgA-E2 по сравнению с образованием IgA-Pg (иммунологический дисбаланс) и иммунологического торможения конверсии у больных с превышением уровней IgA-Pg над IgA-Bp и IgA-E2 (иммунологический баланс). Состояние иммунологического баланса/дисбаланса не зависело от исследованных генетических полиморфизмов (*CYP1A1*2A* (rs4646903), *CYP1B1* (rs1056836), *CYP19A1* (rs2470152), *GSTP1* (rs1695), *GSTT1* (del)). Особенности конверсии стероидных рецепторов при прогрессии РМЖ у больных с отдельными вариантами генов ферментов биотрансформации обусловлены иными механизмами, не связанными с образованием антител против химических канцерогенов и стероидных гормонов.

Практическое значение полученных результатов состоит в том, что иммуноанализ антител против химических канцерогенов и стероидных гормонов можно использовать не только для диагностики индивидуальных онкологических рисков, но и для прогноза конверсии ER⁺/PR⁺ опухолей в ER⁻/PR⁻ и коррекции эндокринотерапии РМЖ. Кроме того, иммунологические методы защиты человека от химических канцерогенов окружающей среды, предлагаемые для профилактики рака [8, 19], в перспективе можно будет применять и в комплексе лечения РМЖ с целью коррекции иммунологического дисбаланса и торможения конверсии стероидных рецепторов.

Благодарности

Авторы благодарят академика Л.И. Иванову за поддержку выбранного направления исследований, а также сотрудников лаборатории иммунохимии Института экологии человека ФИЦ УУХ СО РАН Аносову Т.П., Аносова М.П., Гурова Е.А., Чернокульскую К.С. за техническую поддержку настоящей работы.

Список литературы / References

1. Глушков А.Н., Поленок Е.Г., Гордеева Л.А., Мун С.А., Костянко М.В., Антонов А.В., Титов В.А., Вержбицкая Н.Е., Вафин И.А. Иммунологический дисбаланс при раке молочной железы и раке легкого у женщин в постменопаузе // Медицинская иммунология, 2018. Т.20, № 6. С. 927-934. [Glushkov A.N., Polenok E.G., Gordeeva L.A., Mun S.A., Kostyanko M.V., Antonov A.V., Titov V.A., Verzhbitskaya N.E., Vafin I.A. Immunological imbalance in breast cancer and lung cancer in postmenopausal women. *Meditinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2018, Vol. 20, no. 6, pp. 927-934. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2018-6-927-934.

2. Глушков А.Н., Поленок Е.Г., Гордеева Л.А., Мун С.А., Костянко М.В., Колпинский Г.И., Вафин И.А., Антонов А.В., Вержбицкая Н.Е. Иммунные реакции на химические канцерогены и стероидные гормоны у больных с доброкачественными и злокачественными опухолями молочной железы // Российский иммунологический журнал, 2021. Т. 24, № 1. С. 101-108. [Glushkov A.N., Polenok E.G., Gordeeva L.A., Mun S.A., Kostyanko M.V., Kolpinsky G.I., Vafin I.A., Antonov A.V., Verzhbitskaya N.E. Immune reactions to clinical carcinogens and steroid hormones in breast pre-cancer and cancer patients. *Rossiyskiy immunologicheskii zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2021, Vol. 24, no. 1, pp. 101-108. (In Russ.)]
3. Глушков А.Н., Поленок Е.Г., Мун С.А., Гордеева Л.А., Костянко М.В., Луценко В.А., Колпинский Г.И., Брежнева Е.В., Вафин И.А. Индивидуальный иммунологический фенотип и гормональный баланс у женщин в постменопаузе // Российский иммунологический журнал, 2020. Т. 23, № 1. С. 61-68. [Glushkov A.N., Polenok E.G., Mun S.A., Gordeeva L.A., Kostyanko M.V., Lutsenko V.A., Kolpinskiy G.I., Brezhneva E.V., Vafin I.A. Immunological phenotype and hormonal balance in postmenopausal women. *Rossiyskiy immunologicheskii zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2020, Vol. 23, no. 1, pp. 61-68. (In Russ.)]
4. Злокачественные новообразования в России в 2020 году (заболеваемость и смертность). Под ред. Каприна А.Д., Старинского В.В., Шахзадовой А.О. М.: МНИОИ им. П.А. Герцена – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, 2021. 252 с. [Malignant neoplasms in Russia in 2020 (morbidity and mortality). Ed. Kaprin A.D., Starinsky V.V., Shakhzadova A.O.] Moscow: P. Herzen Moscow State Medical Research Institute – Branch of the Federal State Budgetary Institution “NMIC of Radiology” of the Ministry of Health of Russia, 2021. 252 p.
5. Шашова Е.Е., Кондакова И.В., Слонимская Е.М., Глущенко С.А. Сравнительное изучение содержания рецепторов эстрогенов и прогестерона в неизмененной, опухолевой и метастатической тканях при раке молочной железы // Сибирский онкологический журнал, 2008. Т. 4, № 28. С. 42-45. [Shashova E.E., Kondakova I.V., Slonimskaya E.M., Glushchenko S.A. Comparative study of the levels of estrogen and progesteron receptors in normal, tumor and metastatic tissues of breast cancer patients. *Sibirskiy onkologicheskii zhurnal = Siberian Journal of Oncology*, 2008, Vol. 4, no. 28, pp. 42-45. (In Russ.)]
6. Cavalieri E.L., Rogan E.G. Depurinating estrogen-DNA adducts, generators of cancer initiation: their minimization leads to cancer prevention. *Clin. Transl. Med.*, 2016, Vol. 5, no. 1, e12. doi: 10.1186/s40169-016-0088-3.
7. Chen Z., Zhang Y., Yang J., Jin M., Wang X.W., Shen Z.Q., Qiu Z., Zhao G., Wang J., Li J.W. Estrogen promotes benzo[a]pyrene-induced lung carcinogenesis through oxidative stress damage and cytochrome c-mediated caspase-3 activation pathway in female mice. *Cancer. Lett.*, 2011, Vol. 308, no. 1, pp. 14-22.
8. de Buck S.S., Muller C.P. Immunopropylactic approaches against chemical carcinogenesis. *Vaccine*, 2005, Vol. 23, no. 17-18, pp. 2403-2406.
9. Ewa B., Danuta M.Š. Polycyclic aromatic hydrocarbons and PAH-related DNA adducts. *J. Appl. Genet.*, 2017, Vol. 58, no. 3, pp. 321-330.
10. Gammon M.D., Sagiv S.K., Eng S.M., Shantakumar S., Gaudet M.M., Teitelbaum S.L., Britton J.A., Terry M.B., Wang L.W., Wang Q., Stellman S.D., Beyea J., Hatch M., Kabat G.C., Wolff M.S., Levin B., Neugut A.I., Santella R.M. Polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts and breast cancer: a pooled analysis. *Arch. Environ. Health.*, 2004, Vol. 59, no. 12, pp. 640-649.
11. Hajian-Tilaki K. Receiver Operating Characteristic (ROC) curve analysis for medical diagnostic test evaluation. *Caspian J. Intern. Med.*, 2013, Vol. 4, no. 2, pp. 627-635.
12. Howlader N., Altekruse S.F., Li C.I., Chen V.W., Clarke C.A., Ries L.A., Cronin K.A. US incidence of breast cancer subtypes defined by joint hormone receptor and HER2 status. *J. Natl Cancer Inst.*, 2014, Vol. 106, no. 5, dju055. doi: 10.1093/jnci/dju055.
13. Kang S.C., Lee B.M. Effect of estrogen receptor (ER) on benzo[a]pyrene-DNA adduct formation in human breast cancer cells. *J. Toxicol. Environ. Health A*, 2005, Vol. 68, no. 21, pp. 1833-1840.
14. Lin S., Lin C.J., Hsieh D.P., Li L.A. ER α phenotype, estrogen level, and benzo[a]pyrene exposure modulate tumor growth and metabolism of lung adenocarcinoma cells. *Lung Cancer*, 2012, Vol. 75, no. 3, pp. 285-292.
15. Lodovici M., Luceri C., Guglielmi F., Bacci C., Akpan V., Fonnesu M.L., Boddi V., Dolara P. Benzo(a)pyrene diolepoxide (BPDE)-DNA adduct levels in leukocytes of smokers in relation to polymorphism of CYP1A1, GSTM1, GSTP1, GSTT1, and mEH. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 2004, Vol. 13, no. 8, pp. 1342-1348.
16. Mohammed H., Russell I.A., Stark R., Rueda O.M., Hickey T.E., Tarulli G.A., Serandour A.A., Birrell S.N., Bruna A., Saadi A., Menon S., Hadfield J., Pugh M., Raj G.V., Brown G.D., D'Santos C., Robinson J.L., Silva G., Launchbury R., Perou C.M., Stingl J., Caldas C., Tilley W.D., Carroll J.S. Progesterone receptor modulates ER α action in breast cancer. *Nature*, 2015, Vol. 523, no. 7560, pp. 313-317.
17. Rundle A., Tang D., Hibshoosh H., Estabrook A., Schnabel F., Cao W., Grumet S., Perera F.P. The relationship between genetic damage from polycyclic aromatic hydrocarbons in breast tissue and breast cancer. *Carcinogenesis*, 2000, Vol. 21, no. 7, pp. 1281-1289.

18. Rundle A., Tang D., Mooney L., Grumet S., Perera F. The interaction between alcohol consumption and GSTM1 genotype on polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adduct levels in breast tissue. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 2003, Vol. 12, no. 9, pp. 911-914.
19. Schellenberger M.T., Farinelle S., Willième S., Muller C.P. Evaluation of adjuvants for a candidate conjugate vaccine against benzo[a]pyrene. *Hum. Vaccin.*, 2011, Vol. 7, no. 1, pp. 166-173.
20. Siegel R.L., Miller K.D., Jemal A. Cancer Statistics, 2020. *CA Cancer J. Clin.*, 2020, Vol. 70, no. 1, pp. 7-30.
21. Yager J.D. Mechanisms of estrogen carcinogenesis: The role of E2/E1-quinone metabolites suggests new approaches to preventive intervention – A review. *Steroids*, 2015, Vol. 99 (Pt A), pp. 56-60.
22. Yang L., Zahid M., Liao Y., Rogan E.G., Cavalieri E.L., Davidson N.E., Yager J.D., Visvanathan K., Groopman J.D., Kensler T.W. Reduced formation of depurinating estrogen-DNA adducts by sulforaphane or KEAP1 disruption in human mammary epithelial MCF-10A cells. *Carcinogenesis*, 2013, Vol. 34, no. 11, pp. 2587-2592.
23. Zhang M.H., Man H.T., Zhao X.D., Dong N., Ma S.L. Estrogen receptor-positive breast cancer molecular signatures and therapeutic potentials (Review). *Biomed. Rep.*, 2013, Vol. 2, no. 1, pp. 41-52.

Авторы:

Глушков А.Н. — д.м.н., профессор, главный научный сотрудник лаборатории иммуногенетики Института экологии человека ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр угля и углехимии Сибирского отделения Российской академии наук», г. Кемерово, Россия

Поленок Е.Г. — к.фарм.н., ведущий научный сотрудник лаборатории иммунохимии Института экологии человека ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр угля и углехимии Сибирского отделения Российской академии наук», г. Кемерово, Россия

Гордеева Л.А. — к.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории иммуногенетики Института экологии человека ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр угля и углехимии Сибирского отделения Российской академии наук», г. Кемерово, Россия

Мун С.А. — к.м.н., доцент, старший научный сотрудник лаборатории иммуногенетики Института экологии человека ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр угля и углехимии Сибирского отделения Российской академии наук», г. Кемерово, Россия

Authors:

Glushkov A.N., PhD, MD (Medicine), Professor, Chief Research Associate, Immunogenetics Laboratory, Institute of Human Ecology, Federal Research Center of Coal and Coal Chemistry, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Kemerovo, Russian Federation

Polenok E.G., PhD (Pharmacy), Leading Research Associate, Laboratory of Immunochemistry, Institute of Human Ecology, Federal Research Center of Coal and Coal Chemistry, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Kemerovo, Russian Federation

Gordeeva L.A., PhD (Biology), Leading Research Associate, Laboratory of Immunogenetics, Institute of Human Ecology, Federal Research Center of Coal and Coal Chemistry, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Kemerovo, Russian Federation

Mun S.A., PhD (Medicine), Senior Research Associate, Laboratory of Immunogenetics, Institute of Human Ecology, Federal Research Center of Coal and Coal Chemistry, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Kemerovo, Russian Federation

Костянюк М.В. — ведущий инженер кафедры органической химии Института фундаментальных наук ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный университет», г. Кемерово, Россия

Антонов А.В. — заведующий отделением опухолей молочной железы ГБУЗ «Кузбасский клинический онкологический диспансер имени М.С. Раппопорта», г. Кемерово, Россия

Вержбицкая Н.Е. — к.м.н., врач-патологоанатом ГБУЗ «Кузбасский клинический онкологический диспансер имени М.С. Раппопорта», г. Кемерово, Россия

Воронина Е.Н. — к.б.н., научный сотрудник группы молекулярной генетики ФГБУН «Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук», г. Новосибирск, Россия

Колпинский Г.И. — д.м.н., профессор кафедры лучевой диагностики, лучевой терапии и онкологии ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный медицинский университет», г. Кемерово, Россия

Kostyanko M.V., Leading Engineer, Department of Organic Chemistry, Institute of Fundamental Sciences, Kemerovo State University, Kemerovo, Russian Federation

Antonov A.V., Chief, Breast Cancer Department, Kuzbass Clinical Oncology Dispensary, Kemerovo, Russian Federation

Verzhbitskaya N.E., PhD (Medicine), Clinical Pathologist, Department of Pathology, Kuzbass Clinical Oncology Dispensary, Kemerovo, Russian Federation

Voronina E.N., PhD (Biology), Research Fellow, Molecular Genetics Group, Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russian Federation

Kolpinskiy G.I., PhD, MD (Medicine), Professor, Department of Radiology, Radiotherapy and Oncology, Kemerovo State Medical University, Kemerovo, Russian Federation

Поступила 04.04.2022
Принята к печати 22.05.2022

Received 04.04.2022
Accepted 22.05.2022

ОЦЕНКА ЭКСПРЕССИИ ГЕНА β -ДЕФЕНСИНА-3 ЧЕЛОВЕКА В СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКЕ ЛОР-ОРГАНОВ

Тырнова Е.В.¹, Алешина Г.М.², Янов Ю.К.¹

¹ ФГБУ «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт уха, горла, носа и речи» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

² ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

Резюме. Целью исследования явилась оценка экспрессии гена β -дефенсина-3 человека (hBD-3) в поверхностном эпителии слизистой оболочки ЛОР-органов. Исследовали 210 образцов операционного материала, полученных при наиболее частой хирургической патологии 5 анатомо-функциональных областей: нос и околоносовые пазухи, среднее ухо, носоглотка, ротоглотка, гортань. Контролями служили: 1) нижние носовые раковины, 2) нормальная слизистая среднего носового хода. Оценку экспрессии генов hBD-3 и β -актина проводили методом обратной транскрипции и ПЦР в режиме реального времени. В слизистой оболочке носа и околоносовых пазух очень низкая экспрессия выявлена в 14,29–33,33% случаев, наиболее часто в ткани полипов среднего носового хода и решетчатого лабиринта (53,84%), отсутствовала в гипертрофических нижних носовых раковинах. В полости среднего уха частота детекции экспрессии гена hBD-3 варьировала от 7,69% в слизистой суперструктур стремени до 53,85% образцов слизистой при наличии холестеатомы. Экспрессия гена hBD-3 детектирована в большинстве образцов тканей с высоким микробным обсеменением: небные миндалины 100%, гипертрофия аденоидов 84,62%, аденоиды при гипертрофии аденоидов и небных миндалин 87,5%, фиброзно-сосудистые полипы гортани 87,5%, другая патология гортани 77,78% образцов. Самые высокие уровни экспрессии гена hBD-3 выявлены в гортани при фиброзно-сосудистых полипах. Полученные данные свидетельствуют о двух функционально различных типах иммунного ответа слизистой ЛОР-органов. В анатомо-функциональных областях, выстланных мерцательным эпителием (средний и нижний носовые ходы, верхнечелюстные, решетчатые пазухи, среднее ухо) детектированы достоверно низкие частота (точный тест Фишера, $p < 0,05$ до $p < 0,001$) и уровни (тест Манна–Уитни, $p < 0,05$ до $p < 0,001$) экспрессии гена hBD-3, за исключением ткани полипов среднего носового хода и решетчатого лабиринта и слизистой барабанной полости при холестеатоме, что, возможно, связано с характером патологического процесса. В зонах, выстланных плоским эпителием или сочетанием плоского и реснитчатого эпителиев, экспрессия гена hBD-3 детектирована практически повсеместно и на достоверно более высоких уровнях. В контексте хронического воспаления и связанных с инфекцией заболеваний ЛОР-органов, помимо прямой микробоцидной активности hBD-3 на первой линии защиты, возможно нарушение регуляции пептида и даже неблагоприятные патогенетические эффекты hBD-3: повышенная чувствительность к инфекциям, патологические изменения состава комменсалов, фиброзное ремоделирование.

Ключевые слова: β -дефенсин-3 человека, экспрессия гена, аденоиды, небные миндалины, слизистая носа, слизистая околоносовых пазух, полипы носа, полипы околоносовых пазух, хронический средний отит, отосклероз, гортань

Адрес для переписки:

Тырнова Елена Валентиновна
ФГБУ «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт уха, горла, носа и речи» Министерства здравоохранения РФ
190013, Россия, Санкт-Петербург, ул. Бронницкая, 9.
Тел.: 8 (812) 710-17-55
E-mail: 7101755@mail.ru

Address for correspondence:

Tyrnova Elena V.
St. Petersburg Research Institute of Ear, Nose, Throat and Speech
190013, Russian Federation, St. Petersburg, Bronnitskaya str., 9.
Phone: 7 (812) 710-17-55
E-mail: 7101755@mail.ru

Образец цитирования:

Е.В. Тырнова, Г.М. Алешина, Ю.К. Янов «Оценка экспрессии гена β -дефенсина-3 человека в слизистой оболочке ЛОР-органов» // Медицинская иммунология, 2022. Т. 24, № 4. С. 779–792.
doi: 10.15789/1563-0625-HBD-2384
© Тырнова Е.В. и соавт., 2022

For citation:

E.V. Tyrnova, G.M. Aleshina, Yu.K. Yanov “Human β -defensin-3 gene expression in mucosa of ORL organs”, Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2022, Vol. 24, no. 4, pp. 779–792.
doi: 10.15789/1563-0625-HBD-2384
DOI: 10.15789/1563-0625-HBD-2384

HUMAN β -DEFENSIN-3 GENE EXPRESSION IN MUCOSA OF ORL ORGANS

Tyrnova E.V.^a, Aleshina G.M.^b, Yanov Yu.K.^a

^a St. Petersburg Research Institute of Ear, Nose, Throat and Speech, St. Petersburg, Russian Federation

^b Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

Abstract. The aim of present study was to investigate the hBD-3 gene expression in the surface epithelium of mucosa in ORL organs. We have studied a total of 210 mucosal samples, obtained at the most frequent surgical interventions from 5 different anatomical functional areas: nose and paranasal sinuses, middle ear, nasopharynx, oropharynx, larynx. The inferior turbinate mucosa (1) and the normal middle nasal passage mucosa (2) served as controls. Estimation of hBD-3 and β -actin gene expression was performed by reverse transcription and real-time PCR. In the nasal and sino-nasal mucosa, only negligible expression levels were detected in 14.29–33.33% of samples, most often in the specimens from the middle nasal passage and ethmoid labyrinth polyps (53.84%), being absent in hypertrophic inferior turbinate. In the middle ear cavity, the frequency detection of the hBD-3 gene expression varied from 7.69% in the stapes superstructures mucosa to 53.85% of the mucosal samples in the presence of cholesteatoma. hBD-3 gene expression was detected in most tissue samples with high microbial contamination: palatine tonsils (100%); adenoid hypertrophy (84.62%); adenoids in hypertrophic states of adenoids and palatine tonsils (87.5%); laryngeal fibrous-vascular polyps (87.5%); other laryngeal pathology (77.78% of the samples). The highest levels of hBD-3 gene expression were found in laryngeal fibrous-vascular polyps. The findings presumed two functionally different types of immune response in mucosa of the ORL organs. In the anatomical-functional areas lined with ciliated epithelium (middle and inferior nasal passages, maxillary and ethmoid sinuses, middle ear), significantly lower frequencies (Fisher's exact test, $p < 0.05$ to $p < 0.001$) and levels (Mann–Whitney test, $p < 0.05$ to $p < 0.001$) of hBD-3 gene expression were detected, except of polyps of the middle nasal passage and ethmoid labyrinth, and mucosa of the tympanic cavity in cholesteatoma, which may be related to the nature of the pathological process. In the areas lined with squamous epithelium or a combination of squamous and ciliated epithelium, hBD-3 gene expression was detected almost everywhere and at significantly higher levels. In the context of chronic inflammation and infection-related diseases of the ORL organs, in addition to the direct microbicidal activity of hBD-3 as the first line of immune response, one may suggest peptide dysregulation and, even, pathogenetic effects of hBD-3, e.g., increased sensitivity to infections, pathological changes in the composition of the commensal bacteria, fibrous remodeling.

Keywords: human β -defensin-3, gene expression, adenoids, palatine tonsils, nasal mucosa, sinonasal mucosa, nasal polyps, sinonasal polyps, chronic otitis media, otosclerosis, larynx

Введение

Первая линия защиты респираторного тракта представлена эпителием дыхательных путей, псевдомногослойным (многорядным) эпителием базальных клеток, реснитчатых мерцательных клеток и бокаловидных эпителиальных клеток. Клетки эпителиального пласта участвуют во врожденном иммунитете слизистой оболочки верхних дыхательных путей путем выполнения функций механического барьера, мукоцилиарного клиренса и секреции антимикробных веществ. Эпителий дыхательных путей считают иммунологически активной тканью, которая влияет на такие функции, как распознавание патогенов, нейтрализация патогенов и активация дополнительных, более отдаленных иммунных механизмов. В пределах сети врожденного иммунитета дыхательных путей одним из первых защитных

механизмов, встречающих вторгающиеся патогены, являются антимикробные пептиды [35]. Антимикробные катионные пептиды, такие как дефенсины и кателицидин, обладают широким спектром микробицидной активности в отношении респираторных бактерий, вирусов и грибов. Однако их функции простираются за пределы антимикробного действия и включают модуляцию врожденных и адаптивных иммунных реакций на инфекцию, а также репарацию после повреждения. Антимикробные пептиды играют важную роль при заживлении ран в ангиогенезе, аттракции лейкоцитов, разрешении воспаления и пролиферации [2, 38]. Предполагают, что антимикробные пептиды вовлечены в поддержание равновесия про- и противовоспалительных сигнальных путей, тем самым защищая организм от чрезмерной иммуностимуляции [35].

β-дефенсин-3 человека (human β-defensin-3 (hBD-3)) обладает широким спектром антибактериальной активности, в частности в отношении *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* [16, 30], *S. pneumoniae* [31], нетипируемого *Haemophilus influenzae* (NTHi) [36, 39], *Pseudomonas aeruginosa* [34], *Moraxella catarrhalis* [15], дрожжам *Candida albicans* и *Malassezia furfur* [34]. Подобно α-дефенсинам hBD-3 ингибирует заражение вирусом простого герпеса HSV-1 путем связывания с вирусным гликопротеином gB и клеточным гликозаминогликаном гепаран сульфатом, предпочтительным для прикрепления рецептором клетки хозяина [17]. Благодаря прямому взаимодействию с вирионом и посредством модуляции ко-рецепторов CXCR4 hBD-3 тормозит заражение вирусными штаммами фенотипов X4 и R5 HIV-1-инфекции (ВИЧ-1) [40]. hBD-3 приписывают многочисленные присущие цитокинам функции, включая свойства хемоаттрактанта (моноцитов, макрофагов и нейтрофилов через хемокиновый рецептор CCR2, незрелых дендритных клеток и Т-клеток памяти через CCR6 и тучных клеток через фосфолипазу C) [29], антагонизм с рецептором CXCR4 [11], активацию тучных клеток с повышением сосудистой проницаемости [6]. Эти иммуномодулирующие свойства связывают врожденную иммунную защиту с адаптивной (клеточной). В дополнение к хемокиновой природе hBD-3 способен выступать в качестве эндогенного агониста TLR и активирует TLR1 и TLR2 [12], тем самым индуцируя экспрессию цитокинов и активацию иммунных клеток (моноцитов и нейтрофилов).

hBD-3 проявляет низкую базальную экспрессию на поверхности слизистой, но экспрессия усиливается при стимуляции различными провоспалительными стимулами, включая цитокины и химические вещества бактериального [16] и вирусного [4] происхождения [35].

Хронические инфекции верхних дыхательных путей связывают с дисбиозом микробиома респираторного тракта. Эти дисбиозы (функциональные нарушения или изменения состава микробиома) часто характеризуются потерей полезных, комменсальных бактерий, которые защищают от чрезмерного роста условно-патогенных бактерий [22]. Дефекты физиологических механизмов антимикробных пептидов на границе раздела с окружающей средой связывают с повышенной чувствительностью к инфекциям, подверженностью хроническому воспалению слизистой оболочки и нарушениям (патологическим отклонениям) состава комменсальной микробиоты [28].

В связи с этим целью исследования явилась оценка экспрессии гена β-дефенсина-3 человека в поверхностном эпителии слизистой оболочки

ЛОР-органов больных хроническими воспалительными заболеваниями носа и околоносовых пазух, среднего уха, носоглотки, ротоглотки и гортани для уточнения его роли в патогенетических механизмах возникновения хронического воспаления верхних дыхательных путей.

Материалы и методы

Объектом исследования служили образцы ткани слизистой оболочки ЛОР-органов, полученные от больных хроническими воспалительными заболеваниями во время планового хирургического вмешательства в условиях общей анестезии (табл. 1). Операционный материал немедленно помещали в стабилизирующий раствор RNeasy (Ambion, США) в отношении 1:5 и хранили до проведения молекулярно-генетических исследований при температуре -20 °C.

Исследовали 210 образцов операционного материала от 201 больного. В качестве контрольных тканей служили нижние носовые раковины больных с искривлением перегородки носа (контроль 1), наиболее часто используемые по данным литературы с этой целью, а также образцы здоровой ткани слизистой оболочки среднего носового хода, полученные попутно в ходе операций (контроль 2). Хирургическое лечение проведено больным в период вне обострения заболевания.

Общую РНК выделяли в соответствии с протоколом Gen Elute Mammalian Total RNA Miniprep Kit и On-Column DNase I Digestion Set (Sigma-Aldrich, США) из поверхностного эпителия образцов операционного материала. Синтез первой цепи комплементарной ДНК (кДНК) проводили с использованием обратной транскриптазы M-MLV (Promega, США) в присутствии oligo(dT) и dNTPs (Медиген, РФ). Амплификацию проводили с использованием специфических праймеров hBD-3 (прямого 5'-tatctctgtttgcttgccttcc-3' и обратного 5'-cctctgactctgcaataatttctgtaat-3') и β-актина человека (прямой праймер 5'-gggtcagaaggattcctatg-3', обратный 5'-gggtctcaaacatgatctggg-3') [3] и реактивов iQ™ SYBR Green Supermix (Bio-Rad, США) методом ПЦР в режиме реального времени с помощью системы детекции продуктов ПЦР в реальном времени CFX96 Touch™ и программного обеспечения CFX Manager™ версия 2.1 (Bio-Rad, США). Режим проведения реакции амплификации: инициальный нагрев 5 мин при t = 95 °C, затем 40 циклов: 10 с при t = 95 °C, 1 мин при t = 60 °C. Считывание проводили при 72 °C. Специфичность продуктов реакции оценивали по кривым плавления. Температура плавления продуктов амплификации – 78 °C для hBD-3 и 88 °C для β-актина. Уровни экспрессии гена hBD-3

ТАБЛИЦА 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ОБРАЗЦОВ, ЧАСТОТА ДЕТЕКЦИИ И УРОВНИ ЭКСПРЕССИИ ГЕНА β -ДЕФЕНСИН-3 ЧЕЛОВЕКА В СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКЕ ЛОР-ОРГАНОВ

TABLE 1. CHARACTERISTICS OF THE SURGICAL SAMPLES, FREQUENCY DETECTION AND LEVELS OF HUMAN β -DEFENSIN-3 GENE EXPRESSION IN THE ENT ORGANS MUCOSA

№ группы Number of the group	Операционный материал – слизистая оболочка Surgical mucosal samples	Количество образцов Samples number	Частота детекции экспрессии гена hBD-3 Frequency detection of hBD-3 gene expression		Экспрессия гена hBD-3 относительно гена β -актина, усл. ед. hBD-3 gene expression relatively β -actin gene expression		Диагноз / показания к операции Diagnosis / indications for surgery	Анатомо-функциональная область Anatomical functional area
			Абс. ч. Abs.	%	Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)	M $\pm$ m		
1	Нижние носовые раковины (контроль 1, без воспаления) Inferior turbinate mucosa (control 1, without inflammation)	13	2/13*	15,38	0,0 (0,0-0,0)*	0,000003077 $\pm$ 0,000002371	Искривление перегородки носа Nasal septum deviation	I. Нос и околоносовые пазухи I. Nasal and sinonasal cavity
2	Слизистая среднего носового хода (контроль 2, без воспаления) Middle nasal passage mucosa (control 2, without inflammation)	13	4/13#	30,77	0,0 (0,0000000-0,0000055)#	0,000010850 $\pm$ 0,000008425	Киста лобной пазухи / сфеноидит / киста верхнечелюстной пазухи / искривление перегородки носа / эпифора / ликворея / дакриоцистит / инородное тело верхнечелюстной пазухи Frontal sinus cyst / sphenoiditis / maxillary sinus cyst / nasal septum deviation / epiphora / liquorhea nasalis / dacryocystitis / maxillary sinus foreign body	
3	Гипертрофические нижние носовые раковины Hypertrophic inferior turbinate mucosa	13	0/13#	0	0,0 (0,0-0,0)	0,0 $\pm$ 0,0	Искривление перегородки носа, гипертрофический ринит Nasal septum deviation and hypertrophic rhinitis	
4	Слизистая верхнечелюстной пазухи Maxillary sinus mucosa	14	2/14	14,29	0,0 (0,0-0,0)	0,000011430 $\pm$ 0,000007764	Инородное тело / кистоподобное образование верхнечелюстной пазухи Foreign body / cystiform formation of maxillary sinus	

Таблица 1 (продолжение)
Table 1 (continued)

№ группы Number of the group	Операционный материал – слизистая оболочка Surgical mucosal samples	Количество образцов Samples number	Частота детекции экспрессии гена hBD-3 Frequency of detection of hBD-3 gene expression		Экспрессия гена hBD-3 относительно гена β-актина, усл. ед. hBD-3 gene expression relatively β-actin gene expression		Диагноз / показания к операции Diagnosis / indications for surgery	Анатомо-функциональная область Anatomical functional area
			Абс. ч. Abs.	%	Me (Q _{0,25} -Q _{0,75})	M±m		
5	Носовые, хоанальные полипы Nasal, choanal polyp mucosa	13	2/13	15,38	0,0 (0,0-0,0)	0,0000008462 ±0,0000007667	Хронический полипозный риносинусит Chronic rhinosinusitis with nasal polyps	I. Нос и околоносовые пазухи I. Nasal and sinonasal cavity
6	Полипы верхнечелюстной пазухи Maxillary sinus polyp mucosa	6	2/6	33,33	0,0 (0,00000-0,000001)	0,000003333 ±0,000002108	Хронический полипозный риносинусит Chronic rhinosinusitis with nasal polyps	
7	Полипы среднего носового хода и решетчатого лабиринта Middle nasal passage and ethmoidal polyps mucosa	13	7/13	53,84	0,000001 (0,000000-0,000001)	0,00001038 ±0,000008436	Хронический полипозный риносинусит Chronic rhinosinusitis with nasal polyps	
8	Аденоиды Adenoids	13	11/13* #	84,62	0,00001 (0,000001-0,000110)* #	0,00007169 ±0,00003411	Гипертрофия аденоидов, приводящая к назальной обструкции Adenoid hypertrophy causing nasal obstruction	II. Аденоиды (Nasopharynx) II. Adenoids (Nasopharynx)
9	Аденоиды (ГНМ) Adenoids (PTN)	8	7/8* #	87,50	0,00001 (0,0000100-0,0000925)* #	0,00005375 ±0,00003257	Гипертрофия аденоидов и гипертрофия небных миндалин (ГНМ), приводящие к затруднению носового дыхания и развитию секреторного отита Adenoid hypertrophy and palatine tonsil hypertrophy (PTN), leading to difficulty in nasal breathing and the development of secretory otitis media	

Таблица 1 (продолжение)
Table 1 (continued)

№ группы Number of the group	Операционный материал – слизистая оболочка Surgical mucosal samples	Количество образцов Samples number	Частота детекции экспрессии гена hBD-3 Frequency of detection of hBD-3 gene expression		Экспрессия гена hBD-3 относительно гена β-актина, усл. ед. hBD-3 gene expression relatively β-actin gene expression		Диагноз / показания к операции Diagnosis / indications for surgery	Анатомо-функциональная область Anatomical functional area
			Абс. ч. Abs.	%	Me (Q _{0,25} -Q _{0,75})	M±m		
10	Небные миндалины (ГНМ) Palatine tonsils (PTH)	8	8/8* #	100	0,00025 (0,0001850-0,0008475)* #	0,0007925 ±0,0004350	Гипертрофия аденоидов и ГНМ, приводящие к затруднению носового дыхания и развитию секреторного отита Adenoid hypertrophy and PTH, leading to difficulty in nasal breathing and the development of secretory otitis media	III. Небные миндалины III. Palatine tonsils (Oropharynx)
11	Небные миндалины (ХТ) Palatine tonsils (CT)	13	13/13* #	100	0,00034 (0,0000200-0,0008800)* #	0,0007254 ±0,0003039	Хронический декомпенсированный тонзиллит Chronic decompensated tonsillitis (CT)	
12	Слизистая барабанной полости Tympanic cavity mucosa	13	6/13	46,15	0,0 (0,00000-0,00041)	0,002518 ±0,002240	Хронический туботимпанальный средний отит, центральная перфорация Chronic tubotympanic otitis media, central perforation	IV. Среднее ухо IV. Middle ear cavity
13	Слизистая барабанной полости при тимпаносклерозе Tympanic cavity mucosa with tympanosclerosis	13	5/13	38,46	0,0 (0,0000000-0,0000055)	0,00006015 ±0,00004113	Хронический туботимпанальный средний отит, тимпаносклероз Chronic tubotympanic otitis media, tympanosclerosis	
14	Слизистая барабанной полости при холестеатоме Tympanic cavity mucosa with cholesteatoma	13	7/13	53,85	0,00001 (0,0000000-0,000555)	0,0007715 ±0,0005070	Хронический гнойный эпимантральный средний отит, холестеатома Chronic purulent epimantal otitis media, cholesteatoma	

Таблица 1 (окончание)
Table 1 (continued)

№ группы Number of the group	Операционный материал – слизистая оболочка Surgical mucosal samples	Количество образцов Samples number	Частота детекции экспрессии гена hBD-3 Frequency of detection of hBD-3 gene expression		Экспрессия гена hBD-3 относительно гена β-актина, усл. ед. hBD-3 gene expression relatively β-actin gene expression		Диагноз / показания к операции Diagnosis / indications for surgery	Анатомо-функциональная область Anatomical functional area
			Абс. ч. Abs.	%	Me ($Q_{0,25}-Q_{0,75}$)	M±m		
15	Слизистая мастоидальной полости Mastoid cavity mucosa	14	4/14	28,57	0,0 (0,000000-0,000115)	0,001706 ±0,001562	Хронический гнойный эпиглоттит, холестеатома Chronic purulent epiglottitis otitis media, cholesteatoma	IV. Среднее ухо IV. Middle ear cavity
16	Слизистая суперструктур стремени Stapes superstructures mucosa	13	1/13	7,68	0,0 (0,0-0,0)	0,0000007692 ±0,0000007692	Отосклероз, тугоухость Otosclerosis, hearing loss	
17	Слизистая гортани Laryngeal mucosa	8	7/8*	87,50	0,00314 (0,0000975-0,0130700)* #	0,007574 ±0,004148	Фиброзно-сосудистый полип Fibrous-vascular polyp	V. Гортань V. Larynx
18	Слизистая гортани Laryngeal mucosa	9	7/9*	77,78	0,00001 (0,000005-0,000085)* #	0,004773 ±0,004746	Папилломатоз / киста / ангиофиброза / гипертрофический ларингит / стеноз Papillomatosis / cyst / angiofibroma / hypertrophic laryngitis / stenosis	

Примечание. * – $p < 0,05$ по сравнению с контрольной группой 1; # – $p < 0,05$ по сравнению с контрольной группой 2. Подробное описание различий между группами приведено в тексте статьи. Данные по экспрессии гена hBD-3 относительно экспрессии гена β-актина (усл. ед.) представлены как медиана (нижний квартиль – верхний квартиль) и среднее арифметическое ± стандартная ошибка среднего.

Note. * , $p < 0.05$ compared to control 1; # , $p < 0.05$ compared to control 2. Detailed description of the differences between the groups is given in the article text. Data on hBD-3 gene expression relative to β-actin gene expression (conventional units) are presented as median (lower quartile – upper quartile) and mean ± standard error of the mean.

стандартизовали с помощью программного обеспечения прибора относительно гена внутреннего контроля β -актина.

Статистическую обработку данных проводили с помощью программы GraphPad Prism 5. Для проверки гипотезы о нормальном распределении использованы критерий согласия Колмогорова—Смирнова с поправкой Даллал—Вилкинсон—Лиллиефорса, тесты Д’Агостино и Пирсона и Шапиро—Уилка. Межгрупповой дисперсионный анализ выполнен с использованием критерия Краскела—Уоллиса. Уровни относительной экспрессии гена hBD-3 в исследуемых группах сравнивали с использованием U-теста Манна—Уитни и знакового теста Вилкоксона. Различия частоты детекции экспрессии гена hBD-3 оценивали с использованием точного теста Фишера и отношения шансов (odds ratio (OR)). Различия считали достоверными при $p < 0,05$.

Результаты

Экспрессия гена hBD-3 детектирована во всех видах исследованных тканей, отсутствовала только в образцах гипертрофических нижних носовых раковин (группа 3). Частота детекции экспрессии гена hBD-3 варьировала в зависимости от типа ткани и нозологической формы (табл. 1). Самая низкая частота детекции экспрессии гена hBD-3 выявлена в слизистой оболочке носа и околоносовых пазух, за исключением ткани полипов среднего носового хода и решетчатого лабиринта (группа 7), в которых экспрессия гена hBD-3 обнаружена более чем в половине образцов (53,84%), статистически значимы различия между группами 3 (гипертрофический ринит) и 7 (OR 31,15, доверительный интервал (95% confidence interval (CI) 1,53÷633,6, $p < 0,01$). Самая высокая частота детекции экспрессии гена hBD-3 наблюдалась в тканях, патофизиологические синдромы заболеваний которых включают повышенное микробное обсеменение (аденоиды, небные миндалины, гортань). Установлены статистически значимые различия частоты детекции экспрессии гена hBD-3 между анатомо-функциональными зонами. В контроле 1 (нижние носовые раковины) частота детекции экспрессии гена hBD-3 меньше, чем в аденоидах (группы 8 и 9) (OR 30,25, CI 3,59÷254,9, $p < 0,002$ и OR 38,50, CI 2,91÷508,8, $p < 0,01$ соответственно), небных миндалинах (группы 10 и 11) (OR 78,20, CI 3,31÷1850, $p < 0,001$ и OR 124,2, CI 5,39÷2862, $p < 0,001$ соответственно), гортани (группы 17 и 18) (OR 38,5, CI 2,91÷508,8, $p < 0,01$ и OR 19,25, CI 2,18÷169,9, $p < 0,01$ соответственно). В контроле 2 (слизистая среднего носового хода) частота детекции экспрессии гена hBD-3 ниже, чем в аденоидах (группы 8 и 9) (OR 12,38,

CI 1,83÷83,81, $p < 0,02$ и OR 15,75, CI 1,42÷174,25, $p < 0,05$ соответственно), небных миндалинах (группы 10 и 11) (OR 35,89, CI 1,67÷769,7, $p < 0,01$ и OR 57,00, CI 2,73÷1189, $p < 0,001$ соответственно), слизистой оболочке гортани при фиброзно-сосудистых полипах (группа 17) (OR 15,75, CI 1,42÷174,25, $p < 0,05$). В полости среднего уха минимальная частота детекции экспрессии гена hBD-3 отмечена при стерильном патологическом остеодистрофическом процессе отосклерозе (группа 16), максимальная — при холестеатоме (группа 14) (OR 14,00, CI 1,39÷141,6, $p < 0,05$), различия частоты детекции экспрессии гена hBD-3 в слизистой среднего уха статистически значимы также по сравнению с тканью аденоидов, небных миндалин и гортани.

Уровни экспрессии гена hBD-3 в исследованных тканях варьировали подобно частоте детекции (табл. 1). Установленные достоверные различия уровней экспрессии гена hBD-3 в исследованных тканях, по-видимому, обусловлены в первую очередь анатомическими функциональными областями (нос и околоносовые пазухи, аденоиды, небные миндалины, среднее ухо, гортань), и в меньшей степени характером патологического процесса. Самые низкие уровни наблюдали в слизистой полости носа и околоносовых пазух, в пределах этой анатомической области статистически значимы различия между группами 3 (гипертрофический ринит) и 7 (полипы среднего носового хода и решетчатого лабиринта) ($p < 0,05$). В аденоидах (группы 8 и 9, $p < 0,01$ в обоих случаях), небных миндалинах (группы 10 и 11, $p < 0,001$ в обоих случаях), барабанной полости при холестеатоме (группа 14, $p < 0,05$) и гортани (группы 17 и 18, $p < 0,001$ и $p < 0,01$ соответственно) уровни экспрессии гена hBD-3 выше, чем в контроле 1 (нижние носовые раковины). По сравнению со слизистой оболочкой среднего носового хода (контроль 2) уровни экспрессии гена hBD-3 повышены в аденоидах (группы 8 и 9, $p < 0,05$ в обоих случаях), небных миндалинах (группы 10 и 11, $p < 0,001$ в обоих случаях) и гортани (группы 17 и 18, $p < 0,01$ и $p < 0,05$ соответственно). В слизистой среднего уха минимальные уровни экспрессии гена hBD-3 отмечены при стерильном остеодистрофическом патологическом процессе отосклерозе (группа 16) ($p < 0,05$ по сравнению с группами 12 и 14), максимальные — при холестеатоме (группа 14), различия уровней экспрессии гена hBD-3 в слизистой среднего уха статистически значимы по сравнению с тканью аденоидов, небных миндалин и гортани.

Обсуждение

Эпителиальные клетки респираторного тракта играют важную роль в защите поверхности дыха-

тельных путей от внедряющихся патогенов путем выработки эффекторных молекул [35]. В дыхательных путях β-дефенсины 1–4 вырабатываются эпителиальными клетками, а также различными иммунными клетками [10, 37]. Прямая антимикробная активность основана на заряд-зависимом взаимодействии положительно заряженных антимикробных пептидов с отрицательно заряженной поверхностью микроорганизмов. Описаны также заряд-независимые механизмы действия антимикробных пептидов, которые отчасти включают специфические взаимодействия с мембранными рецепторами или внутриклеточными молекулами. β-дефенсины обычно секретируются в ответ на воспалительные или микробные стимулы в областях (сайтах) входных ворот инфекции. Каждый антимикробный пептид проявляет уникальный спектр антимикробной активности.

hBD-3 обладает самым высоким положительным зарядом (+11) среди β-дефенсинов человека. В отличие от многих других дефенсинов, hBD-3 сохраняет антимикробную активность против широкого круга патогенов даже в условиях с высоким содержанием соли. hBD-3 считают наиболее сильным бактерицидным агентом в отношении мультирезистентных штаммов *S. aureus*, подобно ванкомицину [30, 32, 34]. Этот условно патогенный микроорганизм бессимптомно колонизирует кожу и нос человека, а также способен вызывать как вялые хронические инфекции, так и острые и агрессивные инфекции в случаях чрезмерного, беспорядочного роста [22].

Целостность носового барьера служит предпосылкой для функционирования защитных систем верхних дыхательных путей, в особенности при постоянной угрозе вдыхания потенциально опасных микроорганизмов. Антимикробные пептиды играют важную роль в поддержании барьерной функции, т. к. механический барьер, мукоцилиарный транспорт и местные врожденные противомикробные реакции составляют так называемый иммунный барьер [33].

Общей чертой иммунопатогенеза многих форм хронического риносинусита и полипоза носа является повреждение иммунного барьера, включая повышенную проницаемость эпителия слизистой оболочки и снижение выработки важных антимикробных веществ и реакций. Полипозный риносинусит – хроническое заболевание слизистой оболочки носа и околоносовых пазух, основным клиническим проявлением которого является образование и рецидивирующий рост полипов. Принято считать, что при хроническом риносинусите нарушен назальный микробиом, и определенные микроорганизмы участвуют в стимуляции воспаления у части больных. Сравнение

образцов слизистой из различных участков полости носа здоровых людей показало, что средний носовой ход и пазухи клиновидной и решетчатой кости (сфено-этмоидальный карман) практически идентичны по составу микробного сообщества [22]. Характер назального микробиома определил ряд гипотез патогенеза полипоза носа: грибковая гипотеза (*Aspergillus* или *Alternaria spp.*), гипотеза образующих биопленки бактерий (*NTHi*, *S. pneumoniae*, *S. aureus* и др.), гипотеза респираторных вирусов (риновирус, грипп), до 50% случаев хронического риносинусита, особенно тяжелой формы с полипами, описывает гипотеза колонизации *S. aureus* [33]. До настоящего времени исследования микробиома носа не выявили единый причинный агент заболевания; основные результаты демонстрируют увеличение численности и снижение разнообразия назального микробиома при хроническом риносинусите [18, 33]. Дисбиотические сообщества у больных хроническим риносинуситом состоят, в основном, из представителей родов *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Haemophilus*, *Pseudomonas*, *Moraxella* [23]. Эпидемиологическими исследованиями характера носительства *S. aureus* в общей популяции установлено, что бессимптомное носительство *S. aureus* в полости носа может встречаться у 20–30% населения в целом, с преобладающей локализацией в преддверии носа [25]. Недостаточность индуцированной повреждением экспрессии hBD-3 связывают с тяжестью кожных инфекций и носовым носительством *S. aureus* [27, 41, 42]. Носовое носительство *S. aureus* может быть постоянным или интермиттирующим и может создать резервуар для аутогенных инфекций и перекрестной передачи [25]. В нашей работе частота детекции экспрессии гена hBD-3 в контрольных тканях слизистой полости носа составила 15,38–30,77%, частота детекции и уровни экспрессии гена hBD-3 в слизистой носовых хоанальных полипов, слизистой и полипов верхнечелюстных пазух не отличались от контрольных тканей. Самая большая (53,84%) в анатомической области «нос и околоносовые пазухи» частота детекции экспрессии гена hBD-3 в ткани полипов среднего носового хода и решетчатого лабиринта (группа 7) может быть обусловлена природой заболевания, поскольку полипы растут в средний носовой ход, а также колонизацией *S. aureus*, индуцирующей экспрессию гена hBD-3.

hBD-3 считают важнейшим антимикробным пептидом защиты среднего уха. Микробные агенты попадают в полость среднего уха как через слуховую трубу, так и через наружный слуховой проход при перфорации барабанной перепонки. hBD-3 обладает бактерицидной активностью *in vitro* в отношении множества патогенов челове-

ка, включая три главных бактериальных патогена среднего отита, каждый из которых способен формировать биопленки, *S. pneumoniae*, *NTHi* и *M. catarrhalis* [20, 39], с преобладанием *NTHi* в случаях хронического среднего отита [24]. Наиболее частыми патогенами хронического гнойного среднего отита, характеризующегося персистирующей инфекцией с воспалением среднего уха и ячеистой структуры сосцевидного отростка, перфорацией барабанной перепонки и отореей, являются *P. aeruginosa* и *S. aureus* [1, 9, 26]. Известна мощная антимикробная активность hBD-3 в отношении *S. aureus* и *P. aeruginosa* [16, 30, 34]. В нашей работе максимальная частота детекции и уровни экспрессии индуцибельного гена пептида hBD-3 выявлены в слизистой барабанной полости при холестеатоме. Вероятно, персистенция этих микроорганизмов в данном случае может служить индуктором экспрессии гена hBD-3. Реализация механизмов иммунного уклонения обеспечивает выживание планктонного *NTHi*, других бактерий и вирусов в среднем ухе, однако неэффективность защиты этой биологической ниши во время хронического заболевания, включающего компонент биопленок, также может оказывать модулирующие эффекты на экспрессию гена hBD-3 при катаральных формах хронического среднего отита.

Ротовая полость человека сильно колонизирована вирусами, грибами, простейшими, археями и бактериями, как комменсалами, так и условно патогенными. Анализ, проведенный в рамках проекта «микробиом человека», показал, что среди систем организма с наибольшим бактериальным разнообразием микробиом полости рта уступает только ободочной кишке, при этом горло (миндалины) содержали уникальных членов сообщества [18, 22]. Индуцибельные β -дефенсины человека всегда экспрессированы в нормальном эпителии ротовой полости [40], в том числе в эпителии крипт и поверхности небных миндалин [5], но это свойство не разделяют другие слизистые барьеры. Считают, что в ротовой полости антимикробные пептиды, в том числе hBD-3, не только ограничивают чрезмерный рост комменсальных микроорганизмов, но также предупреждают колонизацию патогенами [28]. Показано, что комменсальные бактерии с иммуномодулирующими свойствами способны стимулировать иммунные реакции организма для обеспечения эффективной и быстрой защиты от патогенов, они индуцируют hBD и другие антимикробные пептиды в нормальных эпителиальных клетках ротовой полости человека и тем самым защищают область, постоянно подвергающуюся действию бактерий, от колонизации оппортунистическими патогенами. В частности, охарактеризован липо-

протеин FAD-I (*Fusobacterium*-ассоциированный индуктор дефенсинов), связанный с наружной мембраной *F. nucleatum*, который способен выступать в качестве гомеостатического агента путем активации эндогенных антимикробных пептидов [13]. На уровне бактериальных семейств в ротоглотке наиболее распространенным является *Streptococcaceae*. Показано, что изменение пропорционального относительного содержания многочисленных ротоглоточных бактерий способствует рецидивирующему тонзиллиту [18]. Сравнение микробиома небных миндалин больных рецидивирующим тонзиллитом взрослых и гипертрофией миндалин детей установило присутствие стрептококков во всех образцах, тогда как *NTHi*, виды *Neisseria* и *S. pneumoniae* чаще присутствовали у детей [18]. Показано, что уровни экспрессии мРНК hBD-3 в небных миндалинах при тонзиллярной гипертрофии ниже, чем при рецидивирующем тонзиллите и очаговой инфекции миндалин, что свидетельствует о том, что хроническое воспаление индуцирует экспрессию дефенсинов. Примечательно, что мРНК hBD-2 и hBD-3 были специфически экспрессированы в ткани небных миндалин, но не в моноцитах периферической крови и слизистой тонкого кишечника [21].

Аденоиды (глоточные миндалины) и небные миндалины являются частью лимфоидной ткани носоглотки и служат основными участками микробного распознавания и защиты [22]. Адено-тонзиллярная болезнь (гипертрофия аденоидов и небных миндалин) является широко распространенной ЛОР-патологией, этиологию и патогенез которой связывают с хроническим воспалением, инициируемым синергическими и антагонистическими взаимодействиями между вирусами и бактериальной инфекцией, главным образом, *S. aureus*, *Haemophilus spp.* и *Streptococcus spp.*, персистирующей преимущественно внутриклеточно или внутри биопленок слизистых оболочек. Рецидивирующее или хроническое воспаление аденоидов и небных миндалин приводит к хронической активации клеточно-опосредованных и гуморальных иммунных реакций, заканчивающейся гипертрофией лимфоидной ткани миндалин лимфоэпителиального глоточного кольца. Эту гипертрофическую ткань считают причиной известных клинических симптомов: обструкция верхних дыхательных путей, храп, сонное апноэ, дисфункции слуховой трубы. Эффективность хирургического удаления гипертрофированной ткани связывают не только с элиминацией механических препятствий дыхательных путей, но также устранением основы для этиологической причины — «носительства биопленок» [43]. Полученные в нашей работе данные о высокой ча-

стоте и уровнях экспрессии гена hBD-3 в поверхностном эпителии небных миндалин и аденоидов согласуются с представлениями о том, что избыточная нагрузка микроорганизмами и бактериальное многообразие в миндалинах лимфоэпителиального глоточного кольца могут объяснять более выраженное присутствие индуцибельных β -дефензинов в этих тканях [8].

Гортань считают важным органом развития иммунных реакций дыхательных путей, учитывая воздействие на нее вдыхаемых, проглоченных и возвращаемых при рефлюксе микроорганизмов и раздражителей [19]. Состоящие из многослойного плоского эпителия и подлежащей собственной пластинки, голосовые складки расположены в гортани на стыке дыхательного и желудочно-кишечного трактов [19]. Наиболее доступны образцы ткани для лабораторных исследований при доброкачественных заболеваниях голосовых складок, включая полипы голосовых складок, узелки, кисты, отек Рейнке, хронический ларингит [18, 19, 22, 23], а также рак гортани [14]. В образцах папилломы всех больных рецидивирующим респираторным папилломатозом гортани были детектированы мРНК hBD-1, hBD-2 и hBD-3, а уровни экспрессии были выше, чем в нормальной ткани слизистой полости рта здоровых лиц. Показана корреляция уровней экспрессии мРНК hBD-2 и hBD-3 ($r = 0,837$, $p < 0,01$), свидетельствующая об их совместной индукции в вызванных папилломавирусами патологических поражениях [7]. Подобно ротоглотке, наиболее распространенным родом гортанного микробиома является *Streptococcus*, который доминировал и в нормальной гортани (36%), и при доброкачественных поражениях голосовых складок (56% — 69,3%), и даже в образцах плоскоклеточной карциномы гортани (21%) и прилегающих к опухолям образцах, соответствующих нормальной ткани (29%) [14, 18, 19, 22, 23]. Высказано предположение об ассоциации между микробными сообществами с преобладанием рода *Streptococcus* и патологией голосовых складок [19, 23]. Микробиота и болезнь могут взаимодействовать в качестве причины и следствия на разных стадиях болезни [14]. В нашей работе большинство образцов слизистой гортани также получено при доброкачественных поражениях голосовых складок, а частота и уровни экспрессии гена hBD-3 сходны с аденоидами и небными миндалинами.

В исследованных нами образцах поверхностного эпителия больных хроническими воспалительными заболеваниями слизистых оболочек ЛОР-органов детектированы низкие уровни экспрессии гена hBD-3. Полученные данные согласуются с представлениями о том, что низкая базальная экспрессия на поверхности слизистой

служит способом защиты от болезней, а не поддержания болезненного состояния, т. к. антимикробные пептиды цитотоксичны в высоких концентрациях [35].

В целом, антимикробные пептиды могут способствовать тканевой регенерации и эпителиальной регенерации во время инфекции и воспаления путем индукции пролиферации структурных клеток, но они также потенциально способствуют повреждению эпителия и фиброзу ремоделированию во время воспаления дыхательных путей, когда присутствуют в высоких концентрациях. Измененная экспрессия антимикробных пептидов может приводить к колонизации дыхательных путей, обеспечивая резервуары для рецидивирующих инфекций. Повышенная чувствительность к рецидивирующим инфекциям дыхательных путей впоследствии приводит к хроническому воспалению, отклоняющейся от нормы экспрессии антимикробных пептидов и прогрессированию заболевания [35].

Заключение

Частота детекции и уровни экспрессии гена β -дефенсина-3 человека в поверхностном эпителии слизистых оболочек ЛОР-органов согласуются с представлениями об индуцибельном характере экспрессии этого пептида.

Верхние дыхательные пути предлагают множество экологических ниш для микробной колонизации, а колонизирующие микроорганизмы считают важными факторами поддержания здоровой естественной микробной среды человека или этиологическими агентами патологических процессов. Локальные микробные сообщества ЛОР-органов формируются под влиянием различных характеристик конкретного местоположения в верхних дыхательных путях. Ландшафт верхних дыхательных путей различается эпителиальной выстилкой, предоставляя многочисленные различные микро-ниши для микробных сообществ. Средний и нижний носовые ходы и околоносовые (верхнечелюстные, решетчатые, клиновидные и лобные) пазухи выстланы псевдомногослойным (многорядным) цилиндрическим мерцательным эпителием. Носоглотка характеризуется множеством крипт и складок, а на ее стенке преобладают ороговевающий и неороговевающий многослойный плоский эпителий и псевдомногослойный (многорядный) реснитчатый (мерцательный) эпителий. Зевная поверхность небных миндалин покрыта многослойным плоским неороговевающим эпителием (до 6-10 рядов), располагающимся на тонкой базальной мембране. Слизистая оболочка гортани выстлана многорядным реснитчатым эпителием, только истинные голосовые связки покрыты неорого-

вевающим плоским многослойным эпителием. Исследованные нами хирургические образцы слизистой гортани получены преимущественно из области голосовых складок. Полученные нами данные свидетельствуют о двух функционально различных типах иммунного ответа слизистой оболочки ЛОР-органов. В анатомо-функциональных областях, выстланных мерцательным эпителием (средний и нижний носовые ходы, верхнечелюстные, решетчатые пазухи, среднее ухо) детектированы низкие частота и уровни экспрессии гена hBD-3, за исключением ткани полипов среднего носового хода и решетчатого лабиринта и слизистой барабанной полости при холестеатоме, что, возможно, связано с характером патологического процесса. В зонах, выстланных плоским эпителием или сочетанием плоского и реснитчатого эпителиев, экспрессия гена hBD-3 детектирована практически повсеместно. Возможно, строение слизистой оболочки различных ЛОР-органов, отличающееся от слизистой других отделов верхних дыхательных путей, создает сайт-специфические экологические ниши для микробных сообществ, индуцирующих или подавляющих экспрессию гена hBD-3. Представляется, что род *Streptococcus* выступает в ка-

честве более мощного индуктора экспрессии гена hBD-3, чем род *Staphylococcus*.

Сложные микробные сообщества присутствуют на всем протяжении верхних дыхательных путей. Бактериальная колонизация может частично поддерживать хроническое воспаление верхних дыхательных путей. hBD-3 оказывает сильное бактерицидное и бактериостатическое действие в отношении чрезвычайно широкого спектра патогенов, а иммунный ответ эпителиальных клеток ЛОР-органов включает секрецию hBD-3, который обладает антимикробным действием в отношении этих патогенов.

Экспрессия гена hBD-3 в контрольной ткани, по-видимому, связана с поддержанием резистентности к бактериальной инвазии и регулированием состава комменсальной микробиоты полости носа. В контексте хронического воспаления и связанных с инфекцией заболеваний ЛОР-органов, помимо прямой микробоцидной активности hBD-3 на первой линии защиты, возможно нарушение регуляции пептида и даже неблагоприятные патогенетические эффекты hBD-3: повышенная чувствительность к инфекциям, патологические изменения состава комменсалов, фиброзное ремоделирование.

Список литературы / References

1. Бабаев С.Ю., Новожилов А.А., Абубакиров Т.Э., Митрофанова Н.Н., Козаренко Е.А., Шахов А.В. Микробиота барабанной полости у пациентов с хроническим гнойным средним отитом // Российская оториноларингология, 2019. Т. 18, № 3. С. 22-26. [Babaev S.Yu., Novozhilov A.A., Abubakirov T.E., Mitrofanova N.N., Kozarenko E.A., Shakhov A.V. Microbiota of the tympanic cavity in the patients with chronic suppurative otitis media. *Rossiiskaya otorinolaringologiya = Russian Otorhinolaryngology*, 2019, Vol. 18, no. 3, pp. 22-26. (In Russ.)]
2. Кокряков В.Н., Алешина Г.М., Шамова О.В., Орлов Д.С., Андреева Ю.В. Современная концепция об антимикробных пептидах как молекулярных факторах иммунитета // Медицинский академический журнал, 2010. Т. 10, № 4. С. 149-160. [Kokryakov V.N., Aleshina G.M., Shamova O.V., Orlov D.S., Andreeva Yu.V. Modern concept of antimicrobial peptides as molecular factors of the immunity. *Meditsinskiy akademicheskii zhurnal = Medical Academic Journal*, 2010, Vol. 10, no. 4, pp. 149-160. (In Russ.)]
3. Тырнова Е.В., Алешина Г.М., Янов Ю.К., Кокряков В.Н. Изучение экспрессии гена бета-дефенсин-3 человека в слизистой оболочке верхних дыхательных путей // Российская оториноларингология, 2015. № 2 (75). С. 77-84. [Tyrnova E.V., Aleshina G.M., Yanov Yu.K., Kokryakov V.N. Investigation of human beta-defensin-3 gene expression in the upper airway mucosa. *Rossiiskaya otorinolaringologiya = Russian Otorhinolaryngology*, 2015, no. 2 (75), pp. 77-84. (In Russ.)]
4. Albanesi C., Fairchild H.R., Madonna S., Scarponi C., de Pità O., Leung D.Y.M., Howell M.D. IL-4 and IL-13 negatively regulate TNF-alpha- and IFN-gamma-induced beta-defensin expression through STAT-6, suppressor of cytokine signaling (SOCS)-1, and SOCS-3. *J. Immunol.*, 2007, Vol. 179, pp. 984-992.
5. Ball S.L., Siou G.P., Wilson J.A., Howard A., Hirst B.H., Hall J. Expression and immunolocalisation of antimicrobial peptides within human palatine tonsils. *J. Laryngol. Otol.*, 2007, Vol. 121, no. 10, pp. 973-978.
6. Chen X., Niyonsaba F., Ushio H., Hara M., Yokoi H., Matsumoto K., Saito H., Nagaoka I., Ikeda S., Okumura K., Ogawa H. Antimicrobial peptides human beta-defensin (hBD)-3 and hBD-4 activate mast cells and increase skin vascular permeability. *Eur. J. Immunol.*, 2007, Vol. 37, pp. 434-444.
7. Chong K.T., Xiang L., Wang X., Jun E.L., Xi L.F., Schweinfurth J.M. High level expression of human epithelial beta-defensins (hBD-1, 2 and 3) in papillomavirus induced lesions. *Viol. J.*, 2006, Vol. 3, 75. doi: 10.1186/1743-422X-3-75.
8. Claeys S., de Belder T., Holtappels G., Gevaert P., Verhasselt B., van Cauwenberge P., Bachert C. Human b-defensins and toll-like receptors in the upper airway. *Allergy*, 2003, Vol. 58, pp. 748-753. doi: 10.1034/j.1398-9995.2003.00180.x

9. Coleman A., Wood A., Bialasiewicz S., Ware R.S., Marsh R.L., Cervin A. The unsolved problem of otitis media in indigenous populations: a systematic review of upper respiratory and middle ear microbiology in indigenous children with otitis media. *Microbiome*, 2018, Vol. 6, no. 1, 199. doi: 10.1099/jmm.0.001368.
10. Doss M., White M.R., Tecle T., Hartshorn K.L. Human defensins and LL-37 in mucosal immunity. *J. Leuk. Biol.*, 2010, Vol. 87, pp. 79-92.
11. Feng Z., Dubyak G.R., Jia X., Lubkowski J.T., Weinberg A. Human β -defensin-3 structure motifs that are important in CXCR4 antagonism. *FEBS J.*, 2013, Vol. 280, no. 14, pp. 3365-3375.
12. Funderburg N.T., Jadlowsky J.K., Lederman M.M., Feng Z., Weinberg A., Sieg S.F. The toll-like receptor 1/2 agonists Pam(3) CSK(4) and human β -defensin-3 differentially induce interleukin-10 and nuclear factor- κ B signalling patterns in human monocytes. *Immunology*, 2011, Vol. 134, no. 2, pp. 151-160.
13. Ghosh S.K., Feng Z., Fujioka H., Lux R., McCormick T.S., Weinberg A. Conceptual perspectives: bacterial antimicrobial peptide induction as a novel strategy for symbiosis with the human host. *Front. Microbiol.*, 2018, Vol. 9, 302. doi:10.3389/fmicb.2018.00302.
14. Gong H-L., Shi Y., Zhou L., Wu C-P., Cao P-Y., Tao L., Xu C., Hou D-S., Wang Y-Z. The composition of microbiome in larynx and the throat biodiversity between laryngeal squamous cell carcinoma patients and control population. *PLoS One*, 2013, Vol. 8, no. 6, e66476. doi: 10.1371/journal.pone.0066476.
15. Haarmann H., Steiner T., Schreiber F., Heinrich A., Zweigner J., N'Guessan P.D., Slevogt H. The role and regulation of *Moraxella catarrhalis*-induced human beta-defensin 3 expression in human pulmonary epithelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2015, Vol. 467, no. 1, pp. 46-52.
16. Harder J., Bartels J., Christophers E., Schröder J.M. Isolation and characterization of human beta-defensin-3, a novel human inducible peptide antibiotic. *J. Biol. Chem.*, 2001, Vol. 276, no. 8, pp. 5707-5713.
17. Hazrati E., Galen B., Lu W., Wang W., Ouyang Y., Keller M.J., Lehrer R.I., Herold B.C. Human alpha- and beta-defensins block multiple steps in herpes simplex virus infection. *J. Immunol.*, 2006, Vol. 177, no. 12, pp. 8658-8666.
18. Hong P., Liu C.M., Nordstrom L., Lalwani A.K. The role of the human microbiome in otolaryngology-head and neck surgery: a contemporary review. *Laryngoscope*, 2014, Vol. 124, no. 6, pp. 1352-1357.
19. Jetté M.E., Dill-McFarland K.A., Hanshew A.S., Suen G., Thibeault S.L. The human laryngeal microbiome: effects of cigarette smoke and reflux. *Sci. Rep.*, 2016, Vol. 6, 35882. doi: 10.1038/srep35882.
20. Jones E.A., McGillivray G., Bakaletz L.O. Extracellular DNA within a nontypeable *Haemophilus influenzae*-induced biofilm binds human beta defensin-3 and reduces its antimicrobial activity. *J. Innate Immun.*, 2013, Vol. 5, no. 1, pp. 24-38.
21. Kamekura R., Imai R., Takano K., Yamashita K., Jitsukawa S., Nagaya T., Ito F., Hirao M., Tsubota H., Himi T. Expression and localization of human defensins in palatine tonsils. *Adv. Otorhinolaryngol.*, 2016, Vol. 77, pp. 112-118.
22. Kumpitsch C., Koskinen K., Schöpf V., Moissl-Eichinger C. The microbiome of the upper respiratory tract in health and disease. *BMC Biol.*, 2019, Vol. 17, no. 1, 87. doi: 10.1186/s12915-019-0703-z.
23. Lee J.T., Kim C.M., Ramakrishnan V. Microbiome and disease in the upper airway. *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.*, 2019, Vol. 19, no. 1, pp. 1-6.
24. McGillivray G., Mason K.M., Jursicek J.A., Peeples M.E., Bakaletz L.O. Respiratory syncytial virus-induced dysregulation of expression of a mucosal beta-defensin augments colonization of the upper airway by non-typeable *Haemophilus influenzae*. *Cell Microbiol.*, 2009, Vol. 11, no. 9, pp. 1399-1408.
25. Mehraj J., Witte W., Akmatov M.K., Layer F., Werner G., Krause G. Epidemiology of *Staphylococcus aureus* nasal carriage patterns in the community. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 2016, Vol. 398, pp. 55-87.
26. Mittal R., Kodiyan J., Gerring R., Mathee K., Li J.D., Grati M., Liu X.Z. Role of innate immunity in the pathogenesis of otitis media. *Int. J. Infect. Dis.*, 2014, Vol. 29, pp. 259-267.
27. Nurjadi D., Herrmann E., Hinderberger I., Zanger P. Impaired beta-defensin expression in human skin links DEFB1 promoter polymorphisms with persistent *Staphylococcus aureus* nasal carriage. *J. Infect. Dis.*, 2013, Vol. 207, no. 4, pp. 666-674.
28. Ostaff M.J., Stange E.F., Wehkamp J. Chapter 5 Antimicrobial Peptides in the Gut. Antimicrobial peptides: role in human health and disease, Birkhäuser advances in infectious diseases. Ed. Harder J., Schröder J.-M., Springer International Publishing Switzerland, 2016, pp. 67-88.
29. Röhl J., Yang D., Oppenheim J.J., Hehlhans T. Human beta-defensin 2 and 3 and their mouse orthologs induce chemotaxis through interaction with CCR2. *J. Immunol.*, 2010, Vol. 184, pp. 6688-6694.
30. Sass V., Schneider T., Wilmes M., Körner C., Tossi A., Novikova N., Shamova O., Sahl H.G. Human beta-defensin 3 inhibits cell wall biosynthesis in *Staphylococci*. *Infect. Immun.*, 2010, Vol. 78, no. 6, pp. 2793-800.
31. Scharf S., Zahlten J., Szymanski K., Hippenstiel S., Suttorp N., N'Guessan P.D. Streptococcus pneumoniae induces human β -defensin-2 and -3 in human lung epithelium. *Exp. Lung Res.*, 2012, Vol. 38, no. 2, pp. 100-110.
32. Schibli D.J., Hunter H.N., Aseyev V., Starner T.D., Wiencek J.M., McCray P.B. Jr., Tack B.F., Vogel H.J. The solution structures of the human beta-defensins lead to a better understanding of the potent bactericidal activity of HBD3 against *Staphylococcus aureus*. *J. Biol. Chem.*, 2002, Vol. 277, no. 10, pp. 8279-8289.
33. Schleimer R.P. Immunopathogenesis of chronic rhinosinusitis and nasal polyposis. *Annu. Rev. Pathol.*, 2017, Vol. 12, pp. 331-357.

34. Schneider J.J., Unholzer A., Schaller M., Schäfer-Korting M., Korting H.C. Human defensins. *J. Mol. Med. (Berl)*, 2005, Vol. 83, no. 8, pp. 587-595.
35. Seiler F., Bals R., Beisswenger C. Chapter 3 Function of antimicrobial peptides in lung innate immunity. Antimicrobial peptides: role in human health and disease, Birkhäuser advances in infectious diseases. Ed. Harder J., Schröder J.-M., Springer International Publishing Switzerland, 2016, pp. 33-52.
36. Seiler F., Hellberg J., Lepper P.M., Kamyschnikow A., Herr C., Bischoff M., Langer F., Schäfers H.-J., Lammert F., Menger M.D., Bals R., Beisswenger C. FOXO transcription factors regulate innate immune mechanisms in respiratory epithelial cells. *J. Immunol.* 2013, Vol. 190, pp. 1603-1613.
37. Semple F., Dorin J.R. Beta-defensins: multifunctional modulators of infection, inflammation and more? *J. Innate Immun.*, 2012, Vol. 4, no. 4, pp. 337-348.
38. Sørensen O.E. Chapter 1 Antimicrobial Peptides in Cutaneous Wound Healing. Antimicrobial peptides: role in human health and disease, Birkhäuser advances in infectious diseases. Ed. Harder J., Schröder J.-M., Springer International Publishing Switzerland, 2016, pp. 1-15.
39. Starner T.D., Swords W.E., Apicella M.A., McCray P.B. Jr. Susceptibility of nontypeable *Haemophilus influenzae* to human beta-defensins is influenced by lipooligosaccharide acylation. *Infect. Immun.*, 2002, Vol. 70, no. 9, pp. 5287-5289.
40. Weinberg A., Quiñones-Mateu M.E., Lederman M.M. Role of human beta-defensins in HIV infection. *Adv. Dent. Res.*, 2006, Vol. 19, no. 1, pp. 42-48.
41. Zanger P., Holzer J., Schleucher R., Scherbaum H., Schitteck B., Gabrysch S. Severity of *Staphylococcus aureus* infection of the skin is associated with inducibility of human beta-defensin 3 but not human beta-defensin 2. *Infect. Immun.*, 2010, Vol. 78, no. 7, pp. 3112-3117.
42. Zanger P., Nurjadi D., Vath B., Kremsner P.G. Persistent nasal carriage of *Staphylococcus aureus* is associated with deficient induction of human beta-defensin 3 after sterile wounding of healthy skin in vivo. *Infect. Immun.*, 2011, Vol. 79, no. 7, pp. 2658-2662.
43. Zautner A.E. Adenotonsillar disease. *Recent Pat. Inflamm. Allergy Drug Discov.*, 2012, Vol. 6, no. 2, pp. 121-129.

Авторы:

Тырнова Е.В. — к.м.н., старший научный сотрудник лабораторно-диагностического отдела ФГБУ «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт уха, горла, носа и речи» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Алешина Г.М. — д.б.н., доцент, заведующая лабораторией, отдел общей патологии и патологической физиологии ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

Янов Ю.К. — д.м.н., профессор, академик РАН, главный научный сотрудник ФГБУ «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт уха, горла, носа и речи» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Authors:

Tyrnova E.V., PhD, MD (Medicine), Senior Research Associate, Department of Laboratory Diagnostics, Research Institute of Ear, Nose, Throat and Speech, St. Petersburg, Russian Federation

Aleshina G.M., PhD, MD (Biology), Associate Professor, Head of the Laboratory, Department of General Pathology and Pathological Physiology, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

Yanov Yu.K., PhD, MD (Medicine), Professor, Full Member, Russian Academy of Sciences, Main Research Associate, Research Institute of Ear, Nose, Throat and Speech, St. Petersburg, Russian Federation

Поступила 09.07.2021

Отправлена на доработку 07.11.2021

Принята к печати 20.11.2021

Received 09.07.2021

Revision received 07.11.2021

Accepted 20.11.2021

ИНТЕРЛЕЙКИНЫ СЛЕЗНОЙ ЖИДКОСТИ И ДИАБЕТИЧЕСКАЯ РЕТИНОПАТИЯ

Лев И.В.¹, Агарков Н.М.^{2,3}

¹ Тамбовский филиал ФГАУ «НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» имени академика С.Н. Федорова»,
г. Тамбов, Россия

² ФГБОУ ВО «Юго-Западный государственный университет», г. Курск, Россия

³ ФГАОУ ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет», г. Белгород, Россия

Резюме. Неоспоримо ведущая роль диабетической ретинопатии, как основной причины снижения остроты зрения в трудоспособном и пожилом возрасте, определяет ее актуальность изучения, в том числе иммунологических аспектов патогенеза для улучшения диагностики и лечения данной офтальмологической патологии. В настоящее время недостаточно изучены изменения интерлейкинов слезной жидкости у пациентов пожилого возраста, страдающих диабетической ретинопатией. Цель исследования — изучение содержания провоспалительных и противовоспалительных интерлейкинов в слезной жидкости у пациентов пожилого возраста с диабетической ретинопатией. Указанные интерлейкины слезной жидкости анализировались в двух клинических группах — в основной, представленной 72 пациентами пожилого возраста с диабетической ретинопатией, и в контрольной — 64 пациента того же возраста с сахарным диабетом 2-го типа без диабетической ретинопатии. Определение диагноза диабетической ретинопатии осуществлялось на основании критериев Клинических рекомендаций «Сахарный диабет, ретинопатия диабетическая, макулярный отек диабетический» общероссийской ассоциации врачей-офтальмологов по результатам комплексного офтальмологического обследования. В слезной жидкости обеих групп пациентов исследовали содержание различных провоспалительных и противовоспалительных интерлейкинов твердофазным иммуноферментным анализом и с применением тест-систем R&D Diagnostic Inc. (США). Рассчитывали средние арифметические значения, их ошибки, величины относительного риска и доверительные интервалы, оценивали достоверность. Установлено статистически значимое повышение большинства провоспалительных интерлейкинов в слезной жидкости пациентов, имеющих диабетическую ретинопатию. Особенно увеличилась экспрессия IL-6 до $142,9 \pm 7,8$ пг/мл среди пациентов с диабетической ретинопатией против $6,8 \pm 0,7$ пг/мл в контрольной группе, IL-3 до $2,4 \pm 0,3$ пг/мл против $0,3 \pm 0,05$ пг/мл соответственно ($p < 0,001$). Повысилась также продукция и других провоспалительных интерлейкинов на локальном уровне, за исключением IL-7. Однако концентрация IL-4 и IL-10 достоверно снизилась у пациентов с диабетической ретинопатией и в большей степени IL-10 до $4,3 \pm 0,5$ пг/мл против $11,7 \pm 2,3$ пг/мл ($p < 0,001$). Величины относительного риска оказались наивысшими для IL-6 — 7,824 при достоверном доверительном интервале 7,538–8,261, IL-3 — 3,269 при достоверном доверительном интервале 3,084–3,721. Высокие значения относительного риска установлены, кроме того, для IL-8, IL-5 и IL-1 α_2 . Относительный риск развития диабетической ретинопатии повышают увеличение содержания в слезной жидкости IL-8 практически в 2 раза при статистически значимом доверительном интервале 1,728–2,432 ($p < 0,01$), IL-5 — в 1,748 раза при доверительном интервале 1,462–2,194 ($p < 0,01$), IL-1 α_2 — в 1,718 раза при достоверном доверительном интервале 1,524–2,137 ($p < 0,001$). Это указывает на ассоциацию вышеназванных интерлейкинов с развитием диабетической ретинопатии. Установленные закономерности расширяют современные представления об иммунопатогенезе диабетической ретинопатии и участии интерлейкинов слезной жидкости.

Ключевые слова: интерлейкины слезной жидкости, диабетическая ретинопатия, иммунопатология, относительный риск, пожилые пациенты

Адрес для переписки:

Агарков Николай Михайлович
ФГБОУ ВО «Юго-Западный государственный
университет»
305040, Россия, г. Курск, ул. 50 лет Октября, 94.
Тел.: 8 (910) 740-96-13.
E-mail: vitalaxen@mail.ru

Address for correspondence:

Agarkov Nikolai M.
Southwestern State University
300540, Russian Federation, Kursk, 50 let Oktyabrya str., 94.
Phone: 7 (910) 740-96-13
E-mail: vitalaxen@mail.ru

Образец цитирования:

И.В. Лев, Н.М. Агарков «Интерлейкины слезной жидкости и диабетическая ретинопатия» // Медицинская иммунология, 2022. Т. 24, № 4. С. 793–798. doi: 10.15789/1563-0625-IIL-2499
© Лев И.В., Агарков Н.М., 2022

For citation:

I.V. Lev, N.M. Agarkov "Interleukins in lacrimal fluid and diabetic retinopathy", Medical Immunology (Russia)/ Meditsinskaya Immunologiya, 2022, Vol. 24, no. 4, pp. 793–798. doi: 10.15789/1563-0625-IIL-2499
DOI: 10.15789/1563-0625-IIL-2499

INTERLEUKINS IN LACRIMAL FLUID AND DIABETIC RETINOPATHY

Lev I.V.^a, Agarkov N.M.^{b, c}

^a S. Fedorov National Medical Research Center "MNTK Eye Microsurgery", Tambov, Russian Federation

^b South-Western State University, Kursk, Russian Federation

^c Belgorod State National Research University, Belgorod, Russian Federation

Abstract. The leading role of diabetic retinopathy is considered the main causal factor of decreased visual acuity in the able-bodied and elderly ages determines its clinical relevance, including immunological aspects of pathogenesis to improve the diagnosis and treatment of this ophthalmic pathology. Currently, changes in lacrimal fluid interleukins in elderly patients suffering from diabetic retinopathy have not been sufficiently studied. The aim of our work was to study the content of pro-inflammatory and anti-inflammatory interleukins in lacrimal fluid in elderly patients with diabetic retinopathy.

The lacrimal fluid interleukins were analyzed in two clinical groups: the main group was represented by 72 elderly patients with diabetic retinopathy, and the control group included 64 patients of the same age with type 2 diabetes mellitus without diabetic retinopathy. The diagnosis of diabetic retinopathy was assessed from the criteria of Clinical Recommendations "*Diabetes mellitus, diabetic retinopathy, diabetic macular edema*" issued by the All-Russian Association of Ophthalmologists based on the results of a comprehensive ophthalmological examination. In the lacrimal fluid taken from all patients, the content of various pro- and anti-inflammatory interleukins was studied by solid-phase enzyme immunoassay using R&D Diagnostic Inc. (USA) test systems. Arithmetic average values, their errors, relative risk factors and confidence intervals were calculated, and their significance was evaluated. We have obtained following results: a statistically significant increase of most proinflammatory interleukins was detected in the lacrimal fluid of patients with diabetic retinopathy. In particular, expression of IL-6 was increased to 142.9 ± 7.8 pg/ml among the patients with diabetic retinopathy *versus* 6.8 ± 0.7 pg/ml in the comparison group, IL-3 was increased to 2.4 ± 0.3 pg/ml *versus* 0.3 ± 0.05 pg/ml, respectively ($p < 0.001$). The production of other pro-inflammatory interleukins at the local site has also increased, except of IL-7. However, the concentration of IL-4 and IL-10 was significantly decreased in the patients with diabetic retinopathy, with even higher increase of IL-10 (4.3 ± 0.5 pg/ml *versus* 11.7 ± 2.3 pg/ml, $p < 0.001$). The relative risk values were the highest for IL-6 (7.824), at the reliable confidence interval of 7.538-8.261; for IL-3 these values comprised 3.269 (CI 3.084-3.721). High relative risk values were also established for IL-8, IL-5 and IL- $1\alpha_2$. The relative risk of developing diabetic retinopathy by almost 2 times was associated with higher contents of IL-8 in the lacrimal fluid (statistically significant confidence interval of 1.728-2.432 ($p < 0.01$); for IL-5 it was 1.748 (confidence interval of 1.462-2.194 ($p < 0.01$); for IL- $1\alpha_2$ it comprised 1.718 (confidence interval of 1.524-2.137, $p < 0.001$). These findings suggest an association of the abovementioned interleukins and development of diabetic retinopathy. The established patterns expand modern views concerning immunopathogenesis of diabetic retinopathy, involving the interleukins of lacrimal fluid.

Keywords: diabetic retinopathy, lacrimal fluid, interleukins, proinflammatory, anti-inflammatory, relative risk

Введение

Неоспоримо ведущая роль диабетической ретинопатии (ДР) как причина слепоты у лиц трудоспособного и пожилого возраста наблюдается в настоящее время во многих развитых странах [2, 5, 7]. ДР — это наиболее распространенное микрососудистое осложнение сахарного диабета, встречающееся приблизительно у 29% взрослых с диабетом 2-го типа и 95% людей с диабетом 1-го типа [6].

В развитии ДР в последние годы существенное значение отводится иммунологическим нарушениям, в том числе нарушению содержания интерлейкинов в слезной жидкости у данного контингента пациентов. Недавний прогресс в иммунологических исследованиях значительно расширил изучение различных интерлейкинов

слезной жидкости. В настоящее время считается, что в патогенез ДР вовлечен как воспалительный, так и ассоциированный с ним ангиогенный процесс по своей природе, включающий внутриглазную регуляцию следующих цитокинов: IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-8, TNF α [3, 9]. Появились новые аргументы в пользу того, что воспалительный процесс, ассоциированный с повышением продукции интерлейкинов на локальном уровне, выступает важным фактором возникновения и развития ДР [10]. При этом гиперпродукция интерлейкинов в слезной жидкости часто сочетается с окислительным стрессом, что подтверждено в экспериментальных исследованиях на крысах с индуцированным сахарным диабетом [4]. Только в некоторых работах рассматривался дисбаланс интерлейкинов слезной жидкости у пожилых па-

циентов, страдающих ДР [8]. Имеющиеся клинические результаты об изменении интерлейкинов на локальном уровне среди пациентов пожилого возраста противоречивы и изучены по ограниченному количеству интерлейкинов, что в определенной степени затрудняет оценку их патогенетического участия в формировании ДР.

Цель исследования — изучение содержания провоспалительных и противовоспалительных интерлейкинов в слезной жидкости у пациентов пожилого возраста с ДР.

Материалы и методы

При проведении исследования на базе Тамбовского филиала МНТК «Микрохирургия глаза имени академика С.Н. Федорова» сформировано две клинические группы — 72 пациента с ДР (средний возраст $69,7 \pm 2,3$ лет), составившие основную группу, и 64 пациента с сахарным диабетом 2-го типа без ДР (средний возраст $70,5 \pm 2,1$ лет), служившие контрольной группой. Всем пациентам проведено комплексное офтальмологическое обследование с определением остроты зрения без коррекции, максимально скорректированной остроты зрения, параметров периметрии, изучением сетчатки, ее морфометрических параметров. Выполнялась также в обеих группах оптическая когерентная томография с функцией ангиографии для выявления патологических изменений при ДР. Диагностика ДР осуществлялась с использованием критериев, представленных клиническими рекомендациями «Сахарный диабет, ретинопатия диабетическая, макулярный

отек диабетический» общероссийской ассоциацией врачей-офтальмологов [1].

В утренние часы у включенных в исследование пациентов производился забор слезной жидкости для изучения содержания интерлейкинов на иммуноферментном анализаторе Multiscan (Thermo Scientific Inc., Финляндия) посредством твердофазного иммуноферментного анализа с применением тест-систем R&D Diagnostic Inc. (США).

Для всех рассматриваемых интерлейкинов слезной жидкости выполнялось определение относительного риска по общепринятой методике с расчетом доверительных интервалов и оценки их статистической значимости.

Обследование пациентов сформированных клинических групп проводилось при получении письменного информированного согласия на участие в настоящем исследовании и в соответствии с принципами Хельсинкской декларации.

Для оценки достоверности различий содержания интерлейкинов в слезной жидкости в сравниваемых группах пациентов использовался непараметрический Т-критерий Уайта. Статистически значимым считалось полученное различие $p < 0,05$, в противном случае различие рассматривалось как недостоверное.

Результаты

ДР у пациентов пожилого возраста сопровождается статистически значимым изменением содержания в слезной жидкости практически всех изученных интерлейкинов, за исключением IL-7 (табл. 1).

ТАБЛИЦА 1. КОНЦЕНТРАЦИЯ ИНТЕРЛЕЙКИНОВ В СЛЕЗНОЙ ЖИДКОСТИ ПАЦИЕНТОВ С ДИАБЕТИЧЕСКОЙ РЕТИНОПАТИЕЙ В СРАВНЕНИИ С ВОЗРАСТНЫМ КОНТРОЛЕМ ($M \pm m$)

TABLE 1. CONCENTRATION OF INTERLEUKINS IN THE LACRIMAL FLUID OF PATIENTS WITH DIABETIC RETINOPATHY IN COMPARISON WITH AGE CONTROL ($M \pm m$)

Интерлейкин, пг/мл Interleukin, pg/ml	Пациенты с диабетической ретинопатией Patients with diabetic retinopathy	Контрольная группа Control group	p
IL-1 α_2	18,2 $\pm$ 2,1	4,6 $\pm$ 1,3	< 0,001
IL-1 β	96,5 $\pm$ 4,4	54,7 $\pm$ 2,6	< 0,001
IL-2	6,3 $\pm$ 0,9	2,7 $\pm$ 0,4	< 0,001
IL-3	2,4 $\pm$ 0,3	0,30 $\pm$ 0,05	< 0,001
IL-4	5,1 $\pm$ 0,5	7,2 $\pm$ 0,4	< 0,01
IL-5	0,40 $\pm$ 0,03	0,10 $\pm$ 0,02	< 0,001
IL-6	142,9 $\pm$ 7,8	6,8 $\pm$ 0,7	< 0,001
IL-7	4,8 $\pm$ 0,6	3,1 $\pm$ 0,5	> 0,050
IL-8	33,4 $\pm$ 4,5	7,2 $\pm$ 1,6	< 0,001
IL-10	4,3 $\pm$ 0,5	11,7 $\pm$ 2,3	< 0,001
IL-17	12,8 $\pm$ 2,7	4,2 $\pm$ 0,6	< 0,001

ТАБЛИЦА 2. ОТНОСИТЕЛЬНЫЙ РИСК ДЛЯ ИНТЕРЛЕЙКИНОВ СЛЕЗНОЙ ЖИДКОСТИ В РАЗВИТИИ ДИАБЕТИЧЕСКОЙ РЕТИНОПАТИИ В ПОЖИЛОМ ВОЗРАСТЕ

TABLE 2. RELATIVE RISK FOR LACRIMAL FLUID INTERLEUKINS IN THE DEVELOPMENT OF DIABETIC RETINOPATHY IN OLD AGE

Интерлейкины слезной жидкости Lacrimal fluid interleukins	Величина относительного риска Relative risk value	Доверительный интервал Confidence interval	p
IL-1 α_2	1,718	1,524-2,137	< 0,001
IL-1 β	1,043	0,796-1,358	> 0,050
IL-2	1,328	1,105-1,749	< 0,001
IL-3	3,269	3,084-3,721	< 0,001
IL-4	1,136	0,903-1,489	> 0,050
IL-5	1,748	1,462-2,194	< 0,010
IL-6	7,824	7,538-8,261	< 0,001
IL-7	0,024	0,003-0,189	> 0,050
IL-8	1,965	1,728-2,432	< 0,010
IL-10	1,397	1,115-1,803	< 0,010
IL-17	1,568	1,324-1,927	< 0,010

Однако наиболее выраженные отклонения среди пациентов основной группы в сравнении с возрастным контролем свойственны IL-6 и IL-3, концентрация которых увеличилась в 21,1 раза и 8,0 раз соответственно ($p < 0,001$). При этом содержание IL-6 у пациентов с ДР находилось на очень высоком уровне по отношению ко всем рассматриваемым в исследовании локальным интерлейкинам.

Значительное и практическое одинаковое повышение интерлейкинов в слезной жидкости у пациентов пожилого возраста, страдающих ДР, присуще IL-8 и IL-1 α_2 с незначительным превосходством IL-8. Обращает также внимание статистически достоверное повышение на локальном уровне в группе пациентов с ДР IL-17 по сравнению с группой возрастного контроля. В слезной жидкости пациентов с ДР диагностировано значительное и репрезентативное увеличение IL-5 ($p < 0,001$). Среди провоспалительных интерлейкинов слезной жидкости при развитии ДР произошло репрезентативное увеличение IL-1 β , но оно было менее значительным, чем для ранее рассмотренных местных интерлейкинов. В категории провоспалительных интерлейкинов слезной жидкости у пациентов пожилого возраста с ДР не имело репрезентативных различий по сравнению с пациентами без ДР только содержание IL-7, хотя наблюдалась некоторая тенденция к их повышению ($p > 0,05$).

Среди противовоспалительных интерлейкинов слезной жидкости у пациентов пожилого возраста, имеющих ДР, отмечено статистически значимое снижение как IL-4, так и IL-10 (табл. 1). Вместе с тем более выраженное угнетение про-

дукции противовоспалительных интерлейкинов в сравнении с пациентами с отсутствием ДР у пациентов, страдающих ДР, присуще IL-10, уровень которых в слезной жидкости понизился в 2,7 раза ($p < 0,001$), а IL-4 – в 1,4 раза ($p < 0,01$).

Полученные результаты свидетельствуют о наибольшем повышении среди провоспалительных интерлейкинов на локальном уровне у пациентов пожилого возраста при развитии ДР IL-6, IL-3 и IL-8 и статистически достоверном снижении IL-10 и IL-4, что указывает на важную патогенетическую роль вышеназванных интерлейкинов слезной жидкости в формировании ДР в пожилом возрасте.

Рассчитанные величины относительного риска для исследованных интерлейкинов слезной жидкости свидетельствуют о том, что вероятность развития ДР в пожилом возрасте многократно увеличивает повышение провоспалительного IL-6, которому соответствует максимальное значение относительного риска (табл. 2) с достоверным доверительным интервалом.

Развитие ДР с высокой вероятностью ассоциируется и с увеличением на локальном уровне IL-3, для которого относительный риск равен 3,269 при ДИ 3,084–3,721 ($p < 0,001$). Способствуют развитию ДР в пожилом возрасте статистически значимо и некоторые другие провоспалительные интерлейкины. В частности, достоверно возрастает риск развития ДР при увеличении содержания в слезной жидкости IL-8, IL-5, IL-1 α_2 , IL-17. Повышение названных интерлейкинов слезной жидкости увеличивает риск формирования ДР в пожилом возрасте статистически значимо в 1,324–2,432 раза. Практически не влияет

на развитие ДР усиление продукции IL-1 β , IL-7 и снижение противовоспалительного IL-4. Однако угнетение синтеза противовоспалительного IL-10 статистически значимо в 1,397 раза повышает вероятность развития ДР в пожилом возрасте ($p < 0,01$).

Обсуждение

Уровни воспалительных интерлейкинов, включая IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-8, IL-17 и TNF α в слезной жидкости, изученные у 40 пациентов в нерандомизированном одноцентровом наблюдательном клиническом исследовании в Китае, могут быть связаны не только с развитием ДР, но и ее тяжестью и прогрессированием [8]. Так, содержание IL-1 β в слезной жидкости пациентов с пятилетним анамнезом ДР статистически значимо превышало средний уровень пациентов с сахарным диабетом 2-го типа без ДР, составляя соответственно $22,109 \pm 0,34$ и $11,415 \pm 0,25$ пг/мл ($p < 0,001$). Значительные различия выявлены также в содержании IL-6 в слезной жидкости — $86,324 \pm 1,54$ и $18,221 \pm 1,45$ пг/мл. Названное увеличение IL-1 β и IL-6 на локальном уровне среди пациентов, страдающих ДР в течение 5 лет, согласуется с полученными нами результатами с той лишь разницей, что у обследованных нами пациентов повышение обсуждаемых интерлейкинов более значимо [11].

Сообщается, что IL-6 слезной жидкости не только вызывает слабое хроническое воспаление, но и обуславливает конформационные изменения в плотных соединениях эндотелиальных клеток сосудов и играет важную роль в повышении проницаемости этих сосудов и разрушением гематоэнцефалического барьера в диабетических глазах [4]. Наряду с этим установлено достоверное увеличение уровня IL-6 в слезной жидкости пациентов с непролиферативной ДР до $24,12$ пг/мл, с пролиферативной ДР до $55,55$ пг/мл против $8,11$ пг/мл у пациентов с сахарным диабетом 2-го типа без ДР.

IL-6 является многофункциональным цитокином с реактивной и иммуномодулирующей ролью в острой фазе и в *in vitro* показана перестройка активных и морфологических изменений эндотелиальных клеток сетчатки под его влиянием [9]. IL-6 обладает также способностью индуцировать экспрессию сосудистого эндотелиального фактора роста, вовлеченного в патогенез ДР, и дополнительно увеличивает проницаемость сосудов. Кроме того, отмечается, что уровень IL-6 в слезной жидкости параллелен тяжести ДР. Нами же установлено, что IL-6 имеет максимальную величину относительного риска в развитии ДР у пожилых пациентов.

У пациентов, страдающих ДР на протяжении 5 лет, среди изученных провоспалительных цитокинов — IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-8, IL-17 и

TNF α — наибольшее увеличение в слезной жидкости присуще IL-8, уровень которого в указанном биоматериале составил $342,782 \pm 18,55$ пг/мл по сравнению с $19,009 \pm 1,130$ пг/мл у пациентов, болеющих в течение лет сахарным диабетом 2-го типа [8]. В нашем исследовании увеличение IL-8 в слезной жидкости у пациентов с ДР составило почти в 5 раз, что значительно меньше, чем в ранее указанной работе [8]. Однако, согласно нашим результатам, IL-8 повышает вероятность развития ДР в пожилом возрасте в 1,965 раза при достоверном доверительном интервале ($p < 0,01$).

В публикации [8] сообщается о повышении в слезной жидкости содержания IL-17A до $32,75 \pm 0,68$ пг/мл, а у пациентов с сахарным диабетом 2-го типа до $13,875 \pm 0,42$ пг/мл. В нашей работе уровень IL-17A в слезной жидкости статистически достоверно повысился у пациентов, имеющих ДР.

В отличие от ранее выполненных исследований нами показано повышение экспрессии и других провоспалительных интерлейкинов — IL-1 α_2 , IL-2, IL-3, IL-5, IL-7, уровень которых, за исключением последнего, статистически значимо превышал средние значения группы возрастного контроля. Кроме того, IL-1 α_2 , IL-2, IL-3, IL-5 достоверно повышали риск развития ДР.

Впервые нами продемонстрировано участие противовоспалительных интерлейкинов слезной жидкости — IL-4 и IL-10, а именно, что снижение IL-10 достоверно способствует повышению риска развития ДР. Снижение IL-4 в слезной жидкости пациентов с ДР оказалось достоверным, но величина относительного риска, равная 1,136 не имела статистически значимого доверительного интервала.

Заключение

Развитие ДР сопровождается выраженной провоспалительной реакцией со стороны многих интерлейкинов слезной жидкости, детерминированность которой обусловлена, прежде всего, многократным повышением содержания IL-6, IL-3 и IL-8. Одновременно среди противовоспалительных интерлейкинов на местном уровне наблюдалось достоверное снижение IL-10 и IL-4. Полученные величины относительного риска для интерлейкинов слезной жидкости показывают наибольшую ассоциацию ДР с IL-6, IL-3, IL-8, IL-5 и IL-1 α_2 . С формированием ДР не ассоциируются такие интерлейкины слезной жидкости, как IL-1 β , IL-4 и IL-7. Установленные закономерности расширяют современные представления об иммунопатогенезе ДР и участии интерлейкинов слезной жидкости.

Список литературы / References

1. Астахов Ю.С., Нероев В.В., Шестакова М.В., Зайцева О.В., Охочимская Т.Д., Рябина М.В., Шадричев Ф.Е., Григорьева Н.Н., Липатов Д.В., Кононенко Д.В. Клинические рекомендации «Сахарный диабет: ретинопатия диабетическая, макулярный отек диабетический». М.: Общероссийская общественная организация «Ассоциация врачей-офтальмологов», 2020. 70 с. [Astakhov Yu.S., Neroev V.V., Shestakova M.V., Zaitseva O.V., Okhotsimskaya T.D., Ryabina M.V., Shadrichiev F.E., Grigorieva N.N., Lipatov D.V., Kononenko D.V. Clinical recommendations "Diabetes mellitus: diabetic retinopathy, diabetic macular edema"]. Moscow: All-Russian Public Organization "Association of Ophthalmologists", 2020. 70 p.
2. Фабрикантов О.Л., Агарков Н.М., Лев И.В., Гурко Т.С., Яблоков М.М., Москалева Е.О., Москалев А.А. Аллостатическая нагрузка как способ объективизации возрастной жизнеспособности пациентов с офтальмопатологией // Научные результаты биомедицинских исследований, 2021. Т. 7, № 3. С. 451-460. [Fabrikantov O.L., Agarkov N.M., Lev I.V., Gurko T.S., Yablokov M.M., Moskaeva E.O., Moskaev A.A. Allostatic load as a method of objectification of age-related viability of patients with ophthalmopathology. *Nauchnye rezultaty biomeditsinskikh issledovaniy = Research Results in Biomedicine*, 2021, Vol. 7, no. 3, pp. 451-460. (In Russ.)]
3. Arjamaa O., Pollonen M., Kinnunen K., Ryhanen T., Kaarniranta K. Increased IL-6 levels are not related to NF- κ B or HIF-1 α transcription factors activity in the vitreous of proliferative diabetic retinopathy. *J. Diabetes Complications*, 2011, Vol. 25, no. 6, pp. 393-397.
4. Bozkurt E., Cakir B., Celik E., Dogan E., Ucak T., Alagoz G. Correlation of the aqueous humor total antioxidant capacity, total oxidant status, and levels of IL-6 and VEGF with diabetic retinopathy status. *Arq. Bras. Oftalmol.*, 2019, Vol. 82, no. 2, pp. 136-140.
5. Burton M.J., Ramke J., Marques A.P., Bourne R.R., Congdon N., Jones I., Tong B.A., Arunga S., Bachani D., Bascaran C., Bastawrous A., Blanchett K., Braithwaite T., Buchan J.C., Cairns J., Cama A., Chagunda M., Chuluunhuu C., Cooper A., Crofts-Lawrence J., Dean W.H., Denniston A.K., Ehrlich J.R., Emerson P.M., Evans J.R., Frick K.D., Friedman D.S., Furtado J.M., Gichangi M.M., Gichuli S., Gilbert S.S., Guring R., Habtamu E., Holland P., Konas J.B., Keane P.A., Keay L., Khanna R.C., Khaw P.T., Kuper H., Kyari F., Lansingh V.C., Mactaggart I., Mafwiri M.M., Mathenge W., McCormick M., Morjaria P., Mowatt L., Muirhead D., Murths G.V., Mwangi N., Patel D.B., Peto T., Qureshi B.M., Salomao S.R., Sarah V., Shilio B.R., Solomon A.W., Swenor B.K., Taylor H.R., Wang N., Webson A., West S.K., Wong T.Y., Wormald R., Yasmin S., Yusufu M., Silva J.C., Resnikoff S., Ravilla T., Gilbert C.E., Foster A., Faal H.B. The Lancet Global Health Commission on Global Eye Health: vision beyond 2020. *Lancet Glob. Health*, 2021, Vol. 9, no. 4, pp. 489-551.
6. Cheng D., Zhao X., Yang S., Wang G., Ning G. Association between diabetic retinopathy and cognitive impairment: a systematic review and meta-analysis. *Front. Aging Neurosci.*, 2021, Vol. 13, 692911. doi: 10.3389/fnagi.2021.692911.
7. Deuchler S., Schubert R., Singh P., Chedid A., Brui N., Kenikstul N., Kohnen T., Ackermann H., Koch F. Vitreous expression of cytokines and growth factors in patients with diabetic retinopathy-An investigation of their expression based on clinical diabetic retinopathy grade. *PLoS One*, 2021, Vol. 16, no. 5, e0248439. doi: 10.1371/journal.pone.0248439.
8. Feng S., Yu H., Yu Y., Geng Y., Li D., Yang C., Lv Q., Lu L., Liu T., Li G., Yuan L. Levels of inflammatory cytokines IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-17A, and TNF- α in aqueous humour of patients with diabetic retinopathy. *J. Diabetes Res.*, 2018, Vol. 2018, 8546423. doi: 10.1155/2018/8546423.
9. Justin R.A., Crowley S.D. The role of macrophages in hypertension and its complications. *Pflugers Arch.*, 2017, Vol. 469, no. 3-4, pp. 419-430.
10. Perez V.L., Caspi R.R. Immune mechanisms in inflammatory and degenerative eye disease. *Trends Immunol.*, 2015, Vol. 36, no. 6, pp. 354-363.
11. Wu G., Liu B., Wu Q., Tang C., Du Z., Fang Y., Hu Y., Yu H. Correlations between different angiogenic and inflammatory factors in vitreous fluid of eyes with proliferative diabetic retinopathy. *Front. Med. (Lausanne)*, 2021, Vol. 8, 727407. doi: 10.3389/fmed.2021.727407.

Авторы:

Лев И.В. — к.м.н., заведующая Офтальмологическим отделением, врач-офтальмолог Тамбовского филиала ФГАУ «НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» имени академика С.Н. Федорова», г. Тамбов, Россия

Агарков Н.М. — д.м.н., профессор кафедры биомедицинской инженерии ФГБОУ ВО «Юго-Западный государственный университет», г. Курск; старший научный сотрудник лаборатории «Проблемы старения» ФГАОУ ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет», г. Белгород, Россия

Authors:

Lev I.V., PhD (Medicine), Head, First Ophthalmological Department, Ophthalmologist, S. Fedorov National Medical Research Center "MNTK Eye Microsurgery", Tambov, Russian Federation

Agarkov N.M., PhD, MD (Medicine), Professor, Department of Biomedical Engineering, South-Western State University, Kursk; Senior Research Associate, Laboratory "Problems of Aging", Belgorod State National Research University, Belgorod, Russian Federation

Поступила 09.04.2022
Принята к печати 22.05.2022

Received 09.04.2022
Accepted 22.05.2022

РОЛЬ АЛЛЕРГИИ В РАЗВИТИИ ОЧАГОВОЙ АЛОПЕЦИИ

Барило А.А., Смирнова С.В.

Научно-исследовательский институт медицинских проблем Севера — обособленное подразделение ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук», г. Красноярск, Россия

Резюме. Очаговая алопеция представляет собой аутоиммунное заболевание, характеризующееся нерубцовым выпадением волос с сохранением волосяного фолликула. Выпадение волос при очаговой алопеции может быть как очаговым с появлением четко ограниченных очагов алопеции, так и диффузным или полным выпадением волос на любых участках кожного покрова, где присутствуют волосяные фолликулы. Данные о роли пищевой аллергии в развитии очаговой алопеции и характере спектра сенсибилизации крайне немногочисленны. Цель работы — изучить особенности спектра сенсибилизации к пищевым и пылевым (перекрестнореагирующим) аллергенам у больных очаговой алопецией.

В исследовании приняли участие больные очаговой алопецией ($n = 17$), которые с учетом возраста были разделены на группы: 1-я группа — дети ($n = 9$) и 2-я группа — взрослые ($n = 8$). Всем больным проводилось специфическое аллергологическое обследование: сбор аллергологического анамнеза, кожное prick-тестирование с пищевыми и пылевыми аллергенами (Allergopharma, Германия).

Анализ спектра сенсибилизации к пищевым аллергенам больных очаговой алопецией выявил особенности в зависимости от возраста. Так, в группе больных детей отмечена наибольшая частота встречаемости сенсибилизации к цельному куриному яйцу, пищевым злакам, дрожжам, сое и белкам коровьего молока. В группе взрослых с очаговой алопецией наиболее значимыми пищевыми аллергенами являлись: белок куриного яйца, ржаная мука, овес. Среди пылевых аллергенов в первой группе больных наиболее распространенными были аллергены смеси пыльцы сорных и злаковых трав, во второй группе — смеси пыльцы луговых трав. Всем больным с учетом аллергологического тестирования назначалась индивидуальная элиминационная диета с исключением причинно-значимых аллергенов с учетом перекрестнореагирующих аллергенов. Эффект элиминации оценивался через 2 месяца от начала элиминационной диеты. 70% больных отметили клиническое улучшение: в очагах алопеции отмечался рост vellus — пушковых депигментированных волос, а также терминальных пигментированных волос. Полный регресс очагов алопеции в среднем происходил в течение 3-6 месяцев от начала терапии.

Установленная нами сенсибилизация к пищевым и пылевым (перекрестнореагирующим) аллергенам больных очаговой алопецией и положительный эффект элиминационной диеты доказывает роль пищевой аллергии в развитии патологии. Следовательно, изучение причинно-следственной взаимосвязи пищевой аллергии и очаговой алопеции представляет особую актуальность и создает предпосылки для открытия новых диагностических и терапевтических возможностей.

Ключевые слова: очаговая алопеция, атопия, иммунопатогенез, аллерген, поллиноз, атопический дерматит

Адрес для переписки:

Барило Анна Александровна
Научно-исследовательский институт медицинских
проблем Севера
660022, Россия, г. Красноярск,
ул. Партизана Железняка, 3г.
Тел.: 8 (913) 158-40-20.
E-mail: anntomsk@yandex.ru

Address for correspondence:

Barilo Anna A.
Research Institute of Medical Problems of the North
660022, Russian Federation, Krasnoyarsk, Partizan
Zheleznyak str., 3g.
Phone: 7 (913) 158-40-20.
E-mail: anntomsk@yandex.ru

Образец цитирования:

А.А. Барило, С.В. Смирнова «Роль аллергии в развитии
очаговой алопеции» // Медицинская иммунология, 2022.
Т. 24, № 4. С. 799-806.
doi: 10.15789/1563-0625-ROA-2491
© Барило А.А., Смирнова С.В., 2022

For citation:

A.A. Barilo, S.V. Smirnova "Role of allergy in
the development of alopecia areata", Medical Immunology
(Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2022, Vol. 24,
no. 4, pp. 799-806.
doi: 10.15789/1563-0625-ROA-2491
DOI: 10.15789/1563-0625-ROA-2491

ROLE OF ALLERGY IN THE DEVELOPMENT OF ALOPECIA AREATA

Barilo A.A., Smirnova S.V.

Research Institute of Medical Problems of the North, Federal Research Center, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Krasnoyarsk, Russian Federation

Abstract. Alopecia areata is an autoimmune disease characterized by non-scarring hair loss with preservation of the hair follicle. Hair loss in alopecia areata can be either focal with the appearance of clearly defined foci of alopecia, or diffuse or complete hair loss in any area of the skin where hair follicles are present. Data on the role of food allergy in the development of alopecia areata and the nature of the sensitization spectrum are extremely scarce. Objective: to study the features of the spectrum of sensitization to food and pollen (cross-reacting) allergens in patients with alopecia areata.

The study involved patients with alopecia areata ($n = 17$), who were divided into groups according to age: group 1 – children ($n = 9$) and group 2 – adults ($n = 8$). All patients underwent a specific allergological examination: collection of an allergic history, skin prick testing with food and pollen allergens (Allergopharma, Germany).

Analysis of the spectrum of sensitization to food allergens in patients with alopecia areata revealed features depending on their age. Thus, in the group of sick children, the highest frequency of sensitization to whole chicken eggs, food cereals, yeast, soybeans and cow's milk proteins was noted. In the group of sick adults, the most significant food allergens were: egg protein, rye flour, oats. Among the pollen allergens in the first group of patients, the most common allergens were a mixture of weed and grass pollen, in the second group, a mixture of meadow grass pollen. All patients, taking into account allergological testing, were administered an individual elimination diet with the exclusion of causally significant allergens, taking into account cross-reacting allergens. The elimination effect was assessed 2 months after the start of the elimination diet. 70% of patients showed a clinical improvement, i.e., the growth of vellus was noted (vellus depigmented hair) in the foci of alopecia, as well as terminal pigmented hair. Complete regression of alopecia foci occurred on average within 3-6 months from the start of therapy.

The sensitization to food and pollen (cross-reacting) allergens in patients with alopecia areata and the positive effect of the elimination diet revealed in our study well supports the role of food allergy in the development of this disorder. Therefore, the study of the causal relationship between food allergy and alopecia areata is of particular relevance and creates prerequisites for the discovery of new diagnostic and therapeutic options.

Keywords: alopecia areata, atopy, immunopathogenesis, allergen, hay fever, atopic dermatitis

Введение

Очаговая алопеция (ОА) представляет собой аутоиммунное заболевание, характеризующееся нерубцовым выпадением волос с сохранением волосяного фолликула [11, 15]. Выпадение волос при очаговой алопеции может быть как очаговым с появлением четко ограниченных очагов алопеции, так и диффузным или полным выпадением волос на любых участках кожного покрова, где присутствуют волосяные фолликулы [17]. При ОА наиболее типичным является появление очагов на коже волосистой части головы [15]. В очагах поражения при ОА определяется перифолликулярная и фолликулярная лимфоцитарная инфильтрация волос, находящихся в фазе анагена (фаза роста волос), что подтверждает приоритетную роль иммунологических нарушений в развитии заболевания [11].

В результате наличия сложного иммунопатогенеза заболевания многие исследователи относят ОА к аутоиммунной патологии с развитием аутовоспалительного иммунного ответа, мише-

ню которого являются клетки фолосянных фолликулов [11, 16]. В литературе описаны примеры сочетания ОА с другими аутоиммунными патологиями, такими как витилиго, ревматоидный артрит, целиакия, диабет 1-го типа, псориаз [15, 16]. Очаговая алопеция является многофакторным заболеванием [16, 17]. Провоцирующим моментом в развитии патологии, по данным ряда авторов, могут являться: физический/эмоциональный стресс, инфекции, изменение гормонального фона, дефицит витаминов и микроэлементов [11, 17, 18]. Несмотря на многообразие исследований, посвященных изучению этиопатогенеза заболевания, точные причины и механизмы развития ОА неясны, а современные методы лечения имеют высокую частоту рецидивов [17].

В последние годы в литературе активно обсуждается вопрос о роли аллергии, проявляющейся преимущественно поражением кожи и слизистых: атопический дерматит, псориаз, эозинофильный эзофагит, эозинофильный гастроэнтероколит, проктит/проктоколит [1, 2, 5, 7, 8, 12]. В развитии данных процессов ведущая

роль отводится именно пищевой аллергии, наличие которой предполагает появление различных клинических реакций гиперчувствительности при употреблении определенных пищевых продуктов [1, 8]. Иммуноопосредованное воспаление слизистой оболочки желудочно-кишечного тракта приводит к повреждению эпителиального барьера и развитию эндотоксинемии [2, 5]. Наличие эндогенной интоксикации в свою очередь является важным фактором в развитии аутоиммунных воспалительных процессов в организме [13, 15]. Данные о роли пищевой аллергии в развитии очаговой алопеции и характере спектра сенсibilизации крайне немногочисленны. Следовательно, изучение роли пищевой аллергии в развитии очаговой алопеции является перспективным и актуальным.

Цель работы — изучить особенности спектра сенсibilизации к пищевым и пылевым (перекрестнореагирующим) аллергенам у больных очаговой алопецией.

Материалы и методы

В исследовании приняли участие больные очаговой алопецией ($n = 17$), которые с учетом возраста были разделены на группы: 1-я группа — дети ($n = 9$) и 2-я группа — взрослые ($n = 8$). Средний возраст обследуемых в 1-й группе составил $9,0 \pm 0,7$ лет, во 2-й группе — $37,5 \pm 3,5$ лет. Продолжительность заболевания в 1-й группе больных ОА составила $6,0 \pm 3,1$ месяцев, во 2-й группе — $1,5 \pm 3,4$ года. Средний возраст дебюта заболевания в 1-й группе — $7,0 \pm 0,7$ лет, во 2-й группе — $36,5 \pm 5,7$ лет. В 1-й группе больных преобладали девочки — 77,8% ($n = 7$), во 2-й группе мужчины и женщины встречались одинаково часто — 50%. Контрольные группы составили практически здоровые, сопоставимые по полу и возрасту с больными: 3-я группа — дети ($n = 19$), 4-я группа — взрослые ($n = 20$).

Клинические проявления очаговой алопеции в исследуемых группах были разнообразны. Так, локальная (ограниченная) форма гнездовой алопеции, при которой определяются один или несколько четко очерченных округлых очагов алопеции, была отмечена у 88,9% ($n = 8$) больных 1-й группы и 50,0% ($n = 4$) больных 2-й группы. Диффузная форма гнездовой алопеции, характеризующаяся частичным или полным диффузным поредением волос в области головы, отмечена только во 2-й группе больных — 50,0% ($n = 4$) случаев. Универсальная форма ОА, при которой волосы отсутствуют на коже волосистой части головы, в области роста бровей, ресниц, на коже туловища выявлена лишь у 1 ребенка (11,1%) 1-й группы.

Типичные очаги поражения при ОА представляли собой участки нерубцового облысения округлой или овальной формы с неизменным цветом кожи. При трихоскопии в очагах алопеции определялись следующие признаки: «желтые

точки» (фолликулы, заполненные гиперкератотическими массами), «черные точки» (кадавезированные волосы, представляющие собой комедоноподобные фолликулярные закупоривания), волосы в виде «восклицательных знаков» (дистрофически измененные волосы, суженные в проксимальной части).

Всем больным проводилось специфическое аллергологическое обследование: сбор аллергологического анамнеза, кожное prick-тестирование с оценкой величины гиперемии (от + до ++++). Были использованы следующие аллергены (Allergopharma, Германия): пищевые — коровье молоко (белок коровьего молока), мясо говядины, цельное куриное яйцо, белок куриного яйца, мясо курицы, пищевые злаки (пшеничная и ржаная мука, ячменная и овсяная крупы), рис, гречка, соя, дрожжи; пылевые — смеси аллергенов пыльцы деревьев, злаковых трав, сорных трав.

Для статистического анализа применяли пакет прикладных программ Statistica 8.0. Статистическую обработку результатов проводили с расчетом обобщающих коэффициентов: средняя величина (M) и ошибка средней (m). При анализе качественных признаков проводилась: оценка относительной частоты признака (распространенность) P . Различия считались статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты

Указания в анамнезе на проявления атопического дерматита, аллергического ринита, крапивницы имели 77,7% ($n = 7$) больных 1-й группы и 75,0% ($n = 6$) больных 2-й группы. Наличие в анамнезе указаний на сезонные проявления аллергии (аллергический риноконъюнктивит) отмечены у 44,4% ($n = 4$) больных 1-й группы, у 25,0% ($n = 2$) больных 2-й группы. Отягощенная аллергологическая наследственность (наличие аллергических заболеваний у ближайших родственников) установлена у 33,3% ($n = 3$) больных 1-й группы и 12,5% ($n = 1$) больных 2-й группы. В обеих группах больных отсутствовали указания в анамнезе на наследственный характер очаговой алопеции.

Анализ спектра сенсibilизации к пищевым аллергенам больных ОА выявил некоторые особенности в зависимости от возраста. Так, в 1-й группе больных отмечена наибольшая частота встречаемости сенсibilизации к цельному куриному яйцу и дрожжам (табл. 1). Более половины больных имели сенсibilизацию к белкам коровьего молока, ржаной муке, сое. Среди пищевых аллергенов наименьшая частота встречаемости сенсibilизации отмечена к рису. Сенсibilизация к пищевым аллергенам у детей в 70,0% случаев была слабopоложительной, в 20,9% — положительной, в 4,3% случаев — резко положительной и в 4,8% случаев — гиперэргической. Во 2-й группе

ТАБЛИЦА 1. СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА СПЕКТРА СЕНСИБИЛИЗАЦИИ К ПИЩЕВЫМ АЛЛЕРГЕНАМ БОЛЬНЫХ ОЧАГОВОЙ АЛОПЕЦИЕЙ, % (n)

TABLE 1. COMPARATIVE CHARACTERISTICS OF THE SPECTRUM OF SENSITIZATION TO FOOD ALLERGENS IN PATIENTS WITH ALOPECIA AREATA, % (n)

Наименование аллергенов Allergens	1-я группа 1 st group (n = 9)	2-я группа 2 nd group (n = 8)	p
Коровье молоко Cow's milk	55,5% (n = 5)	37,5% (n = 3)	$p_{1,3} = 0,0003$ $p_{2,4} = 0,004$
Мясо говядины Beef meat	44,4% (n = 4)	37,5% (n = 3)	$p_{1,3} = 0,001$ $p_{2,4} = 0,004$
Желток куриного яйца Egg yolk	33,3% (n = 3)	62,5% (n = 5)	$p_{1,3} = 0,007$ $p_{2,4} = 0,00009$
Белок куриного яйца Chicken egg protein	55,5% (n = 5)	75,0% (n = 6)	$p_{1,3} = 0,0003$ $p_{2,4} = 0,00001$
Куриное яйцо (цельное) Whole chicken egg	66,6% (n = 6)	50,0% (n = 4)	$p_{1,3} = 0,00006$ $p_{2,4} = 0,0006$
Мясо курицы Chicken's meat	44,4% (n = 4)	50,0% (n = 4)	$p_{1,3} = 0,001$ $p_{2,4} = 0,0006$
Белок пшеничной муки Wheat flour protein	33,3%(n = 3)	50,0% (n = 4)	$p_{1,3} = 0,007$ $p_{2,4} = 0,0006$
Белок ржаной муки Rye flour protein	55,5% (n = 5)	75,0% (n = 6)	$p_{1,3} = 0,0003$ $p_{2,4} = 0,00001$
Ячневая крупа Barley grits	44,4% (n = 4)	12,5% (n = 1)	$p_{1,3} = 0,001$
Овес Oat groats	44,4% (n = 4)	75,0% (n = 6)	$p_{1,3} = 0,001$ $p_{2,4} = 0,00001$
Рис Rice	22,2% (n = 2)	0%	$p_{1,3} = 0,03$
Гречка Buckwheat	44,4% (n = 4)	12,5% (n = 1)	$p_{1,3} = 0,001$
Соя Soy	55,5% (n = 5)	62,5% (n = 5)	$p_{1,3} = 0,0003$ $p_{2,4} = 0,00009$
Дрожжи Nutritional yeast	66,6% (n = 6)	62,5% (n = 5)	$p_{1,3} = 0,00006$ $p_{2,4} = 0,00009$

Примечание. Значения p указаны только при $p < 0,05$.

Note. p values are indicated only at $p < 0.05$.

больных наиболее значимыми пищевыми аллергенами являлись: белок куриного яйца, ржаная мука, овес. Несколько меньшая частота встречаемости сенсibilизации выявлена к желтку куриного яйца, сое и дрожжам. Среди пищевых аллергенов во 2-й группе больных наименьшая частота встречаемости сенсibilизации отмечена к гречке. Сенсibilизация к рису во 2-й группе больных отсутствовала. Сенсibilизация к пищевым аллергенам у взрослых в 51,9% случаев была слабopоложительной, в 37,1% — положительной, в 3,8% случаев — резко положительной. Гиперэргической реакции к пищевым аллергенам во второй группе больных очаговой алопецией не выявлено.

Таким образом, наиболее значимыми пищевыми аллергенами в обеих возрастных группах являлись аллергены куриного яйца, пищевых

злаков, дрожжей, сои. У детей с очаговой алопецией дополнительно отмечена высокая частота встречаемости сенсibilизации к белкам коровьего молока.

Наличие перекрестной реактивности пыльцевых аллергенов и аллергенов пищевых продуктов растительного происхождения обуславливает необходимость изучения сенсibilизации к данным аллергенам больных очаговой алопецией для оценки расширения спектра сенсibilизации при пищевой аллергии. В настоящем исследовании определены особенности спектра сенсibilизации к пыльцевым аллергенам больных очаговой алопецией в зависимости от возраста (табл. 2). Так, в 1-й группе больных наиболее распространенными пыльцевыми аллергенами были смеси сорных и злаковых трав, сенсibilизация к которым была отмечена в 77,7% случаев.

ТАБЛИЦА 2. СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА СПЕКТРА СЕНСИБИЛИЗАЦИИ К ПЫЛЬЦЕВЫМ АЛЛЕРГЕНАМ БОЛЬНЫХ ОЧАГОВОЙ АЛОПЕЦИЕЙ, % (n)

TABLE 2. COMPARATIVE CHARACTERISTICS OF THE SPECTRUM OF SENSITIZATION TO POLLEN ALLERGENS IN PATIENTS WITH ALOPECIA AREATA, % (n)

Наименование аллергенов Allergens	1-я группа 1 st group (n = 9)	2-я группа 2 nd group (n = 8)	p
Луговые травы Meadow grass	66,6% (n = 6)	62,5% (n = 5)	p _{1,3} = 0,00006 p _{2,4} = 0,00009
Деревья Trees	66,6% (n = 6)	25,0 (n = 2)	p _{1,3} = 0,00006
Сорные травы Weed grass	77,7% (n = 7)	12,5% (n = 1)	p _{1,2} = 0,007 p _{1,3} = 0,000009
Злаковые травы Cereal herbs	77,7% (n = 7)	37,5% (n = 3)	p _{1,3} = 0,000009

Примечание. Значения p указаны только при p < 0,05.

Note. p values are indicated only at p < 0.05.

Сенсибилизация к пыльце луговых трав и деревьев была отмечена реже, но также на высоком уровне — 66,6%. Высокая частота встречаемости пыльцевой сенсибилизации в группе больных детей, вероятно, связана с наличием сезонных проявлений аллергии (сезонный аллергический риноконъюнктивит) у 44,4% больных данной группы. Кроме того, интересным представляется тот факт, что в 33,3% (n = 3) случаев появление очагов алопеции приходилось именно на период поллинии причинно-значимого аллергена.

У детей в 53,5% случаев сенсибилизация к пыльцевым аллергенам была слабоположительной, в 15,5% — положительной, в 11,9% случаев — резко положительной и в 19,0% случаев — гиперэргической.

Наличие клинических проявлений поллиноза во 2-й группе больных отмечено лишь у 25% больных, однако по результатам аллергологического тестирования сенсибилизация к пыльце луговых трав составила 62,5%, что свидетельствует о «скрытой» сенсибилизации и дает основание предположить о вероятном участии данных аллергенов в развитии очаговой алопеции.

Сенсибилизация к пыльцевым аллергенам у взрослых в 72,5% случаев была слабоположительной, в 22,5% — положительной, в 5,0% случаев — резко положительной. Гиперэргической реакции к пыльцевым аллергенам во 2-й группе больных не выявлено.

В группе контроля сенсибилизации к изучаемым пищевым и пыльцевым аллергенам не выявлено.

Всем больным с учетом аллергологического тестирования назначалась индивидуальная элиминационная диета с исключением причинно-значимых аллергенов с учетом перекрестно-реагирующих аллергенов. Эффект элиминации оценивался через 2 месяца от начала элиминационной диеты. 70% больных отметили клини-

ческое улучшение: в очагах алопеции отмечался рост vellus — пушковых депигментированных волос, а также терминальных пигментированных волос. Полный регресс очагов алопеции в среднем происходил в течение 3-6 месяцев от начала терапии.

В подтверждение клинической эффективности элиминационной диеты при очаговой алопеции приводим результаты собственных наблюдений (рис. 1, 2, 3, см. 3-ю стр. обложки).

Обсуждение

В последние годы в литературе все чаще встречаются данные о положительном влиянии элиминационных диет на рост волос у больных очаговой алопецией [3, 9, 13]. Так, безглютеновая диета стимулировала рост волос у больных ОА с сопутствующей глютеновой энтеропатией [13]. Соблюдение восточной диеты на основе сои было ассоциировано со сниженным риском развития очаговой алопеции: менее 1% относительно общего риска — 2% [16]. По некоторым данным, средиземноморская диета, богатая свежими овощами и зеленью, также как и диета с высоким содержанием белка, является важным компонентом лечения очаговой алопеции [13]. Между тем известно, что назначение элиминационных диет требует строго индивидуального персонализированного подхода. Тем не менее не существует единого мнения о влиянии диетических ограничений на течение очаговой алопеции, что обуславливает необходимость изучения данной проблемы.

Данные литературы о положительных эффектах антигистаминных препаратов в лечении ОА, не только определяют дополнительные терапевтические возможности у данной категории больных, но также указывают на аддитивное влияние тучных клеток в патогенезе ОА [11].

Недавние исследования показывают, что существует тесная связь между очаговой алопецией и нарушением микробиоценоза кишечника [6]. Иммуноопосредованное повреждение кишечного эпителия при воздействии пищевых аллергенов может приводить к повышению кишечной проницаемости с развитием эндогенной интоксикации и формированием очагов повреждения кожи [13]. Поскольку в литературе имеются данные о повышении частоты встречаемости атопических заболеваний у больных очаговой алопецией в 2 раза в сравнении с общей популяцией, проведенное нами исследование о влиянии пищевой аллергии на развитие патологии представляет особый интерес [17]. Можно предположить, что воспалительный процесс в стенке кишечника в результате наличия сенсибилизации к определенным пищевым аллергенам у больных очаговой алопецией способствует формированию воспалительного процесса в области волосяных фолликулов [6].

В результате проведенного нами исследования установлено, что наиболее значимыми пищевыми аллергенами в обеих возрастных группах являлись аллергены куриного яйца, пищевых злаков. Аллергия к белку куриного яйца является одной из наиболее распространенных пищевых аллергий в западных странах. Причем аллергические реакции на яйца могут сохраняться в зрелом возрасте, хотя симптомы могут быть менее выраженными [14]. Аллергены яичного белка могут вызывать не только IgE-опосредованные аллергии, но также и неIgE-опосредованные реакции, к которым относятся такие заболевания как атопический дерматит и эозинофильные гастроэнтеропатии [14]. Поэтому можно предположить, что при ОА именно аллергены яичного белка являются главными триггерами воспалительного процесса у данной категории больных. В проведенном исследовании у детей с очаговой алопецией дополнительно отмечена высокая частота встречаемости к белкам коровьего молока, что может быть связано с высокой частотой встречаемости данной аллергии у детей, а также с возрастными различиями в иммунологических показателях при аутоиммунных заболеваниях [4, 10].

Пищевая аллергия на пшеницу также характеризуется как IgE-зависимыми реакциями немедленного типа с наличием специфичных к пшенице IgE-антител, так и неIgE-опосредованными реакциями, характеризующимися хронической эозинофильной и лимфоцитарной инфильтрацией желудочно-кишечного тракта [8]. Согласно данным статистики, дети имеют более высокую распространенность пищевой аллергии на пшеницу в сравнении со взрослыми, особенно если пшеница была введена после 6-месячного возраста [8]. В нашем исследовании сенсибилизация к пшенице у взрослых с очаговой алопецией была выше в сравнении с детьми. Высокая частота встречаемости сенсибилизации к пищевым

злакам у больных очаговой алопецией свидетельствует о возможном участии данных аллергенов в развитии воспалительного процесса в волосяном фолликуле. Причем действие аллергенов пшеницы при очаговой алопеции вероятно обусловлено, прежде всего, неIgE-опосредованными реакциями с повреждением кишечного барьера и повышением его проницаемости.

Белки сои, наряду с коровьим молоком, куриным яйцом, пищевыми злаками, арахисом, орехами, рыбой, морепродуктами относятся к большой восьмерке продуктов, наиболее часто вызывающих аллергические реакции как у детей, так и взрослых [5].

В обеих возрастных группах больных ОА отмечена высокая частота встречаемости сенсибилизации к пищевым дрожжам. В литературе нет единого мнения о частоте встречаемости грибковой аллергии. Важным является изучение влияния пищевой аллергии к грибкам, поскольку данные аллергены являются составным компонентом многих пищевых продуктов, а также участвуют в развитии перекрестных реакций с аэроаллергенами [7]. Известно, что грибковая аллергия может быть опосредована как IgE-зависимыми реакциями, так и неIgE-опосредованными реакциями [7]. Особого внимания заслуживает факт формирования аутореактивности к белкам собственных тканей при наличии грибковой аллергии у больных атопическим дерматитом [12]. Можно предположить, что наличие сенсибилизации к дрожжам обуславливает формирование аутовоспалительного процесса в волосяных фолликулах у больных очаговой алопецией.

Молекулы пыльцы растений и деревьев являются одной из наиболее частых причин аллергии. Поскольку известна перекрестная реактивность пыльцевых и пищевых аллергенов, у пациентов с пыльцевой сенсибилизацией отмечена ассоциация пищевой аллергии после употребления фруктов, орехов или овощей, проявляющаяся такими клиническими симптомами, как оральная аллергический синдром и другие проявления интестинальной аллергии, крапивница, ангионевротический отек и анафилаксия [19]. В литературе есть указания на то, что один и тот же аллерген может вызывать разнообразные клинические проявления [19].

Высокая частота встречаемости к пыльцевым аллергенам у детей с очаговой алопецией может свидетельствовать о потенциальной роли данных аллергенов в развитии воспалительного процесса в волосяных фолликулах. В проведенном нами исследовании установлено, что наличие поллиноза (сезонных проявлений аллергии) часто ассоциировано с поливалентной сенсибилизацией к различным пыльцевым аллергенам, что согласуется с данными литературы [10].

В группе взрослых с очаговой алопецией высокая частота встречаемости сенсибилизации к пыльце луговых трав больных без признаков поллиноза дает основание предположить о ве-

роютном участии данных аллергенов в развитии очаговой алопеции в результате наличия феномена «перекрестной» реактивности с продуктами питания (пищевые злаки).

Заключение

Таким образом, в результате проведенных исследований установлены особенности спектра сенсибилизации к пищевым и пыльцевым аллергенам больных очаговой алопецией различных возрастных категорий.

Многообразие клинических проявлений пищевой аллергии заставляет задуматься о нетипич-

ных ее проявлениях, таких как цефалгии, боли в суставах, псориаз [2, 5]. Есть единичные данные о роли аллергии в развитии очаговой алопеции [3].

Установленная нами сенсибилизация к пищевым и пыльцевым (перекрестнореагирующим) аллергенам больных очаговой алопецией и положительный эффект элиминационной диеты доказывает роль пищевой аллергии в развитии патологии. Следовательно, изучение причинно-следственной взаимосвязи пищевой аллергии и очаговой алопеции представляет особую актуальность и создает предпосылки для открытия новых диагностических и терапевтических возможностей.

Список литературы / References

1. Барило А.А., Борисова И.В., Смирнова С.В. Дерматореспираторный синдром как проявление пищевой аллергии у детей // Российский аллергологический журнал. 2019. Т. 16, № 1-2. С. 32-34. [Barilo A.A., Borisova I.V., Smirnova S.V. The dermato-respiratory syndrome as a manifestation of food allergy in children. *Rossiyskiy allergologicheskiy zhurnal = Russian Journal of Allergy*, 2019, Vol. 16, no. 1-2, pp. 32-34. (In Russ.)]
2. Барило А.А., Смирнова С.В. Сравнительный анализ спектра сенсибилизации к пищевым, пыльцевым и грибковым аллергенам пациентов псориазом и атопическим дерматитом // Вопросы питания, 2020. Т. 89, № 5. С. 28-34. [Barilo A.A., Smirnova S.V. The comparative analysis of the spectrum of sensitization to food, pollen and fungal allergens in patients with atopic dermatitis and psoriasis. *Voprosy pitaniya = Problems of Nutrition*, 2020, Vol. 89, no. 5, pp. 28-34. (In Russ.)]
3. Барило А.А., Смирнова С.В., Олянина И.М. Клинический случай очаговой алопеции у ребенка с атопией // Медицинская иммунология, 2021. Т. 23, № 1. С. 191-196. [Barilo A.A., Smirnova S.V., Olyanina I.M. Clinical case of focal alopecia in a child with atopy. *Meditinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2021, Vol. 23, no. 1, pp. 191-196. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-CCO-2074.
4. Барило А.А., Смирнова С.В., Смольникова М.В. Иммунологические показатели больных псориазом в различные возрастные периоды // Российский иммунологический журнал. 2017. Т. 11 (20), № 4. С. 680-681. [Barilo A.A., Smirnova S.V., Smolnikova M.V. Immunological indicators of patients with psoriasis in different age groups. *Rossiyskiy immunologicheskiy zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2017, Vol. 11 (20), no. 4, pp. 680-681. (In Russ.)]
5. Вишнёва Е.А., Намазова-Баранова Л.С., Макарова С.Г., Алексеева А.А., Эфендиева К.Е., Левина Ю.Г., Селимзянова Л.Р., Вознесенская Н.И., Томилова А.Ю., Волков К.С., Сновская М.А. Пищевая аллергия к белкам пшеницы. Трудности диагностики и лечения // Педиатрическая фармакология, 2015. Т. 4. С. 429-434. [Vishneva E.A., Namazova-Baranova L.S., Makarova S.G., Alexeeva A.A., Effendieva K.E., Levina Y.G., Selimzyanova L.R., Voznesenskaya N.I., Tomilova A.Yu., Volkov K.S., Snovskaya M.A. Food Allergy To Wheat Proteins. Diagnostic And Treatment Difficulties. *Pediatricheskaya farmakologiya = Pediatric Pharmacology*, 2015, Vol. 4, pp. 429-434. (In Russ.)]
6. Borde A., Åstrand A. Alopecia areata and the gut-the link opens up for novel therapeutic interventions. *Expert Opin. Ther. Targets.*, 2018, Vol. 22, no. 6, pp. 503-511.
7. Campana R., Moritz K., Marth K., Neubauer A., Huber H., Henning R., Blatt K., Hoermann G., Brodie T.M., Kaider A., Valent P., Sallusto F., Wöhrl S., Valenta R. Frequent occurrence of T cell-mediated late reactions revealed by atopy patch testing with hypoallergenic rBet v 1 fragments. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2016, Vol. 137, no. 2, pp. 601-609.
8. Cianferoni A. Wheat allergy: diagnosis and management. *J. Asthma Allergy*, 2016, Vol. 9, pp. 13-25.
9. Guo E.L., Katta R. Diet and hair loss: Effects of nutrient deficiency and supplement use. *Dermatol. Pract. Concept.*, 2017, Vol. 7, no. 1, pp. 1-10.
10. Li J.D., Du Z.R., Liu J., Xu Y.Y., Wang R.Q., Yin J. Characteristics of pollen-related food allergy based on individual pollen allergy profiles in the Chinese population. *World Allergy Organ J.*, 2020, Vol. 13, no. 5, 100120. doi: 10.1016/j.waojou.2020.100120.
11. McElwee K.J., Gilhar A., Tobin D.J., Ramot Y., Sundberg J.P., Nakamura M., Bertolini M., Inui S., Tokura Y., King L.E., Duque-Estrada B., Tosti A., Keren A., Itami S., Shoenfeld Y., Zlotogorski A., Paus R. What causes alopecia areata? *Exp. Dermatol.*, 2013, Vol. 22, no. 9, pp. 609-626.
12. Morita E., Hide M., Yoneya Y., Kannbe M., Tanaka A., Yamamoto S. An assessment of the role of *Candida albicans* antigen in atopic dermatitis. *J. Dermatol.*, 1999, Vol. 26, pp. 282-287.
13. Pham C.T., Romero K., Almohanna H.M., Griggs J., Ahmed A., Tosti A. The role of diet as an adjuvant treatment in scarring and nonscarring alopecia. *Skin Appendage Disord.*, 2020, Vol. 6, pp. 88-96.
14. Romantsik O., Tosca M.A., Zappettini S., Calevo M.G. Oral and sublingual immunotherapy for egg allergy. *Cochrane Database Syst. Rev.*, 2018, Vol. 4, no. 4, CD010638. doi:10.1002/14651858.CD010638.pub.
15. Rork J.F., Rashighi M., Harris J.E. Understanding Autoimmunity of Vitiligo and Alopecia Areata. *Curr. Opin. Pediatr.*, 2016, Vol. 28, no. 4, pp. 463-469.
16. Simakou T., Butcher J.P., Reid S., Henriquez F.L. Alopecia areata: A multifactorial autoimmune condition. *J. Autoimmun.*, 2019, Vol. 98, pp. 74-85.

17. Strazzulla L.C., Wang E.H.C., Avila L., Lo Sicco K., Brinster N., Christiano A.M., Shapiro J. Alopecia areata: Disease characteristics, clinical evaluation, and new perspectives on pathogenesis. *J. Am. Acad. Dermatol.*, 2018, Vol. 78, no. 1, pp. 1-12.
18. Thompson J.M., Mehewish A. Mirza, Park M.K., Qureshi A.A., Cho E. The role of micronutrients in alopecia areata: A Review. *Am. J. Clin. Dermatol.*, 2017, Vol. 18, no. 5, pp. 663-679.
19. Yagami A., Ebisawa M. New findings, pathophysiology, and antigen analysis in pollen-food allergy syndrome. *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.*, 2019, Vol. 19, no. 3, pp. 218-223.

Авторы:

Барило А.А. — к.м.н., старший научный сотрудник лаборатории клинической патофизиологии, Научно-исследовательский институт медицинских проблем Севера — обособленное подразделение ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук», г. Красноярск, Россия

Смирнова С.В. — д.м.н., профессор, руководитель научного направления, Научно-исследовательский институт медицинских проблем Севера — обособленное подразделение ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук», г. Красноярск, Россия

Authors:

Barilo A.A., PhD (Medicine), Senior Research Associate, Laboratory of Clinical Pathophysiology, Research Institute of Medical Problems of the North, Federal Research Center, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Krasnoyarsk, Russian Federation

Smirnova S.V., PhD, MD (Medicine), Professor, Head of Scientific Direction, Research Institute of Medical Problems of the North, Federal Research Center, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Krasnoyarsk, Russian Federation

Поступила 29.03.2022
Принята к печати 22.05.2022

Received 29.03.2022
Accepted 22.05.2022

ВЗАИМОСВЯЗИ МЕЖДУ СЫВОРОТОЧНОЙ КОНЦЕНТРАЦИЕЙ HMGB1 И СУБПОПУЛЯЦИОННЫМ СОСТАВОМ ЦИРКУЛИРУЮЩИХ МОНОЦИТОВ У ПАЦИЕНТОВ С СУБКЛИНИЧЕСКИМ АТЕРОСКЛЕРОЗОМ

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

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

Резюме. Хроническое стерильное низкоинтенсивное воспаление является важнейшим механизмом развития и прогрессирования атеросклероза. В условиях персистирующего неразрешающегося (non-resolving) воспаления, наблюдающегося в сосудистой стенке и атеросклеротической бляшке (АСБ), происходит постоянное повреждение тканей, приводящее к повышенному образованию эндогенных молекулярных паттернов, ассоциированных с опасностью (danger associated molecular patterns, DAMP). Один из прототипических DAMP является негистоновый хромосомный белок HMGB1. Попадая во внеклеточное пространство, HMGB1 действует как DAMP и индуцирует воспаление путем связывания с паттерн-распознающими рецепторами (TLR2, TLR4, RAGE, CD36 и т.д.). В целом ряде клинических исследований было установлено повышение уровня HMGB1 в крови у пациентов с ишемической болезнью сердца и атеросклеротическим заболеванием артерий нижних конечностей, а также его взаимосвязи с бременем атеросклероза коронарных артерий. В то же время механизмы прогрессирования атеросклероза, опосредованные HMGB1, на сегодняшний день изучены лишь частично.

Цель исследования — изучить взаимосвязь между уровнем сывороточного HMGB1 и субпопуляционным составом циркулирующих моноцитов у пациентов с субклиническим атеросклерозом в возрасте 40-64 лет.

В исследование включали пациентов в возрасте 40-64 лет с субклиническим атеросклерозом периферических артерий. Концентрацию HMGB1 в сыворотке крови определяли с использованием наборов для иммуноферментного анализа (Human HMGB1/HMG-1 ELISA Kit, NBP2-62766, Novus Biologicals, США). Порог определения содержания HMGB1 в сыворотке крови составлял 18,75 пг/мл,

Адрес для переписки:

Генкель Вадим Викторович
ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный
медицинский университет» Министерства
здравоохранения РФ
454048, Россия, г. Челябинск, ул. Шаумяна, 118, кв. 22.
Тел.: 8 (951) 441-70-61.
E-mail: henkel-07@mail.ru

Address for correspondence:

Genkel Vadim V.
South-Ural State Medical University
454048, Russian Federation, Chelyabinsk, Shaumyan str.,
118, apt 22.
Phone: 7 (951) 441-70-61.
E-mail: henkel-07@mail.ru

Образец цитирования:

В.В. Генкель, И.И. Долгушин, И.Л. Батурина,
А.Ю. Савочкина, К.В. Никушкина, А.А. Минасова,
Л.Р. Пыхова, А.С. Кузнецова, И.И. Шапошник
«Взаимосвязи между сывороточной концентрацией
HMGB1 и субпопуляционным составом циркулирующих
моноцитов у пациентов с субклиническим
атеросклерозом» // Медицинская иммунология, 2022.
Т. 24, № 4. С. 807-820.
doi: 10.15789/1563-0625-RBS-2508
© Генкель В.В. и соавт., 2022

For citation:

V.V. Genkel, I.I. Dolgushin, I.L. Baturina, A.Yu. Savochkina,
K.V. Nikushkina, A.A. Minasova, L.R. Pykhova,
A.S. Kuznetsova, I.I. Shaposhnik "Relationships between
serum HMGB1 concentration and subpopulation composition
of circulating monocytes in patients with subclinical
atherosclerosis", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya
Immunologiya, 2022, Vol. 24, no. 4, pp. 807-820.
doi: 10.15789/1563-0625-RBS-2508
DOI: 10.15789/1563-0625-RBS-2508

диапазон измерения – 31,25–2000 пг/мл. Фенотипирование субпопуляций циркулирующих моноцитов проводили методом проточной цитометрии на аппарате Navios 6/2 (Beckman Coulter, США).

Увеличение концентрации HMGB1 в сыворотке крови ассоциировалось с уменьшением количества классических M2-моноцитов и увеличением промежуточных и M1-моноцитов. Кроме того, увеличение концентрации HMGB1 было связано с увеличением количества классических, промежуточных и неклассических моноцитов, экспрессирующих CD36 и TLR2. По мере увеличения концентрации HMGB1 от Q1 до Q4 наблюдалось увеличение количества классических ($p = 0,001$) и промежуточных моноцитов ($p = 0,006$), но не неклассических ($p = 0,147$). По мере увеличения концентрации HMGB1 от Q1 до Q4 происходило увеличение количества классических ($p < 0,0001$), промежуточных ($p < 0,0001$) и неклассических ($p < 0,0001$) моноцитов, экспрессирующих CD36. Также было установлено увеличение количества промежуточных ($p = 0,022$; $p_{1,4} = 0,034$) и неклассических ($p = 0,002$; $p_{1,4} = 0,035$) моноцитов, экспрессирующих TLR2. По данным корреляционного анализа было установлено, что концентрация IL-1 β прямо коррелировала с количеством M1-моноцитов ($r = 0,268$; $p = 0,035$) и обратно – с количеством M2-моноцитов ($r = -0,376$; $p = 0,003$).

Увеличение концентрации HMGB1 в сыворотке крови пациентов с субклиническим атеросклерозом ассоциировалось с уменьшением количества классических и M2-моноцитов, и увеличением – промежуточных и M1-моноцитов, а также с увеличением количества промежуточных и неклассических моноцитов, экспрессирующих CD36 и TLR2. Уровень IL-1 β прямо коррелировал с концентрацией HMGB1 и количеством M1-моноцитов.

Ключевые слова: HMGB1, субпопуляционный состав циркулирующих моноцитов, атеросклероз

RELATIONSHIPS BETWEEN SERUM HMGB1 CONCENTRATION AND SUBPOPULATION COMPOSITION OF CIRCULATING MONOCYTES IN PATIENTS WITH SUBCLINICAL ATHEROSCLEROSIS

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

South-Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russian Federation

Abstract. Chronic non-infectious inflammation of low intensity is the most important mechanism of development and progression in atherosclerosis. Under the conditions of persistent non-resolving inflammation observed in the vascular wall and atherosclerotic plaque (ASB), permanent tissue damage occurs, thus leading to increased formation of endogenous danger-associated molecular patterns (DAMPs). The non-histone chromosomal protein HMGB1 may be regarded as a prototypical DAMPs. HMGB1 acts as a DAMP if entering the extracellular space, causing inflammation by its binding to pattern-recognizing receptors (TLR2, TLR4, RAGE, CD36, etc.). A number of clinical studies have revealed higher HMGB1 levels in the blood of patients with coronary heart disease and atherosclerotic disease of the lower limb arteries, as well as its interrelations with the burden of coronary artery atherosclerosis. Currently, the mechanisms of HMGB1-mediated atherosclerosis progression are studied only fragmentary. The aim of our study was to investigate relationships between the serum HMGB1 level and subsets of circulating monocyte subpopulations in patients with subclinical atherosclerosis.

The study enrolled patients aged 40–64 years with subclinical atherosclerosis of peripheral arteries. Serum HMGB1 concentration was determined using enzyme immunoassay kits (Human HMGB1/HMG-1 ELISA Kit, NBP2-62766, Novus Biologicals, USA). The serum HMGB1 threshold was 18.75 pg/ml, whereas the measurement range was 31.25 to 2000 pg/ml. Phenotyping of the blood monocyte subpopulations was performed by flow cytometry using Navios 6/2 device (Beckman Coulter, USA).

An increase in serum HMGB1 concentration was associated with decreased number of classical M2 monocytes, and an increase in intermediate and M1 monocytes. Moreover, an increase in HMGB1 concentration was associated with higher numbers of classical, intermediate, and non-classical monocytes expressing CD36 and TLR2. Increased HMGB1 concentration (from Q1 to Q4) correlated with higher numbers of classical ($p = 0.001$) and intermediate monocytes ($p = 0.006$) but not with non-classical phenotypes ($p = 0.147$). Upon increase of HMGB1 concentration (Q1 to Q4), we have found an increase in the number of classical ($p < 0.0001$), intermediate ($p < 0.0001$), and non-classical ($p < 0.0001$), CD36-expressing monocytes. An increased number of intermediate ($p = 0.022$; $p_{1,4} = 0.034$) and non-classical, TLR2-expressing monocytes was also revealed ($p = 0.002$; $p_{1,4} = 0.035$). By mean of correlation analysis, IL-1 β concentrations showed direct correlation with the number of M1 monocytes ($r = 0.268$; $p = 0.035$) and inverse relation with the number of M2 monocytes ($r = -0.376$; $p = 0.003$).

Increased serum HMGB1 concentration in patients with subclinical atherosclerosis was associated with decreased numbers of classical and M2 monocytes, as well as higher numbers of intermediate and M1 monocytes, like as with increased contents of intermediate and non-classical monocytes expressing CD36 and TLR2. IL-1 β levels directly correlated with HMGB1 concentration and the number of M1-monocytes.

Keywords: HMGB1, monocyte subpopulations, atherosclerosis

Введение

Хроническое стерильное низкоинтенсивное воспаление является важнейшим механизмом развития и прогрессирования атеросклероза [29]. В настоящее время считается, что главным инициатором воспаления при атеросклерозе являются апоВ-содержащие липопротеины, аккумуляция которых в субэндотелиальном пространстве сосудистой стенки запускает воспалительный ответ с участием клеток врожденного и адаптивного иммунитета [21, 35]. В условиях персистирующего неразрешающегося (non-resolving) воспаления, наблюдающегося в сосудистой стенке и атеросклеротической бляшке (АСБ), происходит постоянное повреждение тканей, приводящее к повышенному образованию эндогенных молекулярных паттернов, ассоциированных с опасностью (danger associated molecular patterns, DAMP) [27]. DAMP приводят к активации клеток врожденного и адаптивного иммунитета посредством связывания с паттерн-распознающими рецепторами, например, такими как Toll-подобные рецепторы (Toll-like receptors, TLR) и скавенджер-рецепторами [2]. DAMP-зависимое стерильное воспаление, лежащее в основе различных хронических и возраст-ассоциированных заболеваний, по мере развития атеросклероза становится независимым и критически значимым фактором прогрессирования поражения, в том числе несмотря на коррекцию нарушений липидного обмена [1, 16].

Один из прототипических DAMP является негистоновый хромосомный белок HMGB1 (high mobility group box protein 1) [5]. Локализующийся в ядре клетки HMGB1 связан с ДНК, при этом наибольшее сродство наблюдается к участкам

с различными структурными нарушениями. В ядре клетки HMGB1 выполняет критически важные функции, обеспечивающие экспрессию генов, репарацию и репликацию ДНК [3, 24]. Установлено, что, попадая во внеклеточное пространство, что может происходить пассивно при повреждении клеток, или активно при активации иммунных клеток, HMGB1 действует как DAMP и индуцирует воспаление путем связывания с паттерн-распознающими рецепторами (TLR2, TLR4, RAGE, CD36 и т.д.) [24]. В экспериментальных исследованиях было показано, что HMGB1 посредством связывания с TLR4 на макрофагах способствовал развитию и прогрессированию атеросклероза у ApoE^{-/-} мышей [14]. С другой стороны, нейтрализация HMGB1 приводила к уменьшению тяжести развивающегося атеросклеротического поражения, что позволяет рассматривать его как возможную терапевтическую мишень [11, 17, 31].

В целом ряде клинических исследований было установлено повышение уровня HMGB1 в крови у пациентов с ишемической болезнью сердца и атеросклеротическим заболеванием артерий нижних конечностей, а также его взаимосвязи с бременем атеросклероза коронарных артерий [7, 9, 13]. В то же время механизмы прогрессирования атеросклероза, опосредованные HMGB1, на сегодняшний день изучены лишь частично [13]. Изучение в клинических исследованиях возможных HMGB1-зависимых путей и факторов прогрессирования атеросклероза является необходимым условием для внедрения данного биомаркера в клиническую практику, а также способствует лучшему пониманию патогенеза атеросклероза и улучшению прогнозирования его течения [30]. **Целью настоящего исследования**

являлось изучение взаимосвязей между уровнем сывороточного HMGB1 и субпопуляционным составом циркулирующих моноцитов у пациентов с субклиническим атеросклерозом в возрасте 40-64 лет.

Материалы и методы

В исследование включали пациентов в возрасте 40-64 с субклиническим атеросклерозом, верифицированным дуплексным сканированием артерий каротидного бассейна и артерий нижних конечностей. Критерием субклинического атеросклероза являлось наличие атеросклеротической бляшки по меньшей мере в одном из исследуемых сосудистых бассейнов [4].

Протокол исследования был одобрен этическим комитетом ФГБОУ ВО ЮУГМУ Минздрава России (протокол №10 от 27.10.2018). При включении в исследование всеми пациентами подписывалось информированное согласие на участие в исследовании.

В исследование не включали пациентов при наличии одного из перечисленных критериев: установленные ранее атеросклеротические ССЗ (цереброваскулярная болезнь; ишемическая болезнь сердца; заболевание периферических артерий; ревазуляризация коронарных или периферических артерий); тяжелые нарушения функции печени и почек; злокачественные новообразования; установленные хронические воспалительные заболевания; острые воспалительные или инфекционные заболевания в предшествующие 28 дней; прием противовоспалительных или иммуносупрессивных препаратов).

Лабораторное обследование включало в себя определение следующих биохимических показателей: липидограмма, гликированный гемоглобин, креатинин с последующим расчетом скорости клубочковой фильтрации (СКФ) по формуле СКД-EPI (BioChem Analette, США). Определение концентрации высокочувствительного С-реактивного белка (вчСРБ) в сыворотке крови проводили с помощью наборов для иммуноферментного анализа (АО «Вектор-Бест», Россия). Концентрацию HMGB1 в сыворотке крови определяли с использованием наборов для иммуноферментного анализа (Human HMGB1/HMG-1 ELISA Kit, NBP2-62766, Novus Biologicals, США). Порог определения содержания HMGB1 в сыворотке крови составлял 18,75 пг/мл, диапазон измерения — 31,25-2000 пг/мл.

Концентрацию интерлейкина-1 β (IL-1 β), TNF α и IL-6 проводили с помощью мультиплексного анализа по технологии xMAP (Luminex,

США) с использованием наборов с магнитными частицами Milliplex Human High Sensitivity T Cell Panel (Merck-Millipore) согласно инструкции фирмы-производителя. Регистрацию и анализ данных проводили на приборе Luminex MAGPIX-100 (Luminex, США).

Фенотипирование субпопуляций циркулирующих моноцитов проводили методом проточной цитометрии на аппарате Navios 6/2 (Beckman Coulter, США). Забор крови осуществляли после как минимум 8 часов голодания в пробирки с антикоагулянтом К2 ЭДТА. Для фенотипирования субпопуляций моноцитов использовали конъюгаты моноклональных антител к следующим антигенам: CD16, PE-Cy7 (eBioscience, США); CD14, PerCP-Cy5.5 (eBioscience, США); CD282 (TLR2), Alexa Flour 647 (BioLegend, США); CD36, FITC (BD Biosciences, США); CD68 (PE-Cy7, eBioscience); CD163 (Alexa Fluor 488, eBioscience). Оценивали абсолютное и относительное количество CD14⁺⁺CD16⁻ моноцитов (классические моноциты), CD14⁺CD16⁺ моноцитов (промежуточные моноциты), CD14⁺CD16⁺⁺ моноцитов (неклассические моноциты). В последующем определяли абсолютное и относительное количество классических, промежуточных и неклассических моноцитов, экспрессирующих CD36 и TLR2. Экспрессию CD36 и TLR2 на указанных субпопуляциях циркулирующих моноцитов определяли по средней интенсивности флуоресценции.

Анализ полученных данных проводили с использованием программного обеспечения IBM SPSS Statistics (версия 18) и MedCalc (версия 20.019). Качественные переменные описывали абсолютными и относительными частотами (процентами). Количественные переменные описывали медианой (Me) с указанием интерквартильного интервала (Q_{0,25}-Q_{0,75}). В целях определения взаимосвязей показателей использовали корреляционный анализ Спирмена. Для оценки значимости различий между тремя и более группами использовали критерий Краскела—Уоллиса с последующим попарным сравнением с использованием критерия Манна—Уитни. Различия считали статистически значимыми при критическом уровне значимости 0,05. Для оценки зависимости одной количественной переменной от другой применяли процедуру линейной регрессии.

Результаты

В исследование были включены 88 пациентов с субклиническим атеросклерозом периферических артерий, 47 (53,4%) мужчин и 41 (46,6%)

ТАБЛИЦА 1. КЛИНИЧЕСКАЯ И ЛАБОРАТОРНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ПАЦИЕНТОВ

TABLE 1. CLINICAL AND LABORATORY CHARACTERISTICS OF PATIENTS

Показатели Indicators	Пациенты Patients (n = 88)
Возраст, лет, Ме ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$) Age, years, Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)	49,0 (44,0-55,7)
Атеросклероз артерий каротидного бассейна, n (%) Carotid atherosclerosis, n (%)	67 (76,1)
Атеросклероз артерий нижних конечностей, n (%) Atherosclerosis of lower limb arteries, n (%)	54 (61,5)
ИМТ, кг/м ² , Ме ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$) BMI, kg/m ² , Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)	26,8 (23,3-29,7)
Ожирение, n (%) Obesity, n (%)	18 (20,4)
Курение, n (%) Smoking, n (%)	19 (21,6)
Артериальная гипертензия (АГ), n (%) Hypertension, n (%)	42 (47,7)
Ингибиторы РААС, n (%) RAAS-inhibitors, n (%)	23 (26,1)
Статины, n (%) Statins, n (%)	22 (25,0)
Дислипидемия, n (%) Dyslipidemia, n (%)	76 (86,4)
ОХС, ммоль/л, Ме ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$) TC, mmol/L, Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)	5,77 (4,89-6,45)
ХС ЛНП, ммоль/л, Ме ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$) LDL-cholesterol, mmol/L, Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)	3,54 (2,81-4,32)
ХС ЛВП, ммоль/л, Ме ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$) HDL-cholesterol, mmol/L, Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)	1,35 (1,15-1,60)
ТГ, ммоль/л, Ме ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$) TG, mmol/L, Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)	1,25 (0,90-1,80)
ХС не-ЛВП, ммоль/л, Ме ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$) Non-HDL cholesterol, mmol/L, Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)	4,25 (3,59-5,24)
Глюкоза, ммоль/л, Ме ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$) Glucose, mmol/L, Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)	5,20 (4,91-5,76)
Гликированный гемоглобин, %, Ме ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$) Glycated hemoglobin, %, Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)	5,60 (5,14-5,92)
СКФ, мл/мин/1,73 м ² , Ме ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$) GFR, ml/min/1,73 m ² , Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)	70,0 (62,0-88,0)
вЧСРБ, мг/л, Ме ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$) HsCRP, mg/L, Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)	2,48 (1,20-3,01)
HMGB1, пг/мл, Ме ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$) HMGB1, pg/mL, Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)	1161,3 (463,7-1687,6)
IL-1 β , пг/мл, Ме ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$) IL-1 β , pg/mL, Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)	1,52 (0,960-2,280)
IL-6, пг/мл, Ме ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$) IL-6, pg/mL, Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)	0,00 (0,00-0,54)
TNF α , пг/мл, Ме ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$) TNF α , pg/mL, Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)	6,56 (5,04-7,87)

Примечание. ИМТ – индекс массы тела; РААС – ренин-ангиотензин-альдостероновая система; ОХС – общий холестерин; ХС ЛНП – холестерин липопротеинов низкой плотности; ХС ЛВП – холестерин липопротеинов высокой плотности; ТГ – триглицериды; СКФ – скорость клубочковой фильтрации; вЧСРБ – высокочувствительный С-реактивный белок; Ме – медиана; ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$) – интерквартильный интервал.

Note. BMI, body mass index; RAAS, renin-angiotensin-aldosterone system; TC, total cholesterol; LDL, low-density lipoprotein; HDL, high-density lipoprotein; TG, triglycerides; hsCRP, high-sensitivity C-reactive protein; GFR, glomerular filtration rate; Me, median; ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$), interquartile range.

ТАБЛИЦА 2. РЕЗУЛЬТАТЫ ПРОТОЧНОЙ ЦИТОМЕТРИИ С ОЦЕНКОЙ СУБПОПУЛЯЦИОННОГО СОСТАВА ЦИРКУЛИРУЮЩИХ МОНОЦИТОВ

TABLE 2. RESULTS OF FLOW CYTOMETRY ASSESSING THE SUBPOPULATION COMPOSITION OF CIRCULATING MONOCYTES

Показатели Indicators	Пациенты Patients (n = 88)
CD14⁺⁺CD16⁻ (классические моноциты) CD14 ⁺⁺ CD16 ⁻ (classical monocytes)	
Абсолютные значения, кл/мкл Absolute values, cells/ μ L	143,5 (72,5-315,2)
Относительные значения, % Relative values, %	44,5 (13,1-70,1)
CD14⁺CD16⁺ (промежуточные моноциты) CD14 ⁺ CD16 ⁺ (intermediate monocytes)	
Абсолютные значения, кл/мкл Absolute values, cells/ μ L	94,0 (27,0-203,2)
Относительные значения, % Relative values, %	26,7 (5,12-45,80)
CD14⁺CD16⁺⁺ (неклассические моноциты) CD14 ⁺ CD16 ⁺⁺ (non-classical monocytes)	
Абсолютные значения, кл/мкл Absolute values, cells/ μ L	21,5 (11,5-49,7)
Относительные значения, % Relative values, %	5,35 (2,85-10,60)
CD14⁺⁺CD16⁺TLR2⁺	
Абсолютные значения, кл/мкл Absolute values, cells/ μ L	104,0 (14,0-331,5)
Относительные значения, % Relative values, %	30,1 (4,19-97,20)
Средняя интенсивность флуоресценции, усл. ед. Mean fluorescent intensity, c. u.	32,1 (8,01-69,00)
CD14⁺⁺CD16⁺CD36⁺	
Абсолютные значения, кл/мкл Absolute values, cells/ μ L	260 (50,2-452,0)
Относительные значения, % Relative values, %	75,0 (9,06-98,80)
Средняя интенсивность флуоресценции, усл. ед. Mean fluorescent intensity, c. u.	5,10 (1,63-19,90)
CD14⁺CD16⁺TLR2⁺	
Абсолютные значения, кл/мкл Absolute values, cells/ μ L	392,0 (296,5-475,0)
Относительные значения, % Relative values, %	93,4 (71,6-98,2)
Средняя интенсивность флуоресценции, усл. ед. Mean fluorescent intensity, c. u.	30,8 (9,92-45,90)
CD14⁺CD16⁺CD36⁺	
Абсолютные значения, кл/мкл Absolute values, cells/ μ L	350 (295,6-476,0)
Относительные значения, % Relative values, %	94,6 (54,3-99,6)
Средняя интенсивность флуоресценции, усл. ед. Mean fluorescent intensity, c. u.	34,2 (15,1-58,1)

Таблица 2 (окончание)
Table 2 (continued)

Показатели Indicators	Пациенты Patients (n = 88)
CD14⁺CD16⁺⁺TLR2⁺	
Абсолютные значения, кл/мкл Absolute values, cells/ μ L	313,0 (223,7-478,5)
Относительные значения, % Relative values, %	89,7 (57,3-98,4)
Средняя интенсивность флуоресценции, усл. ед. Mean fluorescent intensity, c. u.	10,2 (3,39-23,90)
CD14⁺CD16⁺⁺CD36⁺	
Абсолютные значения, кл/мкл Absolute values, cells/ μ L	304,0 (33,7-460,5)
Относительные значения, % Relative values, %	86,9 (7,57-100,00)
Средняя интенсивность флуоресценции, усл. ед. Mean fluorescent intensity, c. u.	6,47 (1,88-22,00)
CD14⁺CD68⁺CD163⁻ (M1-моноциты) CD14 ⁺ CD68 ⁺ CD163 ⁻ (M1 monocytes)	
Абсолютные значения, кл/мкл Absolute values, cells/ μ L	207,0 (59,0-383,7)
Относительные значения, % Relative values, %	58,8 (13,6-84,6)
CD14⁺CD163⁺CD68⁻ (M2-моноциты) CD14 ⁺ CD163 ⁺ CD68 ⁻ (M2 monocytes)	
Абсолютные значения, кл/мкл Absolute values, cells/ μ L	7,00 (2,00-41,50)
Относительные значения, % Relative values, %	1,63 (0,42-9,89)

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

Notes. C. u. – conventional units; cells/ μ L – cells in 1 microliter.

женщина. Клиническая и лабораторная характеристика пациентов представлена в таблице 1.

Субклинический атеросклероз с вовлечением двух сосудистых бассейнов был установлен у 46 (52,3%) пациентов, одного сосудистого бассейна – у 42 (47,7%). На момент включения в исследование статины получали 25% пациентов. Результаты проточной цитофлуориметрии представлены в таблице 2.

С целью оценки взаимосвязей между уровнем HMGB1 в сыворотке и количеством циркулирующих моноцитов различных субпопуляций, а также уровнем экспрессии CD36 и TLR2, был проведен корреляционный анализ и линейный регрессионный анализ (см. табл. 3).

Таким образом, увеличение концентрации HMGB1 в сыворотке крови ассоциировалось с уменьшением количества классических M2-моноцитов и увеличением промежуточных и M1-моноцитов. Кроме того, увеличение кон-

центрации HMGB1 было связано с увеличением количества классических, промежуточных и неклассических моноцитов, экспрессирующих CD36 и TLR2.

В зависимости от концентрации HMGB1 в сыворотке крови пациенты были разделены на квартили для межгруппового сравнения изучаемых показателей с использованием критерия Краскела–Уоллиса и последующим попарным сравнением с использованием критерия Манна–Уитни. Было установлено, что по мере увеличения концентрации HMGB1 от Q1 до Q4 наблюдалось увеличение количества классических ($p = 0,001$) и промежуточных моноцитов ($p = 0,006$), но не неклассических ($p = 0,147$; результаты попарного анализа представлены на рисунке 1).

Кроме того, по мере увеличения концентрации HMGB1 от Q1 до Q4 происходило увеличение количества классических ($p < 0,0001$), промежуточных ($p < 0,0001$) и неклассических ($p < 0,0001$)

ТАБЛИЦА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ КОРРЕЛЯЦИОННОГО АНАЛИЗА И ЛИНЕЙНОГО РЕГРЕССИОННОГО АНАЛИЗА

TABLE 3. RESULTS OF CORRELATION ANALYSIS AND LINEAR REGRESSION ANALYSIS

Показатели Indicators	Корреляции Спирмена Spearman's correlation		Линейная регрессия Linear regression	
	r	p	R ²	p
CD14⁺CD16⁻, кл/мкл CD14 ⁺ CD16 ⁻ , cells/ μ L	-0,618	< 0,0001	0,343	< 0,0001
CD14⁺CD16⁺, кл/мкл CD14 ⁺ CD16 ⁺ , cells/ μ L	0,536	< 0,0001	0,262	0,001
CD14⁺CD16⁺CD36⁺, кл/мкл CD14 ⁺ CD16 ⁺ CD36 ⁺ , cells/ μ L	0,721	< 0,0001	0,395	< 0,0001
CD14⁺CD16⁺TLR2⁺, кл/мкл CD14 ⁺ CD16 ⁺ TLR2 ⁺ , cells/ μ L	0,359	0,015	0,153	0,042
CD14⁺CD16⁺CD36⁺, кл/мкл CD14 ⁺ CD16 ⁺ CD36 ⁺ , cells/ μ L	0,641	< 0,0001	0,346	< 0,0001
CD14⁺CD16⁺TLR2⁺, кл/мкл CD14 ⁺ CD16 ⁺ TLR2 ⁺ , cells/ μ L	0,478	< 0,0001	0,192	0,008
CD14⁺CD16⁺CD36⁺, кл/мкл CD14 ⁺ CD16 ⁺ CD36 ⁺ , cells/ μ L	0,691	< 0,0001	0,378	< 0,0001
CD14⁺CD16⁺TLR2⁺, кл/мкл CD14 ⁺ CD16 ⁺ TLR2 ⁺ , cells/ μ L	0,558	< 0,0001	0,265	0,001
Экспрессия CD36 на CD14⁺CD16⁺, усл. ед. Expression of CD36 on CD14 ⁺ CD16 ⁺ , с. у.	0,573	< 0,0001	0,210	0,005
Экспрессия TLR2 на CD14⁺CD16⁺, усл. ед. Expression of TLR2 on CD14 ⁺ CD16 ⁺ , с. у.	-0,439	0,002	0,165	0,007
CD14⁺CD68⁺CD163⁺, кл/мкл CD14 ⁺ CD68 ⁺ CD163 ⁺ , cells/ μ L	0,494	< 0,0001	0,275	< 0,0001
CD14⁺CD163⁺CD68⁺, кл/мкл CD14 ⁺ CD163 ⁺ CD68 ⁺ , cells/ μ L	-0,497	< 0,0001	0,147	0,001

Примечание. См. примечание к таблице 2.

Note. As for Table 2.

моноцитов, экспрессирующих CD36 (результаты попарного анализа представлены на рисунке 2).

Также было установлено увеличение количества промежуточных ($p = 0,022$; $p_{1,4} = 0,034$) и неклассических ($p = 0,002$; $p_{1,4} = 0,035$) моноцитов, экспрессирующих TLR2. При оценке соотношения количества M1- и M2-моноцитов в зависимости от уровня HMGB1 были установлены разнонаправленные изменения – увеличение M1-моноцитов ($p < 0,0001$) и снижение M2-моноцитов ($p < 0,0001$; результаты попарного сравнения представлены на рисунке 3).

При анализе содержания исследуемых сывороточных маркеров системного воспаления в зависимости от концентрации HMGB1 было выявлено отсутствие статистически значимых изменений в cCRP ($p = 0,365$), TNF α ($p = 0,728$) и

IL-6 ($p = 0,874$). С другой стороны, концентрация IL-1 β статистически значимо возростала от $Q_{0,25}$ до $Q_{0,75}$ ($p = 0,015$; результаты попарного сравнения представлены на рисунке 4).

По данным корреляционного анализа было установлено, что концентрация IL-1 β прямо коррелировала с количеством M1-моноцитов ($r = 0,268$; $p = 0,035$) и обратно – с количеством M2-моноцитов ($r = -0,376$; $p = 0,003$).

Обсуждение

В настоящее время одним из основных механизмов, ответственных за поддержание хронического воспаления на всех этапах атерогенеза, считается активация оси «IL-1 β – IL-6 – cCRP» [20]. В реальной клинической практике с целью оценки резидуального воспалительного риска реко-

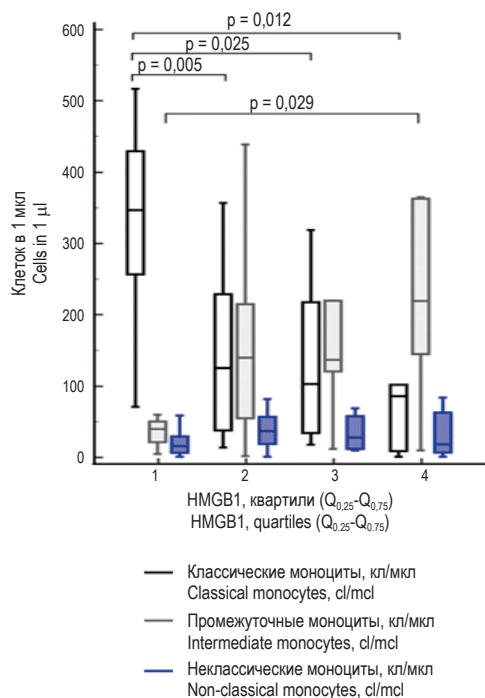


Рисунок 1. Количество классических, промежуточных и неклассических моноцитов в зависимости от концентрации HMGB1

Figure 1. Number of classical, intermediate, and non-classical monocytes as a function of HMGB1 concentration

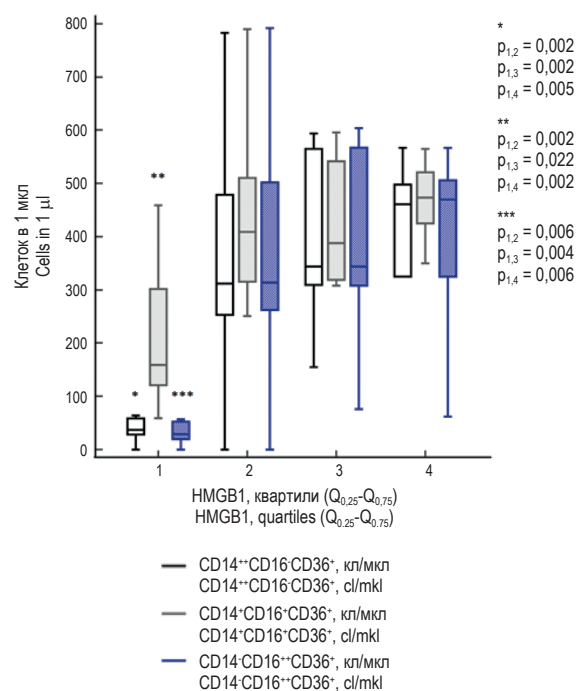


Рисунок 2. Количество классических, промежуточных и неклассических моноцитов, экспрессирующих CD36, в зависимости от концентрации HMGB1

Figure 2. Number of classical, intermediate, and non-classical monocytes expressing CD36 as a function of HMGB1 concentration

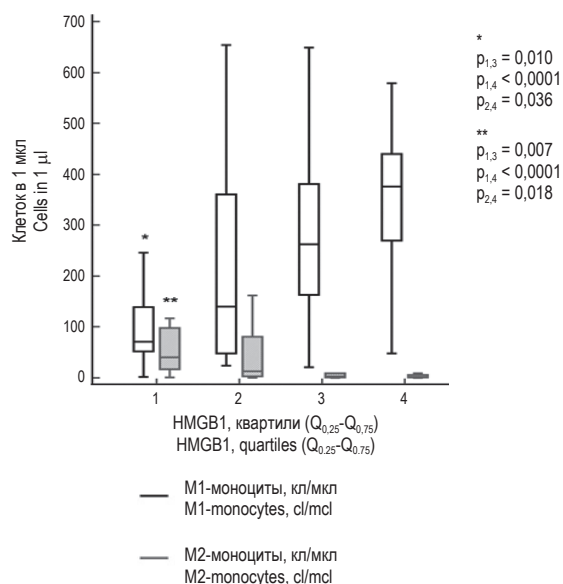


Рисунок 3. Количество M1- и M2-моноцитов в зависимости от концентрации HMGB1

Figure 3. Number of M1 and M2 monocytes as a function of HMGB1 concentration

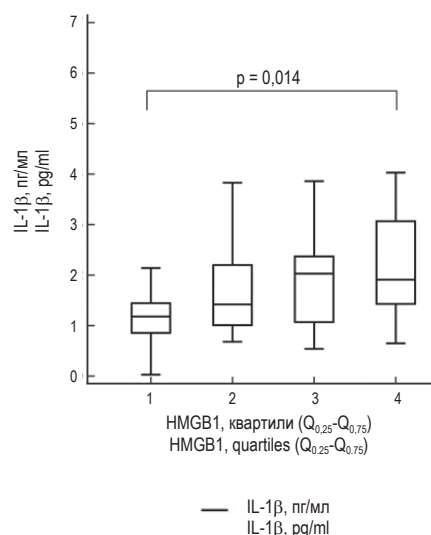


Рисунок 4. Концентрация IL-1β в зависимости от концентрации HMGB1

Figure 4. IL-1β concentration as a function of HMGB1 concentration

мендовано использование единственного маркера — высокочувствительного С-реактивного белка [4]. Однако, перспективы появления новых диагностических биомаркеров и терапевтических мишеней главным образом связаны с оценкой более «проксимальных» (upstream) сегментов оси «IL-1 β — IL-6 — СРБ», в том числе DAMP, которые являются триггерами воспалительного ответа и активаторами инфламмасом [19, 23, 39]. По мнению ряда исследователей, HMGB1 представляет собой один из наиболее вероятных новых биомаркеров воспаления, который в ближайшее время будет одобрен FDA для применения в клинической практике [30].

Основные результаты представленного исследования: 1) увеличение концентрации HMGB1 в сыворотке крови пациентов с субклиническим атеросклерозом ассоциировалось с уменьшением количества классических и М2-моноцитов, и увеличением — промежуточных и М1-моноцитов; 2) увеличение HMGB1 в сыворотке крови ассоциировалось с увеличением количества промежуточных и неклассических моноцитов, экспрессирующих CD36 и TLR2; 3) уровень IL-1 β прямо коррелировал с концентрацией HMGB1 и количеством М1-моноцитов.

В последние несколько лет в ряде исследований было установлено, что по мере развития и прогрессирования атеросклеротических сердечно-сосудистых заболеваний наблюдается сдвиг в субпопуляционном составе циркулирующих моноцитов в сторону CD16⁺ клеток, т.е. увеличение доли и абсолютного количества промежуточных и неклассических моноцитов [10, 32]. Промежуточные моноциты в сравнении с моноцитами других субпопуляций являются основными продуцентами IL-1 β , IL-6 и TNF α , обладают наибольшей способностью к трансэндотелиальной миграции и образованию активных форм кислорода [8, 34]. Наблюдаемое нами увеличение количества моноцитов, экспрессирующих CD36 и TLR2, по мере увеличения содержания HMGB1 также может свидетельствовать об активации преимущественно CD16⁺ моноцитов [15, 28].

При этом увеличение HMGB1 может быть связано с его активной секрецией циркулирующими моноцитами и таким образом может репрезентировать их активацию [36, 37]. С другой стороны, источником HMGB1 в системном кровотоке при атеросклерозе также могут служить эндотелиоциты, гладкомышечные клетки, активированные тромбоциты, и т.д. [31]. Однако HMGB1, помимо маркера активации моноцитов и других клеток врожденного и адаптивного иммунитета, является непосредственно индуктором воспаления и активатором оси «IL-1 β — IL-6 —

СРБ» через лиганд-рецепторное взаимодействие с CD36-TLR2/4-TLR6 комплексом [29]. Это подтверждается статистически значимым возрастанием концентрации IL-1 β по мере увеличения содержания HMGB1.

Уровень IL-1 β прямо коррелировал с количеством М1-моноцитов, число которых также нарастало по мере увеличения содержания HMGB1, в то время как число М2-моноцитов — снижалось. В настоящее время общепринята концепция поляризации макрофагов на несколько подтипов, различающихся профилем клеточных маркеров и биологических функций [22]. Поляризация фенотипа моноцитов-предшественников макрофагов может происходить еще в кровотоке, что делает возможной их оценку методом проточной цитометрии [6]. Изменение соотношения М1- и М2-моноцитов в сторону увеличения М1-моноцитов было установлено при различных хронических воспалительных заболеваниях и в том числе при атеросклеротических сердечно-сосудистых заболеваниях [18, 33]. В исследовании F. Schaper et al., включавшем пациентов с системной красной волчанкой, было показано, что HMGB1 способствует поляризации М2-макрофагов в М1-макрофаги с высокой экспрессией мРНК IL-6 и TNF α [25]. На экспериментальной модели аутоиммунного миокардита также было установлено репрограммирование клеток в сторону М1-макрофагов путем активации пути TLR4-PI3K-Erk1/2 под действием HMGB1 [26]. Ингибирование HMGB1 в свою очередь способно снизить количество провоспалительных макрофагов [12, 38]. Все это может свидетельствовать в пользу того, что HMGB1 является одним из каузальных факторов обнаруженных нами изменений в субпопуляционном составе моноцитов.

Таким образом, у пациентов с субклиническим атеросклерозом увеличение концентрации HMGB1 в сыворотке крови связано с потенциально проатерогенными изменениями субпопуляционного состава моноцитов и активацией DAMP-сигналинга [24].

Заключение

Увеличение концентрации HMGB1 в сыворотке крови пациентов с субклиническим атеросклерозом ассоциировалось с уменьшением количества классических и М2-моноцитов, и увеличением — промежуточных и М1-моноцитов, а также с увеличением количества промежуточных и неклассических моноцитов, экспрессирующих CD36 и TLR2. Уровень IL-1 β прямо коррелировал с концентрацией HMGB1 и количеством М1-моноцитов.

Список литературы / References

1. Артемьева О.В., Ганковская Л.В. Воспалительное старение как основа возраст-ассоциированной патологии // Медицинская иммунология, 2020. Т. 22, № 3. С. 419-432. [Artemyeva O.V., Gankovskaya L.V. Inflammaging as the basis of age-associated diseases. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2020, Vol. 22, no. 3, pp. 419-432. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-IAT-1938.
2. Гусев Е.Ю., Зотова Н.В., Журавлева Ю.А., Черешнев В.А. Физиологическая и патогенетическая роль рецепторов-мусорщиков у человека // Медицинская иммунология, 2020. Т. 22, № 1. С. 7-48. [Gusev E.Yu., Zotova N.V., Zhuravleva Yu.A., Chereshev V.A. Physiological and pathogenetic role of litter receptors in humans. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2020, Vol. 22, no. 1, pp. 7-48. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-PAP-189.
3. Козлова А.Л., Валиева М.Е., Малюченко Н.В., Студитский В.М. HMGB-белки как ДНК-шапероны, модулирующие активность хроматина // Молекулярная биология, 2018. Т. 52, № 5. С. 737-749. [Kozlova A.L., Valieva M.E., Malyuchenko N.V., Studitsky V.M. HMGB proteins as DNA chaperones that modulate chromatin activity. *Molekulyarnaya biologiya = Molecular Biology*, 2018, Vol. 52, no. 5, pp. 737-749. (In Russ.)]
4. Кухарчук В.В., Ежов М.В., Сергиенко И.В., Арабидзе Г.Г., Бубнова М.Г., Балахонова Т.В., Гуревич В.С., Качковский М.А., Коновалов Г.А., Константинов В.О., Малышев П.П., Покровский С.Д., Соколов А.А., Сумароков А.Б., Горнякова Н.Б., Обрезан А.Г., Шапошник И.И. Диагностика и коррекция нарушений липидного обмена с целью профилактики и лечения атеросклероза. российские рекомендации, VII пересмотр // Атеросклероз и дислипидемии, 2020. Т. 38, № 1. С. 7-40. [Kukharchuk V.V., Ezhov M.V., Sergienko I.V., Arabidze G.G., Bubnova M.G., Balakhonova T.V., Gurevich V.S., Kachkovsky M.A., Konovalov G.A., Konstantinov V.O., Malyshev P.P., Pokrovsky S.D., Sokolov A.A., Sumarokov A.B., Gornyakova N.B., Obrezan A.G., Shaposhnik I.I. Diagnosis and correction of lipid metabolism disorders to prevent and treat atherosclerosis. russian recommendations, VII revision. *Ateroskleroz i dislipidemii = Atherosclerosis and Dyslipidemia*, 2020, Vol. 38, no. 1, pp. 7-40. (In Russ.)]
5. Чихиржина Е.В., Поляничко А.М., Старкова Т.Ю. Внеядерные функции негистонового белка HMGB1 // Цитология, 2020. Т. 62, № 10. С. 716-725. [Chikhirzhina E.V., Polyanchko A.M., Starkova T.Yu. Extra-nuclear functions of the non-histone protein HMGB1. *Tsitologiya = Cytology*, Vol. 62, no. 1, pp. 7-40. (In Russ.)]
6. Чурина Е.Г., Уразова О.И., Ситникова А.В., Новицкий В.В., Кононова Т.Е., Чумакова С.П., Патышева М.Р. Дифференцировка моноцитов крови и особенности цитокинового статуса у больных туберкулезом легких. // Патологическая физиология и экспериментальная терапия, 2020. Т. 64, № 4. С. 79-87. [Churina E.G., Urazova O.I., Sitnikova A.V., Novitsky V.V., Kononova T.E., Chumakova S.P., Patysheva M.R. Blood monocyte differentiation and cytokine status in patients with pulmonary tuberculosis. *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimentalnaya terapiya = Pathological Physiology and Experimental Therapy*, 2020, Vol. 64, no. 4, pp. 79-87. (In Russ.)]
7. Andrassy M., Volz H.C., Maack B., Schuessler A., Gitsioudis G., Hofmann N., Laohachewin D., Wienbrandt A.R., Kaya Z., Bierhaus A., Giannitsis E., Katus H.A., Korosoglou G. HMGB1 is associated with atherosclerotic plaque composition and burden in patients with stable coronary artery disease. *PLoS One*, 2012, Vol. 7, no. 12, e52081. doi: 10.1371/journal.pone.0052081.
8. Aw N.H., Canetti E., Suzuki K., Goh J. Monocyte Subsets in Atherosclerosis and Modification with Exercise in Humans. *Antioxidants (Basel)*, 2018, Vol. 19, no. 7 (12), 196. doi: 10.3390/antiox7120196.
9. Benlier N., Erdoğan M.B., Keçioğlu S., Orhan N., Çiçek H. Association of high mobility group box 1 protein with coronary artery disease. *Asian Cardiovasc. Thorac. Ann.*, 2019, Vol. 27, no. 4, pp. 251-255.
10. Cappellari R., D'Anna M., Bonora B.M., Rigato M., Cignarella A., Avogaro A., Fadini G.P. Shift of monocyte subsets along their continuum predicts cardiovascular outcomes. *Atherosclerosis*, 2017, Vol. 266, pp. 95-102.
11. Ding J.W., Luo C.Y., Wang X.A., Zhou T., Zheng X.X., Zhang Z.Q., Yu B., Zhang J., Tong X.H. Glycyrrhizin, a High-Mobility Group Box 1 Inhibitor, Improves Lipid Metabolism and Suppresses Vascular Inflammation in Apolipoprotein E Knockout Mice. *J. Vasc. Res.*, 2018, Vol. 55, no. 6, pp. 365-377.
12. Fan H., Tang H.B., Chen Z., Wang H.Q., Zhang L., Jiang Y., Li T., Yang C.F., Wang X.Y., Li X., Wu S.X., Zhang G.L. Inhibiting HMGB1-RAGE axis prevents pro-inflammatory macrophages/microglia polarization and affords neuroprotection after spinal cord injury. *J. Neuroinflamm.*, 2020, Vol. 17, no. 1, 295. doi: 10.1186/s12974-020-01973-4.
13. Giovannini S., Tinelli G., Biscetti F., Straface G., Angelini F., Pitocco D., Mucci L., Landolfi R., Flex A. Serum high mobility group box-1 and osteoprotegerin levels are associated with peripheral arterial disease and critical limb ischemia in type 2 diabetic subjects. *Cardiovasc. Diabetol.*, 2017, Vol. 16, no. 1, 99. doi: 10.1186/s12933-017-0581-z.

14. Gu H.F., Li N., Xu Z.Q., Hu L., Li H., Zhang R.J., Chen R.M., Zheng X.L., Tang Y.L., Liao D.F. Chronic Unpredictable Mild Stress Promotes Atherosclerosis via HMGB1/TLR4-Mediated Downregulation of PPAR γ /LXR α /ABCA1 in ApoE $^{-/-}$ Mice. *Front. Physiol.*, 2019, Vol. 10, 165. DOI: 10.3389/fphys.2019.00165.
15. Huang R., Hu Z., Chen X., Cao Y., Li H., Zhang H., Li Y., Liang L., Feng Y., Wang Y., Su W., Kong Z., Melgiri N.D., Jiang L., Li X., Du J., Chen Y. The Transcription Factor SUB1 Is a Master Regulator of the Macrophage TLR Response in Atherosclerosis. *Adv. Sci. (Weinh)*, 2021, Vol. 8, no. 19, e2004162. doi: 10.1002/advs.202004162.
16. Jaén R.I., Val-Blasco A., Prieto P., Gil-Fernández M., Smani T., López-Sendón J.L., Delgado C., Boscá L., Fernández-Velasco M. Innate Immune Receptors, Key Actors in Cardiovascular Diseases. *JACC Basic Transl. Sci.*, 2020, Vol. 5, no. 7, pp. 735-749.
17. Kanellakis P., Agrotis A., Kyaw T.S., Koulis C., Ahrens I., Mori S., Takahashi H.K., Liu K., Peter K., Nishibori M., Bobik A. High-mobility group box protein 1 neutralization reduces development of diet-induced atherosclerosis in apolipoprotein e-deficient mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 2011, Vol. 31, no. 2, pp. 313-319.
18. Ley K. M1 Means Kill; M2 Means Heal. *J. Immunol.*, 2017, Vol. 199, no. 7, pp. 2191-2193.
19. Li Y., Zhang Y., Lu J., Yin Y., Xie J., Xu B. Anti-inflammatory mechanisms and research progress of colchicine in atherosclerotic therapy. *J. Cell Mol. Med.*, 2021, Vol. 25, no. 17, pp. 8087-8094.
20. Libby P., Hansson G.K. From focal lipid storage to systemic inflammation: JACC review topic of the week. *J. Am. Coll. Cardiol.*, 2019, Vol. 74, no. 12, pp. 1594-1607.
21. Malekmohammad K., Bezsonov E.E., Rafeian-Kopaei M. Role of lipid accumulation and inflammation in atherosclerosis: focus on molecular and cellular mechanisms. *Front. Cardiovasc. Med.*, 2021, Vol. 8, 707529. doi: 10.3389/fcvm.2021.707529.
22. Orekhov A.N., Orekhova V.A., Nikiforov N.G., Myasoedova V.A., Grechko A.V., Romanenko E.B., Zhang D., Chistiakov D.A. Monocyte differentiation and macrophage polarization. *Vessel Plus*, 2019, Vol. 3, 10. doi: 10.20517/2574-1209.2019.04.
23. Ridker P.M. From C-reactive protein to interleukin-6 to interleukin-1: moving upstream to identify novel targets for atheroprotection. *Circ. Res.*, 2016, Vol. 118, no. 1, pp. 145-156.
24. Roh J.S., Sohn D.H. Damage-Associated Molecular Patterns in Inflammatory Diseases. *Immune Netw.*, 2018, Vol. 18, no. 4, e27. doi: 10.4110/in.2018.18.e27.
25. Schaper F., de Leeuw K., Horst G., Bootsma H., Limburg P.C., Heeringa P., Bijl M., Westra J. High mobility group box 1 skews macrophage polarization and negatively influences phagocytosis of apoptotic cells. *Rheumatology (Oxford)*, 2016, Vol. 55, no. 12, pp. 2260-2270.
26. Su Z., Zhang P., Yu Y., Lu H., Liu Y., Ni P., Su X., Wang D., Liu Y., Wang J., Shen H., Xu W., Xu H. HMGB1 facilitated macrophage reprogramming towards a proinflammatory m1-like phenotype in experimental autoimmune myocarditis development. *Sci. Rep.*, 2016, Vol. 6, 21884. doi: 10.1038/srep21884.
27. Tabas I., Lichtman A.H. Monocyte-macrophages and T cells in atherosclerosis. *Immunity*, 2017, Vol. 47, no. 4, pp. 621-634.
28. Torres-Ruiz J., Carrillo-Vazquez D.A., Padilla-Ortiz D.M., R. Vazquez-Rodriguez, Nuñez-Alvarez C., Juarez-Vega G., Gomez-Martin D. TLR expression in peripheral monocyte subsets of patients with idiopathic inflammatory myopathies: association with clinical and immunological features. *J. Transl. Med.*, 2020, Vol. 18, no. 1, 125. doi: 10.1186/s12967-020-02290-3.
29. Truong R., Thankam F.G., Agrawal D.K. Immunological mechanisms underlying sterile inflammation in the pathogenesis of atherosclerosis: potential sites for intervention. *Expert Rev. Clin. Immunol.*, 2021, Vol. 17, no. 1, pp. 37-50.
30. van Patten S., Al-Abed Y. High Mobility Group Box-1 (HMGB1): Current wisdom and advancement as a potential drug target. *J. Med. Chem.*, 2018, Vol. 61, no. 12, pp. 5093-5107.
31. Wahid A., Chen W., Wang X., Tang X. High-mobility group box 1 serves as an inflammation driver of cardiovascular disease. *Biomed. Pharmacother.*, 2021, Vol. 139, 111555. doi: 10.1016/j.biopha.2021.111555.
32. Wildgruber M., Aschenbrenner T., Wendorff H., Czubba M., Glinzer A., Haller B., Schiemann M., Zimmermann A., Berger H., Eckstein H.H., Meier R., Wohlgemuth W.A., Libby P., Zerneck A. The "Intermediate" CD14 $^{++}$ CD16 $^{+}$ monocyte subset increases in severe peripheral artery disease in humans. *Sci. Rep.*, 2016, Vol. 6, 39483. doi: 10.1038/srep39483.
33. Williams H., Cassorla G., Pertsoulis N., Patel V., Vicaretti M., Marmash N., Hitos K., Fletcher J.P., Medbury H.J. Human classical monocytes display unbalanced M1/M2 phenotype with increased atherosclerotic risk and presence of disease. *Int. Angiol.*, 2017, Vol. 36, no. 2, pp. 145-155.
34. Williams H., Mack C.D., Li S.C.H., Fletcher J.P., Medbury H.J. Nature versus number: monocytes in cardiovascular disease. *Int. J. Mol. Sci.*, 2021, Vol. 22, no. 17, 9119. doi: 10.3390/ijms22179119.
35. Wolf D., Ley K. Immunity and inflammation in atherosclerosis. *Circ. Res.*, 2019, Vol. 124, no. 2, pp. 315-327.

36. Zeng J.C., Xiang W.Y., Lin D.Z., Zhang J.A., Liu G.B., Kong B., Gao Y.C., Lu Y.B., Wu X.J., Yi L.L., Zhong J.X., Xu J.F. Elevated HMGB1-related interleukin-6 is associated with dynamic responses of monocytes in patients with active pulmonary tuberculosis. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.*, 2015, Vol. 8, no. 2, pp. 1341-1353.
37. Zhang J., Zhang L., Zhang S., Yu Q., Xiong F., Huang K., Wang C.Y., Yang P. HMGB1, an innate alarmin, plays a critical role in chronic inflammation of adipose tissue in obesity. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 2017, Vol. 454, pp. 103-111.
38. Zhao F., Guo Z., Hou F., Fan W., Wu B., Qian Z. Magnoflorine Alleviates "M1" polarized macrophage-induced intervertebral disc degeneration through repressing the HMGB1/Myd88/NF- κ B Pathway and NLRP3 inflammasome. *Front. Pharmacol.*, 2021, Vol. 12, 701087. doi: 10.3389/fphar.2021.701087.
39. Zheng D., Liwinski T., Elinav E. Inflammasome activation and regulation: toward a better understanding of complex mechanisms. *Cell Discov.*, 2020, Vol. 6, 36. doi: 10.1038/s41421-020-0167-x.

Авторы:

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

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

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

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

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

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

Authors:

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

Dolgushin I.I., PhD, MD (Medicine), Professor, Corresponding Member, Russian Academy of Sciences, Honored Worker of Science of the Russian Federation, President of South-Ural State Medical University, Head of the Department of Microbiology, Virology, Immunology, South-Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russian Federation

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Поступила 24.04.2022
Принята к печати 22.05.2022

Received 24.04.2022
Accepted 22.05.2022

ВЛИЯНИЕ РАЦИОНА ПИТАНИЯ НА РЕОЛОГИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ КРОВИ, КОНЦЕНТРАЦИЮ ЦИТОКИНОВ И РАЗВИТИЕ МЕТАБОЛИЧЕСКИХ НАРУШЕНИЙ У ЛИЦ С ПОВЫШЕННЫМ ИНДЕКСОМ МАССЫ ТЕЛА

Новиков П.С.¹, Черевко Н.А.¹, Климов В.В.¹, Кондаков С.Э.²,
Розенштейн М.Ю.³, Розенштейн А.З.³, Мотлохова Е.А.¹, Загрешенко Д.С.⁴

¹ ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Томск, Россия

² ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», Москва, Россия

³ IttinoHealth-РУС, Москва, Россия

⁴ Новокузнецкий государственный институт усовершенствования врачей, г. Новокузнецк, Кемеровская обл., Россия

Резюме. Метаболический синдром представляет собой серьезную медико-социальную проблему в связи с высокой распространенностью, отсутствием единых подходов к диагностике и лечению. Несомненный научный интерес вызывает исключение реакций пищевой дезадаптации и изучение механизмов контроля иммунной толерантности к пищевым антигенам как одного из доступных противовоспалительных инструментов коррекции повышенной проницаемости эпителия кишечника и эндотелия сосудов, связанного с развитием метаболического синдрома.

Пищевая дезадаптация — это несоответствие рациона питания человека, опосредованного гено-фенотипическими особенностями пищеварительных ферментов и контролем иммунной системы за эффективным пищеварением.

Иммунологический контроль пищеварения, включая динамическое сохранение толерантности к пищевым антигенам, осуществляется на двух уровнях организации иммунной системы: врожденной с функциональным участием микробиоты и адаптивной, представленной клеточно-гуморальными механизмами, связанными с молекулярными эпитопами и критической массой персистирующих пищевых антигенов, оказавшихся в иммунологических компетентных зонах тонкого кишечника в результате изменения проницаемости кишечного барьера и процессов транцитоза.

С целью оценки вклада рациона питания в иммуно-биохимический и реологический дисбаланс у лиц с повышенной массой тела обследовано 170 добровольцев обоего пола в возрасте 20-55 лет в зависимости от индекса массы тела: более 27,0 кг/м² (клиническая группа, n = 120) и не более 25,0 кг/м² (контрольная группа, n = 50). Выявлено статистически значимое повышение концентрации IL-6, IL-17, холестерина, глюкозы, гликозилированного гемоглобина, инсулина, индексов инсулинорезистентности и атерогенности, а также специфических IgG к ряду пищевых антигенов для испытуемых в клинической группе. В ходе исследования нами были выявлены статистически достоверные связи между общим количеством тромбоцитов ($p < 0,05$; $r = 0,213$), эритроцитов ($p < 0,05$; $r = -0,211$), средним объемом эритроцита (MCV) ($p < 0,05$; $r = 0,339$) и концентрацией IgG к казеину в крови, а также между концентрацией sIgG к сое и количеством тромбоцитов ($p < 0,05$; $r = 0,231$).

Адрес для переписки:

Новиков Павел Сергеевич
ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ
634055, Россия, г. Томск, Московский тракт, 2.
Тел.: 8 (913) 106-88-77.
E-mail: Pavel.N1234@yandex.ru

Address for correspondence:

Novikov Pavel S.
Siberian State Medical University
634061, Russian Federation, Tomsk, Moscow tract, 2.
Phone: 7 (913) 106-88-77.
E-mail: Pavel.N1234@yandex.ru

Образец цитирования:

П.С. Новиков, Н.А. Черевко, В.В. Климов, С.Э. Кондаков, М.Ю. Розенштейн, А.З. Розенштейн, Е.А. Мотлохова, Д.С. Загрешенко «Влияние рациона питания на реологические показатели крови, концентрацию цитокинов и развитие метаболических нарушений у лиц с повышенным индексом массы тела» // Медицинская иммунология, 2022. Т. 24, № 4. С. 821-830. doi: 10.15789/1563-0625-EOD-2474
© Новиков П.С. и соавт., 2022

For citation:

P.S. Novikov, N.A. Cherevko, V.V. Klimov, S.E. Kondakov, M.Yu. Rozenshteyn, A.Z. Rozenshteyn, E.A. Motlokhova, D.S. Zagreshenko "Effects of diet on blood rheological indices, cytokine concentrations, and emergence of metabolic disorders in the persons with increased body mass index", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2022, Vol. 24, no. 4, pp. 821-830. doi: 10.15789/1563-0625-EOD-2474
DOI: 10.15789/1563-0625-EOD-2474

При этом была найдена взаимосвязь между установленными значениями IgG к пАГ казеина и риском развития атерогенных изменений (индекс атерогенности > 3) при OR = 2,68 (1,33-5,42), а также показателями IgG к пАГ казеина (OR = 8,9 (2,6-30,5)), пАГ сои (OR = 5,6 (1,8-16,7)), пАГ глютена ((F = 0,00359. $p < 0,05$) и повышенным индексом массы тела.

Полученные результаты были интерпретированы как возможный срыв пищевой толерантности к ряду пищевых антигенов у лиц с высоким индексом массы тела в связи с подтверждаемым наличием корреляций между концентрацией IgG к пищевым антигенам, дисбалансом провоспалительных цитокинов, реологических и метаболических показателей. Эти данные могут служить биомаркерами риска начала метаболического синдрома.

Ключевые слова: пищевые антигены, пищевая толерантность, метаболический синдром, воспаление, реология крови, гиперреактивность к пищевым антигенам

EFFECTS OF DIET ON BLOOD RHEOLOGICAL INDICES, CYTOKINE CONCENTRATIONS, AND EMERGENCE OF METABOLIC DISORDERS IN THE PERSONS WITH INCREASED BODY MASS INDEX

Novikov P.S.^a, Cherevko N.A.^a, Klimov V.V.^a, Kondakov S.E.^b,
Rozenshteyn M.Yu.^c, Rozenshteyn A.Z.^c, Motlokhova E.A.^a,
Zagreshenko D.S.^d

^a Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation

^b Lomonosov State University, Moscow, Russian Federation

^c ImmunoHealth-RUS, Moscow, Russian Federation

^d Novokuznetsk State Institute of Postgraduate Medical Education, Novokuznetsk, Kemerovo Region, Russian Federation

Abstract. Metabolic syndrome (MS) is a serious medical and social problem due to its high prevalence, lack of common approaches to diagnosis and treatment. Prevention of food dysadaptation reactions and the studies of control mechanisms of immune tolerance to food antigens is of special scientific interest, thus providing available anti-inflammatory tools for correcting increased permeability of the intestinal epithelium and vascular endothelium associated with development of MS. Nutritional dysadaptation occurs due to inappropriate diet being mediated by the geno-phenotypic characteristics of digestive enzymes and immune system which control the efficiency of food digestion.

Immunological control of digestion, including dynamic maintenance of tolerance to food antigens, is carried out at two levels of immune system: innate response with functional involvement of microbiota, and adaptive response, represented by cellular and humoral mechanisms associated with molecular epitopes and critical mass of persistent food antigens which are present in immunologically competent areas of small intestine, due to changing permeability of intestinal barrier and transcytosis processes. Patients and methods: aiming for assessment of the diet contribution to the immuno-biochemical and rheological imbalance in people with increased body weight, 170 volunteers of both sexes aged 20-55 years were examined, depending on the body mass index: $> 27.0 \text{ kg/m}^2$ (clinical group, $n = 120$), and those with BMI of $< 25.0 \text{ kg/m}^2$ (control group, $n = 50$). We have revealed statistically significant increase of multiple parameters in the clinical group, i.e., concentration of IL-6, IL-17, cholesterol, glucose, glycosylated hemoglobin, insulin, indices of insulin resistance and atherogenicity. Increased levels of specific IgG antibodies to a number of food antigens were found in the subjects in the clinical group. In the course of our study, a statistically significant relationships was found between total numbers of platelets ($p < 0.05$; $r = 0.213$), erythrocytes ($p < 0.05$; $r = -0.211$), mean erythrocyte volume (MCV) ($p < 0, 05$; $r = 0.339$), and the concentration of IgG to casein in the blood, as well as a correlation between the levels of sIgG to soybeans and the number of platelets ($p < 0.05$; $r = 0.231$). At the same time, some associations were found between the established values of IgG to casein pAG, and the risk of developing atherogenic changes (atherogenicity index > 3) being significant at OR = 2.68 (1.33-5.42), as well as between IgG values to casein pAG (OR = 8.9 (2.6-30.5)), to soybean pAG (OR = 5.6 (1.8-16.7)), to gluten pAG ((F = 0.00359. $p < 0.05$), and increased body mass index.

The results obtained were interpreted as a possible impairment of food tolerance for a number of food antigens in individuals with high body mass index, due to the revealed correlations between concentrations of IgG to food antigens, imbalance of pro-inflammatory cytokines, rheological and metabolic parameters. These data may be used as biomarkers suggesting higher risk of evolving metabolic syndrome.

Keywords: food antigens, food tolerance, metabolic syndrome, inflammation, blood rheology, hyperreactivity

Введение

Пищевая толерантность — это динамический процесс подавления иммунного ответа, при пероральном поступлении пищевых антигенов (ПАГ) в ЖКТ [25]. В процессе пищеварения участвуют ферменты, толерогенная кишечная микробиота и ее метаболиты (короткоцепочные жирные кислоты, триптофан, витамины) [18, 23] и механизмы врожденного и адаптивного иммунитета. Эффективный контроль адаптивной иммунной системы за процессами пищеварения инициируется как результат представления эпитопов ПАГ клетками кишечного эпителиального барьера, такими как М-клетки и клетки Лангерганса, распознавания лимфоцитами и после последующего сигналинга синтеза sIgA, а также как результат функционирования толерогенных дендритных клеток (TDC), антигенспецифических регуляторных Т-клеток (pTreg) и их субпопуляций (Tr1, Th3) [16, 22, 24].

Однако поддержание пищевой толерантности зависит от количества поступающих ПАГ, итогов полостного, пристеночного и внутриклеточного пищеварения, а главное — состояния проницаемости презептального и эпителиального барьеров желудочно-кишечного тракта [2, 8, 13]. Также толерантность поддерживается иммуносупрессивными нейротрансмиссерами, нейрорепептидами и цитокинами, которые в избытке продуцируются энтеральной нервной системой, микробиотой, TDC и pTreg [17, 20]. Среди TDC в желудочно-кишечном тракте присутствует уникальная субпопуляция CD103⁺, CD11b⁺ клеток, представленная только здесь [14]. Большое значение имеют также три группы М2-макрофагов эпителия, гладкомышечного слоя и lamina propria [12]. В норме классическое соотношение pTreg/Th17 благоприятно для поддержания пищевой толерантности, которая может быть определена как «низкодозовая толерантность» к ПАГ

IgE-независимый фенотип пищевой аллергии описан [10]. У лиц без атопической конституции, в условиях изменений качественных и количественных характеристик ПАГ в пищевом рационе, дисбаланса микробиоты, нарушенного эпителиального барьера происходит срыв пищевой толерантности и включение В-клеточного ответа с синтезом специфических IgG к ПАГ, последующим образованием циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК). Процесс выведения ПАГ в составе ЦИК сопровождается активацией систем комплемента и фагоцитоза, изменениями баланса цитокинов, усилением проницаемости эндотелия кровеносных и лимфатических сосудов, нагрузкой на системы детоксикации организма в печени, легких, селезенке, кожи, а также жировой ткани, где и депонируются основные не элиминированные ЦИК [11, 19]. В элиминации ЦИК также принимают участие эритроциты и тромбоциты, что при нарушениях вязкости крови, гиперосмолярности за счет гиперглике-

мии, усугубляет положение [9]. Кроме того, некая «критическая масса» недорасщепленных до мономеров ПАГ, попадающая в постоянном избытке в дистальные отделы тонкого кишечника, распознается паттерн-распознающими рецепторами (PRR), что приводит к активации реакций врожденного иммунитета в дополнение к вовлечению комплемента и фагоцитоза вследствие иммунокомплексных расстройств [8].

Таким образом, пищевая толерантность зависит от адекватности пищевого рациона индивидуума, что влияет на поддержание толерогенной микробиоты, воспроизведение собственной энергии, обновление клеток и тканей, а также синергичную работу всех перечисленных механизмов эффективной утилизации ПАГ. При срыве пищевой толерантности при вышеперечисленных факторах развивается пищевая дезадаптация, которая по нашей гипотезе приводит к персистирующему синтезу специфических антител класса IgG к ПАГ, иммунокомплексным расстройствам, ремоделированию стенок сосудов, метаболическим и реологическим нарушениям, которые, как известно, лежат в основе метаболического синдрома [5, 21].

Целью данной работы является оценка вклада рациона питания в иммуно-биохимический и реологический дисбаланс у лиц с повышенной массой тела.

Материалы и методы

В исследовании участвовали добровольцы. Все волонтеры подписывали информированное согласие для исследований, заполняли специальные анкеты, проходили взвешивание, получали клиническую консультацию врача — аллерголога-иммунолога.

Материалом исследования являлась сыворотка крови, взятая из локтевой вены. Все исследованные лица (n = 170) были в возрасте 20–55 лет и разделялись на клиническую (n = 120) и контрольную (n = 50) группы. В клинической группе женщины (n = 60) и мужчины (n = 60) имели одинаковый критерий для индекса массы тела (ИМТ) > 27. У женщин окружность талии была более 80 см, а у мужчин — более 94 см. Индекс массы тела более 27,0 кг/м³ был принят, как основной критерий для клинической группы в связи имеющимся данными исследований, свидетельствующими о том, что у лиц с ИМТ > 27 кг/м³ отмечается заметный рост частоты развития гипертонической болезни, болезней сердца и сахарного диабета 2-го типа, осложняющимися метаболическим синдромом (МС) [1].

Критериями включения в клиническую группу (ИМТ > 27 кг/м³) являлись:

- возраст от 20 до 55 лет;
- ИМТ > 27,0 кг/м³;
- длина окружности талии у женщин — более 80 см, у мужчин — более 94 см.

Критерии исключения из клинической группы:

— наличие в анамнезе диагностированных онкологических, аллергических и аутоиммунных заболеваний;

— отсутствие подписанного информированного согласия на участие в исследовании и заполненных анкет.

Возраст женщин в клинической группе составил 39 (33-48) лет, мужчин — 39 (30-46) лет. ИМТ у женщин был 31,2 (29,1-35,8) кг/м³, у мужчин — 31,0 (28,1-35,6) кг/м³.

Критерии включения в контрольную группу:

— возраст 20-55 лет;

— значение ИМТ — от 18,5 до 25,0 кг/м³.

Критерии исключения из контрольной группы:

— наличие онкологических, аллергических, аутоиммунных и желудочно-кишечных заболеваний в анамнезе;

— отсутствие подписанного информированного согласия и заполненных анкет.

Возраст женщин в контрольной группе составил 28 (23-40) лет, мужчин — 33 (26-45) лет. ИМТ у женщин был 21,0 (20,3-22,3) кг/м³, у мужчин — 23,4 (22,5-24,5) кг/м³.

Методом многокомпонентного иммуноферментного анализа (ИФА) измерялись концентрации специфических иммуноглобулинов класса G (sIgG) в сыворотке крови к 111 пищевым антигенам (пАГ) по методологии Иммунохелс (РЗН 2020/9970) [6]. В работе использовали коммерческую тест-систему — изготовленный по специальному заказу набор реактивов для проведения научно-исследовательских и учебных работ (ТУ 7711-001-71112115-2019) производства ООО «Иммуновет» (Москва). Также методом ИФА с использованием наборов «Вектор-Бест» (г. Новосибирск) определялось содержание в сыворотке крови IL-4, IL-6, IL-10, IL-17.

Одновременно проводилось исследование концентраций ряда биохимических параметров: холестерина (ХС), триглицеридов, липопротеинов высокой плотности (ХС-ЛПВП), липопротеинов низкой плотности (ХС-ЛПНП), аланинаминотрансферазы (АлАТ), аспартатаминотрансферазы (АсАТ), щелочной фосфатазы, общего билирубина, альбумина, креатинина. С этой целью использовался биохимический анализатор ACCENT-200 и диагностические наборы «Вектор-Бест» (г. Новосибирск). Проводились расчеты индексов атерогенности (по формуле: ХС-ЛПВП/ХС-ЛПВП) и инсулинорезистентности (Homa-IR) (по формуле: инсулин натощак (мкЕд/мл) × глюкоза натощак (ммоль/л /22,5). Исследовались показатели, характеризующие реологические показатели крови: количество эритроцитов, тромбоцитов, индексы эритроцитов, глюкоза, гликированный гемоглобин (HbA1c) и их связь с гиперреактивностью к пАГ.

В связи с большим количеством пищевых продуктов, содержащих пАГ, для обработки и наглядного представления результатов нами было проведено разделение пищевых продуктов по

кластерам. В основу разделения были положены следующие принципы:

1. Схожий антигенный состав или роль продукта в биохимических процессах пищеварения, с учетом следующих признаков:

а) продукты должны быть из одного семейства (например кластеры бобовых, пасленовых, крестоцветных продуктов);

б) продукты могли быть сходны по составу входящих в них компонентов (например молочный кластер);

в) продукты должны иметь существенное сходство в биохимических процессах пищеварения (например кластер продуктов брожения).

2. Доступность и частота потребления продуктов населением.

3. Частота встречаемости гиперреактивности иммунной системы (ИС) в определенном кластере, когда концентрация sIgG выше индивидуальной нормы.

Статистическая обработка данных проводилась с использованием программ Statistica v. 6.0, SPSS 19.0 с использованием U-критерия Манна-Уитни, коэффициента ранговой корреляции Спирмена, двустороннего критерия Фишера, отношение шансов (OR).

Результаты

При сравнении показателей у лиц с разным ИМТ было выявлено, что в клинической группе с повышенным ИМТ, как у мужчин, так и у женщин, концентрация IL-6, IL-17, холестерина, триглицеридов, ЛПНП, глюкозы, HbA1c, АлАТ, инсулина, индексов инсулинорезистентности и атерогенности были статистически значимо повышены по сравнению с таковыми у лиц в контрольной группе с нормальным ИМТ, а концентрация ЛПВП снижена (табл. 1). В ходе исследования нами выявлены статистически достоверные связи между общим количеством тромбоцитов ($p < 0,05$; $r = 0,213$), эритроцитов ($p < 0,05$; $r = -0,211$), средним объемом эритроцита (MCV) ($p < 0,05$; $r = 0,339$) и концентрацией IgG к казеину в крови, а также между концентрацией sIgG к сое и количеством тромбоцитов ($p < 0,05$; $r = 0,231$) (табл. 3). При определении концентрации sIgG к пАГ в двух сравниваемых группах (ИМТ > 27 и $18,5 < \text{ИМТ} < 25$) у обследованных лиц статистически значимые отличия были выявлены для молочного кластера (казеин, молоко коровье, творог, твердый сорт сыра), бродильного кластера (виноград) и бобовых (соя, фасоль) (табл. 2). При этом была найдена взаимосвязь между установленными значениями IgG к пАГ казеина и риском развития атерогенных изменений (индекс атерогенности > 3) при OR = 2,68 (1,33-5,42), а также показателями IgG к пАГ казеина (OR = 8,9 (2,6-30,5)), пАГ сои (OR = 5,6 (1,8-16,7)), пАГ глютенa ((F = 0,00359, $p < 0,05$) и повышенным ИМТ (табл. 3).

ТАБЛИЦА 1. ЛАБОРАТОРНЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ У ЛИЦ В КЛИНИЧЕСКОЙ И КОНТРОЛЬНОЙ ГРУППАХ, Ме ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)

TABLE 1. LABORATORY INDICATORS OF PERSONS WITH ELEVATED AND NORMAL BODY MASS INDEX, Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)

Показатель Index	Рефе- рентные значения Reference values	Клиническая группа Clinical group		Контрольная группа Control group	
		Женщины Women (n = 60)	Мужчины Men (n = 60)	Женщины Women (n = 25)	Мужчины Men (n = 25)
Холестерин, ммоль/л Cholesterol, mmol/l	< 5,2	5,40 (4,55-5,88)*	5,40 (4,70-6,10)**	4,70 (4,20-5,20)	4,82 (4,40-5,30)
Триглицериды, ммоль/л Triglycerides, mmol/l	< 1,71	1,10 (0,90-1,52)***	1,45 (0,87-2,50)***	0,68 (0,50-0,74)	0,80 (0,60-1,15)
ЛПВП, ммоль/л HDL, mmol/l	Жен: 1,0-2,1 Муж: 0,9-1,8	1,31 (1,20-1,70)**	1,20 (1,10-1,40)**	1,70 (1,50-1,90)	1,30 (1,24-1,60)
ЛПНП, ммоль/л LDL, mmol/l	< 3,5	3,43 (2,77-4,00)***	3,50 (2,80-4,30)*	2,50 (2,26-3,10)	3,00 (2,50-3,40)
Индекс атерогенности Atherogenicity index	< 3,0	2,86 (2,08-3,64)***	3,42 (2,81-4,27)***	1,77 (1,47-2,06)	2,46 (2,00-2,78)
АлАТ, Е/л ALT, U/l	Жен: < 31 Муж: < 40	21,0 (14,0-32,0)*	29,0 (19,0-47,0)**	15,0 (10,0-18,0)	19, (16,0-25,0)
АсАТ, Е/л AST, U/l	Жен: < 31 Муж: < 38	21,0 (17,0-25,0)*	22,0 (16,0-25,0)	17,0 (14,0-21,0)	23,0 (19,0-28,0)
Билирубин общий, мкмоль/л Total bilirubin, μ mol/l	8,5-20,5	10,3 (7,8-13,5)*	13,1 (9,4-17,8)	13,0 (10,1-16,0)	14,8 (11,2-21,5)
Креатинин, мкмоль/л Creatinine, μ mol/l	Жен: 53-106 Муж: 71-115	75,0 (66,0-89,0)	87,0 (74,0-99,0)	72,0 (66,0-83,0)	86,0 (79,0-96,0)
Щелочная фосфатаза, Е/л Alkaline phosphatase, U/l	70-270	124,0 (95,0-197,0)	152,0 (90,0-203,0)*	117,0 (95,0-164,0)	120,0 (75,0-163,0)
Альбумин, г/л Albumin, g/l	35-50	43,0 (41,0-45,0)	44,0 (43,0-47,0)	43,0 (41,0-45,0)	45,0 (44,0-49,0)
Глюкоза, ммоль/л Glucose, mmol/l	3,5-6,1	5,15 (4,75-5,70)***	5,3 (4,9-5,8)***	4,5 (4,2-4,9)	4,8 (4,5-5,2)
HbA1c, %	< 6	5,0 (4,2-5,8)	5,3 (4,4-6,0)*	4,7 (4,4-5,1)	4,7 (4,0-5,1)
Инсулин, мкЕд/мл Insulin, McU/ml	2,7-10,4	6,5 (5,4-11,0)***	8,0 (5,4-12,5)***	4,6 (3,5-5,4)	5,3 (3,2-6,7)
Индекс инсулино- резистентности Insulin resistance index	< 2,7	1,64 (1,12-2,94)***	1,90 (1,23-3,05)**	0,90 (0,75-1,06)	1,04 (0,73-1,31)
IL-4, пг/мл IL-4, pg/ml	0-4	0,5 (0,0-1,1)	0,0 (0,0-1,1)	0,0 (0,0-0,8)	0,6 (0,0-1,2)
IL-6, пг/мл IL-6, pg/ml	0-10	1,9 (0,8-3,2)***	1,7 (0,8-3,2)***	0,2 (0,0-0,5)	0,8 (0,0-2,1)
IL-10, пг/мл IL-10, pg/ml	0-31	3,6 (0,3-7,8)	5,1 (1,0-7,4)	2,8 (0,9-6,8)	3,1 (0,0-6,5)
IL-17, пг/мл IL-17 pg/ml	0-20	2,0 (1,0-2,2)*	1,0 (0,3-3,0)*	0,3 (0,0-1,0)	0,0 (0,0-0,1)

Примечание. * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$ – по сравнению с контрольной группой.

Note. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$, in comparison with the control group.

ТАБЛИЦА 2. КОНЦЕНТРАЦИИ IgG К ПИЩЕВЫМ АНТИГЕНАМ У ЛИЦ В КЛИНИЧЕСКОЙ И КОНТРОЛЬНОЙ ГРУППАХ,
Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)

TABLE 2. CONCENTRATIONS OF IgG TO FOOD ANTIGENS IN INDIVIDUALS IN THE CLINICAL AND CONTROL GROUPS,
Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)

	Пищевые антигены Food antigens	Лица в клинической группе Persons in the clinical group (n = 110)	Лица в контрольной группе Persons in the control group (n = 40)	Значение критерия и уровня значимости Value of the criterion and significance level
Кластер продуктов брожения Cluster of fermentation products	Дрожжи пек. Baker's yeast	130 (100-209)	125 (109-160)	U = 2008; p = 0,82
	Дрожжи пив. Brewer's yeast	100 (69-142)	98 (63-147)	U = 2119; p = 0,73
	Мед Honey	122 (92-168)	134 (90-166)	U = 2108; p = 0,39
	Виноград Grape	142 (116-201)*	125 (91-171)	U = 1699; p = 0,03
	Тростниковый сахар Cane sugar	120 (82-187)	104 (85-146)	U = 1159; p = 0,63
	Солод Malt	93 (75-133)	96 (70-119)	U = 1179; p = 0,62
Молочный кластер Dairy cluster	Казеин Casein	88 (49-211)*	49 (31-79)	U = 1258; p = 0,00006
	Молоко коровье Cow's milk	112 (76-178)*	98 (64-118)	U = 1735; p = 0,048
	Творог Cottage cheese	88 (57-201)*	63 (51-86)	U = 1420; p = 0,0009
	Тв. сыр Cheese	88 (54-169)*	55 (39-86)	U = 1388; p = 0,0005
	Йогурт Yogurt	98 (74-226)	85 (69-128)	U = 984; p = 0,07
	Слив. Масло Butter	99 (68-223)	80 (68-112)	U = 1036; p = 0,15
	Плавленный сыр Processed cheese	87 (61-212)	78 (60-101)	U = 1013; p = 0,11
Кластер яичного белка и желтка Cluster egg white and yolk	Яичный белок Egg white	91 (69-134)	92 (71-123)	U = 2089; p = 0,63
	Яичный желток Egg yolk	74 (56-89)	76 (56-93)	U = 2131; p = 0,47
Зерновой кластер Grain cluster	Глютен Gluten	76 (58-89)	73 (53-83)	U = 1906; p = 0,21
	Пшеница Wheat	89 (60-120)	81 (57-108)	U = 1896; p = 0,19
	Овес Oats	76 (57-101)	87 (61-125)	U = 1823; p = 0,11
	Рожь Rye	71 (52-95)	79 (60-97)	U = 2075; p = 0,59
	Пшено Millet	70 (56-88)	76 (51-95)	U = 2197; p = 0,98

Таблица 2 (окончание)
Table 2 (continued)

	Пищевые антигены Food antigens	Лица в клинической группе Persons in the clinical group (n = 110)	Лица в контрольной группе Persons in the control group (n = 40)	Значение критерия и уровня значимости Value of the criterion and significance level
Пасленовый кластер nightshade cluster	Картошка Potatoes	57 (39-88)	70 (49-98)	U = 1886; p = 0,18
	Помидор Tomato	97 (78-114)	96 (80-109)	U = 2118; p = 0,72
	Баклажан Eggplant	61 (41-80)	59 (40-79)	U = 2155; p = 0,84
	Перец зелен. Green pepper	98 (68-152)	97 (52-136)	U = 1933; p = 0,25
	Перец острый Hot pepper	148 (97-206)	152 (111-197)	U = 2177; p = 0,92
	Табак Tobacco	163 (107-231)	142 (110-190)	U = 1061; p = 0,203
Бобовый кластер Bean cluster	Соя Soya	95 (73-120)*	76 (54-97)	U = 1442; p = 0,001
	Фасоль Bean	95 (72-122)*	74 (54-100)	U = 1580; p = 0,008
	Горох Peas	77 (56-96)	64 (53-86)	U = 1799; p = 0,08
Тыквенный кластер Pumpkin cluster	Огурец Cucumber	71 (62-83)	72 (57-82)	U = 2088; p = 0,63
	Арбуз Watermelon	110 (75-168)	104 (71-135)	U = 1874; p = 0,17
	Дыня Melon	63 (45-83)	58 (40-77)	U = 1958; p = 0,30
	Тыква Pumpkin	69 (58-80)	63 (51-78)	U = 1806; p = 0,09

Примечание. * – $p < 0,05$ – по сравнению с контрольной группой.

Note. *, $p < 0.05$, in comparison with the control group.

Таким образом, у лиц с повышенным ИМТ выявлены персонифицированные реакции на продукты, которые по своим антигенным свойствам могут оказывать вклад в провоспалительный статус, связанный с изменением реологических показателей крови и дисбалансом цитокинов. На основании этого, данные продукты могут быть расценены, как продукты соответствующие критерию «пищевой дезадаптации» индивидуума, по причине генетически и эволюционно обусловленных противоречий между процессами физиологического переваривания и реакциями иммунного контроля за пищеварением.

Обсуждение

Повышенная концентрация sIgG к продуктам молочного кластера в клинической группе с повышенным ИМТ > 27 может быть объяснена тем,

что казеин, являясь сложным белком, подвергается медленному расщеплению. На наш взгляд, это может быть связано со снижением кислотности и ферментообразующей функции желудка, с неправильным питанием пациентов, курением, приемом ингибиторов протонной помпы и дисбалансом присутствия микробиоты, в частности наличия бактерией *Helicobacter pylori*. В связи с этим, нерасщепленные фрагменты казеина сначала попадают в кишечник, а в последующем в кровотоки с образованием циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК) [1, 11, 26]. В дальнейшем ЦИК продолжают транспорт в мелкие сосуды, ткани и органы. В норме, элиминация подобных ЦИК предусматривает их фиксацию и выведение из организма с привлечением макрофагального фагоцитоза. Однако в ситуации, когда некая критическая доза недорасщепленных до

ТАБЛИЦА 3. НАЛИЧИЕ СВЯЗЕЙ МЕЖДУ ВЕРОЯТНОСТЬЮ РАЗВИТИЯ МЕТАБОЛИЧЕСКИХ НАРУШЕНИЙ, РЕОЛОГИЧЕСКИМИ ИЗМЕНЕНИЯМИ И ПИЩЕВОЙ ГИПЕРРЕАКТИВНОСТЬЮ

TABLE 3. PRESENCE OF LINKS BETWEEN THE PROBABILITY OF DEVELOPING METABOLIC DISORDERS, RHEOLOGICAL CHANGES AND NUTRITIONAL HYPERREACTIVITY

Исход Result	Гиперреактивность к казеину Hyperreactivity to casein	Гипер- реактивность к сое Hyperreactivity to soy	Гипер- реактивность к глютену Hyperreactivity to gluten
Повышенная масса тела или ожирение (ИМТ > 27,0) Increased body weight or obesity (BMI > 27.0)	OR = 8,9 (2,6-30,5)	OR = 5,6 (1,8-16,7)	F = 0,00359; p < 0,05
Развитие атерогенных изменений (ИА > 3) Development of atherogenic changes (Atherogenicity index > 3)	OR = 2,68 (1,33-5,42)	—	—
Изменение количества тромбоцитов Change in platelet count	p < 0,05; r = 0,213	p < 0,05; r = 0,231	—
Изменение количества эритроцитов Change in the number of red blood cells	p < 0,05; r = -0,211	—	—
Увеличение среднего объема эритроцита Increasing the MCV	p < 0,05; r = 0,339	—	—

Примечание. p – уровень значимости, r – коэффициента ранговой корреляции Спирмена, OR – отношение шансов.

Note. p, significance level; r, Spearman's rank correlation coefficient; OR, probability.

мономеров пАГ в избытке попадает на территорию кишечника, а затем в кровеносную систему, физиологические системы элиминации организма не справляются с такой избыточной нагрузкой. Запускаются процессы эндотелиального воспаления, активации системы комплемента, выброса провоспалительных медиаторов, в частности IL-6 и IL-17 [3, 5, 6].

Прогрессирование любого заболевания сопровождается количественным и функционально-структурными изменениями тех или иных форменных элементов крови [7]. В нашем исследовании у лиц клинической группы с признаками метаболического синдрома (ИМТ > 27) и гиперчувствительностью к казеину наблюдались повышенное разрушение и изменение эластичности мембраны эритроцитов, что способствовало компенсаторному увеличению среднего объема эритроцитов и повышению количества тромбоцитов, которые частично брали на себя функцию эритроцитов по переносу ЦИК иммунных комплексов в селезенку с последующим удалением из организма. Идентифицированное нами увеличение концентрации глюкозы, гликированного гемоглобина, ЛПНП может приводить к изменению осмолярности крови, что также нарушает элиминацию ЦИК.

Данные по повышенной концентрации sIgG к продуктам бобового кластера в клинической группе с повышенным ИМТ по сравнению с контрольной группой могут быть объяснены содержанием специфических лектинов в продуктах семейства бобовых, а также изменением толерантности к соевому белку в связи избыточностью

последнего в рационе современного человека. Возможно предположить, что особые характеристики соевого белка — это не только большое количество фитоэстрогенов в организме, которые способны увеличивать риск образованию тромбов, но и влияние фитоагглютининов бобовых на изменение активности высвобождения провоспалительных цитокинов, опосредованные изменением активности лектиновых рецепторов С-типа на DC и МК, а также фактов изменения перепрограммирования Т-лимфоцитов в качестве неспецифических митогенов [4, 15].

Таким образом, в работе показано наличие связи между sIgG к пАГ, дисбалансом цитокинов, реологическими показателями крови и метаболическими нарушениями. Полученные результаты могут быть интерпретированы, как персонализированное влияние пищевых антигенов на инициацию хронического субклинического воспаления, что может быть патогенетическим риском старта метаболического синдрома.

Заключение

Таким образом, в работе показано наличие связи между специфическими иммуноглобулинами (sIgG) к представителем наборам пищевых антигенов (пАГ), дисбалансом цитокинов, реологическими показателями крови и метаболическими нарушениями у пациентов с избыточным индексом массы тела. Полученные результаты могут быть интерпретированы влиянием определенных пищевых антигенов на процессы развития хронического субклинического воспаления, инициирующего метаболический синдром.

Список литературы / References

1. Барановский А.Ю., Ворохобина Н.В. Ожирение (клинические очерки). СПб.: Диалект, 2007. 240 с. [Baranovsky A.Yu., Vorokhobina N.V. Obesity (clinical essays)] St. Petersburg: Dialect, 2007. 240 p.
2. Киселева Е.П. Акцептивный иммунитет – основа симбиотических взаимоотношений // Инфекция и иммунитет, 2015. Т. 5, № 2. С. 113-130. [Kiseleva E.P. Acceptive immunity is the basis of symbiotic relationships. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2015, Vol. 5, no. 2, pp. 113-130. (In Russ.)] doi: 10.15789/2220-7619-2015-2-113-130.
3. Насонов Е.Л., Денисов Л.Н., Станислав М.Л. Интерлейкин 17 – новая мишень для антицитокиновой терапии иммуновоспалительных ревматических заболеваний // Научно-практическая ревматология, 2013. Т. 51, № 5. С. 545-552. [Nasonov E.L., Denisov L.N., Stanislav M.L. Interleukin 17 is a new target for the anticytokine treatment of immunoinflammatory rheumatic diseases. *Nauchno-prakticheskaya revmatologiya = Scientific and Practical Rheumatology*, 2013, Vol. 51, no. 5, pp. 545-552. (In Russ.)]
4. Павловская Н.Е., Гагарина И.Н. Функциональная роль лектинов растений как предпосылка для их применение в биотехнологии // Химия растительного сырья, 2017. № 1. С. 21-35. [Pavlovskaya N.E., Gagarina I.N. The functional role of plant lectins as a prerequisite for their use in biotechnology. *Khimiya rastitel'nogo syrya = Chemistry of Plant Materials*, 2017, no. 1, pp. 21-35. (In Russ.)]
5. Рекомендации экспертов всероссийского научного общества кардиологов по диагностики и лечению метаболического синдрома // Практическая медицина, 2010. № 5. С. 81-101. [Recommendations of experts of the All-Russian Scientific Society of Cardiology on the diagnosis and treatment of metabolic syndrome. *Prakticheskaya meditsina = Practical Medicine*, 2010, no. 5, pp. 81-101. (In Russ.)]
6. Розенштейн М.Ю., Розенштейн А.З., Кондаков С.Э., Черевко Н.А. Методологический подход к созданию персонализированной элиминационной диеты при пищевой непереносимости, обусловленной иммунопатологическими реакциями III типа // Бюллетень сибирской медицины, 2015. Т. 14, № 4. С. 60-67. [Rozenshteyn M.Yu., Rozenshtein A.Z., Kondakov S.E., Cherevko N.A. Methodological approach to the creation of a personalized elimination diet with food intolerance caused by type III immunopathological reactions. *Byulleten sibirskoy meditsiny = Bulletin of Siberian Medicine*, 2015, Vol. 14, no. 4, pp. 60-67. (In Russ.)]
7. Сидельникова Н.С., Якусевич В.В., Петроченко А.С., Тихомирова И.А., Петроченко Е.П. Особенности реологических и микроциркуляторных показателей у пациентов с метаболическим синдромом // Ярославский педагогический вестник, 2012. Т. 3, № 2. С. 91-97. [Sidelnikova N.S., Yakusevich V.V., Petrochenko A.S., Tikhomirova I.A., Petrochenko E.P. Hemorheological and microcirculatory parameters in patients with a metabolic syndrome. *Yaroslavskiy pedagogicheskiy vestnik = Yaroslavl Pedagogical Bulletin*, 2012, no. 2, pp. 91-97. (In Russ.)]
8. Симаненков В.И., Маев И.В., Ткачева О.Н., Алексеенко С.А., Андреев Д.Н., Бордин Д.С., Власов Т.Д., Воробьева Н.М., Гринева В.Б., Губонина И.В., Дробизhev М.Ю., Ефремов Н.С., Каратеев А.Е., Котовская Ю.В., Кравчук Ю.А., Кривобородов Г.Г., Кульчавеня Е.В., Лиля А.М., Маевская М. В., Полуэктова Е.А., Попкова Т.В., Саблин О.А., Соловьева О.И., Суворов А.Н., Тарасова Г.Н., Трухан Д.И., Федотова А.В. Синдром повышенной эпителиальной проницаемости в клинической практике / Мультидисциплинарный национальный консенсус // Кардиоваскулярная терапия и профилактика, 2021. Т. 20, № 1, 2758. [Simanenkova V.I., Maev I.V., Tkacheva O.N., Alekseenko S.A., Andreev D.N., Bordin D.S., Vlasov T.D., Vorobieva N.M., Grinevich V.B., Gubonina I.V., Drobizhev M.Yu., Efremov N.S., Karateev A.E., Kotovskaya Yu.V., Kravchuk Yu.A., Krivoborodov G.G., Kulchavenya E.V., Lila A.M., Maevskaya M.V., Poluektova E.A., Popkova T.V., Sablin O.A., Solovieva O.I., Suvorov A.N., Tarasova G.N., Trukhan D.I., Fedotova A.V. Syndrome of increased epithelial permeability in clinical practice. Multidisciplinary national Consensus. *Kardiovaskulyarnaya terapiya i profilaktika = Cardiovascular Therapy and Prevention*, 2021, Vol. 20, no. 1, 2758. (In Russ.)] doi:10.15829/1728-8800-2021-2758.
9. Шилов А.М., Авшалумов А.С., Синицина Е.Н., Марковский В.Б., Полещук О.И. Изменения реологических свойств крови у больных с метаболическим синдромом // Российский медицинский журнал – 2008. № 4. С. 200-208. [Shilov A.M., Avshalumov A.S., Sinitsina E.N., Markovsky V.B., Poleshchuk O.I. Changes in the rheological properties of blood in patients with metabolic syndrome. *Rossiyskiy meditsinskiy zhurnal = Russian Medical Journal*, 2008, no. 4, pp. 200-208. (In Russ.)]
10. Baker M.G., Sampson H.A. Phenotypes and endotypes of food allergy: A path to better understanding the pathogenesis and prognosis of food allergy. *Ann. Allergy Asthma Immunol.*, 2018, Vol. 120, pp. 245-253.
11. Burks A.W., Laubach S., Jones S.M. Oral tolerance, food allergy, and immunotherapy: Implications for future treatment. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2008, Vol. 121, no. 6, pp. 1344-1350.
12. Chiaranunt P., Tai S.L., Ngai L., Mortha A. Beyond immunity: Underappreciated functions of intestinal macrophages. *Front. Immunol.*, 2021, Vol. 12, 749708. doi: 10.3389/fimmu.2021.749708.
13. Guo H., Jiang T., Wang J., Chang Y., Guo H., Zhang W. The value of eliminating foods according to food-specific immunoglobulin G antibodies in irritable bowel syndrome with diarrhea. *J. Int. Med. Res.*, 2012, Vol. 40, no. 1, pp. 204-210.
14. Hansen I.S., Krabbendam L., Bernink J.H., Loayza-Puch F., Hoepel W., van Burgsteden J.A., Kuijper E.C., Buskens C.J., Bemelman W.A., Zaat S.J., Agami R., Vidarsson G., van den Brink G.R., de Jong E.C., Wildenberg M.E., Baeten D.P., Everts B., den Dunnen J. FcαRI co-stimulation converts human intestinal CD103⁺ dendritic cells into pro-inflammatory cells through glycolytic reprogramming. *Nat. Commun.*, 2018, Vol. 9, no. 1, pp. 863-871.
15. Hayen S.M., Knulst A.C., Garssen J., Otten H.G., Willemsen L.E.M. Fructo-oligosaccharides modify human DC maturation and peanut-induced autologous T-Cell response of allergic patients *in vitro*. *Front. Immunol.*, 2021, Vol. 11, 600125. doi: 10.3389/fimmu.2020.600125.
16. Iberg C.A., Hawiger D. Natural and induced tolerogenic dendritic cells. *J. Immunol.*, 2020, Vol. 204, no. 4, pp. 733-744.

17. Klose C.S., Veiga-Fernandes H. Neuroimmune interactions in peripheral tissues. *Eur. J. Immunol.*, 2021, Vol. 51, pp. 1602-1614.
18. Lee K.H., Song Y., Wu W., Yu K., Zhang G. The gut microbiota, environmental factors, and links to the development of food allergy. *Clin. Mol. Allergy*, 2020, Vol. 18, no. 5, pp. 120-131.
19. Lux A., Yu X., Scanlan C.N., Nimmerjahn F. Impact of immune complex size and glycosylation on IgG binding to human fcγ receptors. *J. Immunol.*, 2013, Vol. 190, no. 8, pp. 4315-4323.
20. Mittal R., Debs L.H., Patel A.P., Nguyen D., Patel K., O'Connor G., Grati M., Mittal J., Yan D., Eshraghi A.A., Deo S.K., Daunert S., Liu X.Z. Neurotransmitters: The critical modulators regulating gut-brain axis. *J Cell Physiol.*, 2017, Vol. 232, no. 9, pp. 2359-2372.
21. Novikov P.S., Cherevko N.A., Skirnevskaya A.V., Kondakov S.E., Rosenshtein M.J., Rosenshtein A.Z., Rezapov B.R., Muraveinik O.A. The Role of IL-17 in the development of food hypersensitivity and metabolic disturbances. *Proceedings. "Allergy, Asthma, COPD, Immunophysiology & Immunorehabilitation: Innovative Technologies"*, 2018, Vol. 10, pp. 309-314. XXV World Congress on Rehabilitation in Medicine and Immunorehabilitation. Barcelona, Spain, April 20-23, 2018.
22. Raker V.K., Domogalla M.P., Steinbrink K. Tolerogenic dendritic cells for regulatory T cell induction in man. *Front. Immunol.*, 2015, Vol. 6, 569. doi: 10.3389/fimmu.2015.00569.
23. Satitsuksano P., Jansen K., Globinska A., van den Veen W., Akdis M. Regulatory immune mechanisms in tolerance to food allergy. *Front. Immunol.*, 2018, Vol. 9, 2939. doi: 10.3389/fimmu.2018.02939.
24. Shevryev D., Tereshchenko V. Treg heterogeneity, function, and homeostasis. *Front. Immunol.*, 2020, Vol. 10, 3100. doi: 10.3389/fimmu.2019.03100.
25. Tordesillas L., Berin M.C. Mechanisms of oral tolerance. *Clin. Rev. Allergy Immunol.*, 2018, Vol. 55, no. 2, pp. 107-117.
26. Truswell A.S. The A2 milk case: a critical review. *Eur. J. Clin. Nutr.*, 2005, Vol. 59, no. 5, pp. 623-631.

Авторы:

Новиков П.С. — соискатель кафедры патофизиологии ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ; заведующий клинико-диагностической лабораторией медицинского объединения «Центр Семейной медицины», г. Томск, Россия

Черевко Н.А. — д.м.н., профессор кафедры иммунологии и аллергологии ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Томск, Россия

Климов В.В. — д.м.н., профессор, заведующий кафедрой иммунологии и аллергологии ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Томск, Россия

Кондаков С.Э. — к.х.н., д.фарм.н., ведущий научный сотрудник лаборатории химической кинетики, кафедра химической кинетики ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», Москва, Россия

Розенштейн М.Ю. — к.м.н., врач-диетолог, член Американской ассоциации нутрициологов АНА, ведущий специалист «ImmunoHealth-РУС», Москва, Россия

Розенштейн А.З. — д.физ.-мат. н., управляющий партнер клиники ImmunoHealth-РУС, Москва, Россия

Мотлохова Е.А. — студентка 5 курса медико-биологического факультета ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Томск, Россия

Загрешенко Д.С. — к.м.н., ассистент кафедры клинической лабораторной диагностики, Новокузнецкий государственный институт усовершенствования врачей, г. Новокузнецк, Кемеровская обл., Россия

Authors:

Novikov P.S., PhD Applicant, Department of Pathophysiology, Siberian State Medical University; Head, Laboratory of Clinical Diagnostic, "Center for Family Medicine", Tomsk, Russian Federation

Cherevko N.A., PhD, MD (Medicine), Professor, Department of Immunology and Allergy, Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation

Klimov V.V., PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Department of Immunology and Allergy, Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation

Kondakov S.E., PhD (Chemistry), MD (Pharmacy), Leading Research Associate, Laboratory of Chemical Kinetics, Department of Chemical Kinetics, Lomonosov State University, Moscow, Russian Federation

Rozenshteyn M.Yu., PhD (Medicine), Clinical Nutritionalist, Leading Specialist, "ImmunoHealth Rus", Moscow, Russian Federation

Rozenshteyn A.Z., PhD, MD (Physics & Mathematics), Managing Partner of the ImmunoHealth Clinic, Moscow, Russian Federation

Motlokhova E.A., Student (5th Year), Faculty of Medicine and Biology, Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation

Zagreshenko D.S., PhD (Medicine), Assistant Professor, Department of Clinical Laboratory Diagnostics, Novokuznetsk State Institute of Postgraduate Medical Education, Novokuznetsk, Kemerovo Region, Russian Federation

Поступила 02.02.2022
Принята к печати 13.02.2022

Received 02.02.2022
Accepted 13.02.2022

ИММУННЫЙ ПЛЕЙОТРОПНЫЙ ЭФФЕКТ ТЕЛМИСАРТАНА ПРИ АРТЕРИАЛЬНОЙ ГИПЕРТЕНЗИИ

Агарков Н.М.^{1,2}, Макконен К.Ф.², Титов А.А.¹, Бельчикова Д.Н.¹,
Колпина Л.В.³

¹ ФГБОУ ВО «Юго-Западный государственный университет», г. Курск, Россия

² ФГАОУ ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет», г. Белгород, Россия

³ Тель-Авивский университет, г. Тель-Авив, Израиль

Резюме. Артериальная гипертензия (АГ) представляет одно из жизнеугрожающих заболеваний и требует постоянной антигипертензивной терапии, в том числе телмисартаном. Однако влияние телмисартана у пожилых пациентов с АГ на системный интерлейкиновый статус из-за ограниченного числа ранее анализированных интерлейкинов нуждается в дальнейшем изучении. Цель исследования — изучение иммунного плеiotропного эффекта телмисартана у пациентов с АГ по широкому спектру провоспалительных и противовоспалительных интерлейкинов крови. Исследование базируется на обследовании 74 пациентов в возрасте 60–74 лет, страдающих АГ, получавших телмисартан по 80 мг/сут в утренние часы. Иммунный ответ на воздействие телмисартана изучен через 6 месяцев по содержанию в крови различных интерлейкинов. Последние определялись методом проточной цитометрии на аппарате Becton Dickinson FACS Canto 2 (США). Плеiotропный иммунный эффект телмисартана на системный интерлейкиновый статус пациентов 60–74 лет с АГ установлен по статистически значимому изменению значительного количества провоспалительных и противовоспалительных интерлейкинов. У пациентов с АГ через 6 месяцев после применения телмисартана произошло статистически значимое снижение в крови IL-1 β до $8,1 \pm 0,6$ пг/мл против исходных $10,5 \pm 0,8$ пг/мл, IL-2 до $8,6 \pm 0,8$ пг/мл против исходных $11,8 \pm 1,1$ пг/мл, IL-6 до $18,4 \pm 0,5$ пг/мл против исходных $21,2 \pm 0,7$ пг/мл, IL-8 до $3,5 \pm 0,6$ пг/мл против $5,4 \pm 0,5$ пг/мл. Статистически значимо у пациентов пожилого возраста, страдающих АГ, через 6 месяцев антигипертензивной терапии телмисартаном произошло уменьшение на системном уровне содержания в крови TNF α до $5,3 \pm 0,5$ пг/мл против исходного $6,8 \pm 0,4$ пг/мл. Одновременно на фоне реализованной антигипертензивной терапии телмисартаном у пациентов 60–74 лет с АГ повысился уровень провоспалительных системных интерлейкинов и особенно IL-4 с $4,6 \pm 0,5$ пг/мл до $7,0 \pm 0,6$ пг/мл. Все это позволяет считать, что телмисартан обладает существенным иммунным плеiotропным эффектом у пациентов с АГ, установленном по изменению большинства системных интерлейкинов. Установлены плеiotропные эффекты телмисартана у пациентов с АГ, выражающиеся в достоверном снижении уровня IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-8, TNF α и повышении IL-4, IL-10. Полученные результаты показали значительный плеiotропный эффект телмисартана у пациентов с АГ по большому количеству интерлейкинов, что расширяет представления об иммунном воспалении при обсуждаемой патологии и его коррекции телмисартаном.

Ключевые слова: интерлейкины крови, телмисартан, артериальная гипертензия

Адрес для переписки:

Агарков Николай Михайлович
ФГБОУ ВО «Юго-Западный государственный университет»
305040, Россия, г. Курск, ул. 50 лет Октября, 94.
Тел.: 8 (910) 740-96-13.
E-mail: vitalaxen@mail.ru

Address for correspondence:

Agarkov Nikolai M.
South-Western State University
305040, Russian Federation, Kursk, 50 let Oktyabrya str., 94.
Phone: 7 (910) 740-96-13.
E-mail: vitalaxen@mail.ru

Образец цитирования:

Н.М. Агарков, К.Ф. Макконен, А.А. Титов, Д.Н. Бельчикова, Л.В. Колпина «Иммунный плеiotропный эффект телмисартана при артериальной гипертензии» // Медицинская иммунология, 2022. Т. 24, № 4. С. 831-836.
doi: 10.15789/1563-0625-IPE-2476
© Агарков Н.М. и соавт., 2022

For citation:

N.M. Agarkov, K.F. Makkonen, A.A. Titov, D.N. Belchikova, L.V. Kolpina "Immune pleiotropic effect of telmisartan in arterial hypertension", Medical Immunology (Russia)/ Meditsinskaya Immunologiya, 2022, Vol. 24, no. 4, pp. 831-836.
doi: 10.15789/1563-0625-IPE-2476
DOI: 10.15789/1563-0625-IPE-2476

IMMUNE PLEIOTROPIC EFFECT OF TELMISARTAN IN ARTERIAL HYPERTENSION

Agarkov N.M.^{a, b}, Makkonen K.F.^b, Titov A.A.^a, Belchikova D.N.^a, Kolpina L.V.^c

^a South-Western State University, Kursk, Russian Federation

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

^c Tel-Aviv University, Tel-Aviv, Israel

Abstract. Arterial hypertension (AH) is among the life-threatening diseases and requires permanent antihypertensive therapy, including telmisartan. However, the effect of telmisartan upon systemic interleukin profile in elderly hypertensive patients requires further study, due to the limited data on previously analyzed interleukins. The aim of our study was to evaluate the immune pleiotropic effect of telmisartan upon multiple pro- and anti-inflammatory blood interleukins in the patients with hypertension. The study included examination of 74 patients aged 60–74 years suffering from hypertension treated with telmisartan (80 mg/day in the morning time). The immune response to telmisartan assessed by the blood contents of different interleukins was evaluated following 6 months of treatment. These markers were determined by flow cytometry using “Becton Dickinson FACS Canto 2” device (USA). The pleiotropic immune effect of telmisartan upon the interleukin profile in hypertensive patients aged 60–74 was established by statistically significant changes in multiple pro-inflammatory and anti-inflammatory interleukins. Following 6 months of telmisartan therapy, the patients with arterial hypertension have shown a statistically significant decrease in blood cytokines, i.e., IL-1 β was reduced to 8.1 ± 0.6 pg/ml vs initial 10.5 ± 0.8 pg/ml; IL-2, to 8.6 ± 0.8 pg/ml vs initial 11.8 ± 1.1 pg/ml; IL-6, to 18.4 ± 0.5 pg/ml vs initial 21.2 ± 0.7 pg/ml; IL-8, to 3.5 ± 0.6 pg/ml vs 5.4 ± 0.5 pg/ml. We have also revealed a statistically significant decrease of blood TNF α levels to 5.3 ± 0.5 pg/ml versus initial 6.8 ± 0.4 pg/ml in the elderly patients with hypertension after 6 months of antihypertensive therapy with telmisartan. Moreover, the levels of pro-inflammatory systemic interleukins and, especially, IL-4 showed an increase from 4.6 ± 0.5 pg/ml to 7.0 ± 0.6 pg/ml in the course of telmisartan therapy in these patients. In summary, one may suggest that telmisartan exerts a significant immune pleiotropic effect in the patients with hypertension, confirmed by the systemic changes of interleukin contents. The pleiotropic effects of telmisartan have been established in patients with arterial hypertension, expressed as a significant decrease in IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, TNF α levels, along with increased IL-4 and IL-10 contents. The results obtained showed a significant pleiotropic effect of telmisartan in the patients with arterial hypertension upon several interleukins, thus expanding the role of immune inflammation in this disorder, as well as its reversal with telmisartan therapy.

Keywords: blood interleukins, telmisartan, arterial hypertension

Введение

Среди болезней системы кровообращения наиболее распространенной нозологией в различных государствах выступает артериальная гипертензия (АГ), актуальность которой особенно значима для Российской Федерации, так как в других странах ее уровень и класса болезней системы кровообращения существенно ниже [2, 11].

Несмотря на то, что АГ затрагивает большую часть населения во многих государствах, ее этиология и, в частности, иммунологический компонент остается плохо изученным [7]. В настоящее время появляется все больше доказательств того, что АГ может быть связана с хроническим иммунным воспалением [15]. Как врожденный, так и адаптивный иммунный ответ, по-видимому,

играют важную роль в патогенез АГ [5]. Посредством образования воспалительных цитокинов и активных форм кислорода макрофаги могут напрямую нарушать эндотелиальную и гладкомышечную функции сосудов, что приводит к сужению сосудов и, как следствие, к АГ [6]. В свою очередь, дисбаланс отдельных функций субпопуляций Т-клеток может быть инициирующим событием в патогенезе АГ [8]. Больные АГ характеризуются более высоким уровнем фактора некроза опухоли- α (TNF α), интерлейкина-6 (IL-6) и высокочувствительного С-реактивного белка (вЧСРБ) [14] даже после поправки на многочисленные смешанные факторы (возраст, пол, индекс массы тела, соотношение талии и бедер, семейный анамнез гипертензии, липиды плазмы, глюкоза и другие маркеры воспаления). Кроме

того, было обнаружено, что провоспалительное состояние предшествует повышению артериального давления.

При лечении АГ препаратами первой линии считаются блокаторы рецепторов ангиотензина II (сартаны), среди которых важное место занимает телмисартан [1]. Клинические преимущества сартанов, возникающие в результате их применения, объясняются не только гипотензивными свойствами, но и плеiotропными эффектами [9]. Однако исследователи, изучавшие плеiotропные эффекты гипотензивных препаратов, были сосредоточены на их действии на слабо выраженное системное воспаление и оценку последнего по изменению высокочувствительного С-реактивного белка и единичных интерлейкинов [13]. При анализе влияния телмисартана на системный интерлейкиновый профиль у пациентов с АГ рассматривались только IL-4, IL-10 и IL-13 [7] и IL-6, IL-10 [4], что ограничивает понимание участия интерлейкинов в иммунной реакции на воздействие телмисартаном. Изменение же других интерлейкинов крови на фоне антигипертензивной терапии телмисартаном пациентов с АГ неизвестно.

Цель исследования — изучение иммунного плеiotропного эффекта телмисартана у пациентов с АГ по широкому спектру провоспалительных и противовоспалительных интерлейкинов.

Материалы и методы

Исследование базируется на комплексном клиническом, лабораторном и инструментальном обследовании 74 пациентов в возрасте 60–74 лет, страдающих АГ. Критериями включения в исследование являлись: АГ 1–2-й степени, возраст пациентов не менее 60 лет и не более 74 лет, отсутствие предшествующей систематической антигипертензивной терапии. Критерии исключения: клинические проявления ишемической болезни сердца; метаболический синдром; сахарный диабет 1-го и 2-го типов; систематическая антигипертензивная терапия; возраст менее 60 лет и старше 74 лет; перенесенные за последние полгода инфаркт миокарда, различные формы инсульта; хронические заболевания печени и почек; хроническая сердечная недостаточность III–IV функционального класса; симптоматическая АГ; противопоказания к назначению телмисартана; прием препаратов, влияющих на уровень метаболитов оксида азота; прием иммунологических препаратов; психические заболевания, синдром старческой астении.

АГ диагностировалось в соответствии с критериями «Национальных рекомендаций Всероссийского научного общества кардиологов по

профилактике, диагностике и лечению артериальной гипертензии» 4-го пересмотра [11].

В исследование включено 74 человека с АГ, которые получали телмисартан в утреннее время (8:00–10:00 часов) в суточной дозе 80 мг. Основные характеристики пациентов группы исследования представлены в таблице 1.

Суточное мониторирование АД осуществлялось до начала лечения и через 6 месяцев в течение 48 часов монитором BPLab Мн СДП — 3 (ООО «Петр Телегин», Россия).

Содержание интерлейкинов в сыворотке крови исследовали методом проточной цитометрии на аппарате Beckton Dickinson FACS Canto 2 (США) с использованием набора CBA (BO Biosciences, США).

Исследование осуществлялось в соответствии с принципами Хельсинкской Декларации и стандартами надлежащей клинической практики (Good Clinical Practice) после получения письменного согласия пациентов на участие в исследовании.

При обработке полученных результатов использовалась программа Statistica 10.0 и критерий χ^2 для оценки статистически значимых различий, которыми считались $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

При оценке плеiotропного эффекта телмисартана на системный интерлейкиновый статус пациентов пожилого возраста с АГ через 6 месяцев выявлено статистически значимое изменение как большинства провоспалительных, так и противовоспалительных интерлейкинов (табл. 2). При этом в наибольшей степени под влиянием телмисартана снизился уровень IL-8 в 1,5 раза и IL-2 в 1,4 раза ($p < 0,01$).

Статистически значимо, но в меньшей степени по отношению к вышеуказанным системным интерлейкинам у пациентов пожилого возраста, страдающих АГ, произошло уменьшение экспрессии IL-1 β и TNF α в крови. Среди изученных интерлейкинов с провоспалительной направленностью не наблюдалось достоверных изменений в содержании в крови IL-18 через 6 месяцев антигипертензивной терапии телмисартаном.

Вместе с тем важным и существенным иммунным плеiotропным эффектом шестимесячного антигипертензивного лечения телмисартаном пациентов 60–74 лет с АГ следует статистически значимое повышение уровня противовоспалительных системных интерлейкинов — IL-4 и IL-10. При этом концентрация IL-10 в крови через 6 месяцев клинического наблюдения под влиянием телмисартана возросла более существенно, чем содержание другого противовоспалительного системного IL-4.

ТАБЛИЦА 1. КЛИНИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ГРУППЫ ИССЛЕДОВАНИЯ, $M \pm SE$

TABLE 1. CLINICAL CHARACTERISTIC OF THE STUDY GROUPS, $M \pm SE$

Показатель Indicator	Исследуемая группа Investigated group n = 74
Возраст, лет Years, ages	69,8 $\pm$ 2,3 ДИ (CI) = 66,4-72,6
Пол: мужчины Gender: men	n = 32; f = 43,2% ДИ (CI) = 41,1-46,8%
Пол: женщины Gender: women	n = 42; f = 56,8% ДИ (CI) = 53,4-59,3%
Длительность АГ, лет Duration of AH, years	4,9 $\pm$ 0,5 ДИ (CI) = 4,3-5,4
Степень АГ: 1-я степень Degree of AG: 1 st degree	n = 29; f = 39,2% ДИ (CI) = 34,8-41,5%
Степень АГ: 2-я степень Degree of AG: 2 nd degree	n = 45; f = 60,8% ДИ (CI) = 57,1-64,5%
Индекс массы тела, кг/м ² Body mass index, kg/m ²	24,5 $\pm$ 2,2 ДИ (CI) = 20,6-27,2
ЛПНП, ммоль/л LPNP, mmol/l	3,6 $\pm$ 0,5 ДИ (CI) = 3,3-3,8
ЛПВП, ммоль/л LPVP, mmol/l	1,0 $\pm$ 0,2 ДИ (CI) = 0,9-1,2
ТГ, ммоль/л TG, mmol/l	2,3 $\pm$ 0,6 ДИ (CI) = 2,1-2,4
ОХ, ммоль/л OH, mmol/l	5,4 $\pm$ 0,7 ДИ (CI) = 5,2-5,6

ТАБЛИЦА 2. СИСТЕМНЫЙ ИНТЕРЛЕЙКИНОВЫЙ ПРОФИЛЬ ПАЦИЕНТОВ 60-74 ЛЕТ С АГ НА ФОНЕ УТРЕННЕГО ПРИЕМА ТЕЛМИСАРТАНА, $M \pm SE$

TABLE 2. SYSTEMIC INTERLEUKIN PROFILE OF PATIENTS AGED 60-74 YEARS WITH HYPERTENSION ON THE BACKGROUND OF MORNING TELMISARTAN INTAKE, $M \pm SE$

Название интерлейкина Name of interleukin	Утренний прием телмисартана Morning reception of telmisartan		p
	Исходно Initially	6 месяцев 6 months	
IL-1 β , пг/мл IL-1 β , pg/ml	10,5 $\pm$ 0,8	8,1 $\pm$ 0,6	< 0,01
IL-2, пг/мл IL-2, pg/ml	11,8 $\pm$ 1,1	9,6 $\pm$ 0,8	< 0,01
IL-6, пг/мл IL-6, pg/ml	21,2 $\pm$ 1,2	18,4 $\pm$ 0,9	< 0,05
IL-8, пг/мл IL-8, pg/ml	5,4 $\pm$ 0,5	4,6 $\pm$ 0,6	< 0,01
TNF α , пг/мл TNF α , pg/ml	6,8 $\pm$ 0,4	5,9 $\pm$ 0,5	< 0,05
IL-4, пг/мл IL-4, pg/ml	4,6 $\pm$ 0,5	7,0 $\pm$ 0,6	< 0,01
IL-10, пг/мл IL-10, pg/ml	17,2 $\pm$ 0,8	19,3 $\pm$ 1,1	< 0,001
IL-18, пг/мл IL-18, pg/ml	178,5 $\pm$ 3,2	185,2 $\pm$ 3,1	> 0,05

Следовательно, помимо достаточно изученного и установленного в других исследованиях выраженного гипотензивного действия телмисартана при АГ, нами одновременно исследовано влияние этого препарата на системные провоспалительные интерлейкины и показано, что телмисартан обладает плейотропным влиянием как на провоспалительные, так и противовоспалительные интерлейкины и существенно снижает содержание большинства провоспалительных интерлейкинов IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-8, TNF α , наряду с достоверным подъемом уровня противовоспалительных интерлейкинов IL-4 и IL-10.

В предыдущих сообщениях о противовоспалительных интерлейкинах на фоне антигипертензивной терапии телмисартаном эффект кратковременного лечения был в лучшем случае умеренным, за исключением единственного цитокина IL-10 [7]. Телмисартан через 6 месяцев увеличивал уровень IL-10 в сыворотке крови, но не изменял уровень IL-4 и IL-13. Межгрупповые сравнения показали, что вызванные телмисартаном плейотропные эффекты в изменении IL-10 были более выраженными. Интересно, что обследуемая группа не различалась достоверно по степени циркулирующих других анализированных системных интерлейкинов — IL-4 и IL-13.

Установленное плейотропное повышение IL-10 как в настоящей работе, так и в других [4, 7] под воздействием телмисартана важно для пациентов с АГ, поскольку IL-10 оказывает разнонаправленное ингибирующее влияние на атерогенез, включая снижение активности матриксной металлопротеиназы, высвобождение и действие провоспалительных интерлейкинов, экспрессию циклооксигеназы-2 в клетках и изменения метаболизма липидов в макрофагах [10].

На фоне терапии телмисартаном через 12 недель у пациентов с АГ и метаболическим синдромом отмечалось достоверное ($p < 0,001$) повышение IL-10 с $4,7 \pm 0,99$ пг/мл до $7,5 \pm 0,25$ пг/мл

и снижение показателей С-реактивного белка и IL-6 с $8,4 \pm 1,93$ пг/мл до $4,7 \pm 1,8$ пг/мл ($p < 0,01$) [4]. Нами же показаны плейотропные эффекты не только на выше рассмотренные системные IL-10, IL-4, IL-6, но и на IL-1 β , IL-2, IL-8, TNF α и IL-18 и только в отношении последнего не установлено статистически значимого влияния телмисартана. Повышение же уровня IL-10 при использовании телмисартана в течение 12 недель у пациентов с АГ и метаболическим синдромом может быть объяснено тем, что происходит частично улучшение функционирования рецепторов инсулина, поскольку инсулинрезистентные пациенты с метаболическим синдромом характеризуются более низкими уровнями IL-10, чем пациенты с нормальной чувствительностью к этому гормону [12]. Повышение уровня IL-10 после лечения телмисартаном может быть связано также со стимуляцией рецепторов, ответственных за продукцию брадикинина [16].

В свете полученных результатов настоящего исследования следует указать на значительный иммунный плейотропный эффект 6-месячного воздействия телмисартана в отношении различных интерлейкинов у пожилых пациентов, страдающих АГ, что имеет важное клиническое значение для современной иммунологии.

Заключение

Телмисартан обладает значительным иммунным плейотропным эффектом в отношении большинства рассмотренных провоспалительных цитокинов — IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-8, TNF α и противовоспалительных IL-4, IL-10 у пожилых пациентов с АГ на фоне шестимесячной антигипертензивной терапии. Эти результаты представляются клинически значимыми не только в аспекте улучшения лечения пациентов с АГ, но и в плане понимания иммунного воспаления при обсуждаемой патологии и его коррекции телмисартаном.

Список литературы / References

1. Аронов В.С., Фришман В.Г. Современное медикаментозное лечение гипертонии: фокус на последние рекомендации // Медикаменты, 2018. Т. 78, № 5. С. 567-576. [Aronow W.S., Frishman W.H. Contemporary Drug Treatment of Hypertension: Focus on Recent Guidelines. *Medikamenty = Drugs*, 2018, Vol. 78, no. 2, pp. 567-576. (In Russ.)]
2. Лутай Ю.А. Рассогласование суточных биоритмов артериального давления и частоты сердечных сокращений у пожилых пациентов с инфарктом миокарда // Научные результаты биомедицинских исследований, 2021. Т. 7, № 1. С. 80-85. [Lutai Yu.A. Mismatch of daily biorhythms of blood pressure and heart rate in elderly patients with myocardial infarction. *Nauchnye rezultaty biomeditsinskikh issledovaniy = Research Results of Biomedicine*, 2021, Vol. 7, no. 1, pp. 80-85. (In Russ.)]
3. Национальные рекомендации экспертов Всероссийского научного общества кардиологов по диагностике и лечению артериальной гипертензии (4-й пересмотр) // Системные гипертензии, 2010. № 3. С. 5-26. [National recommendations of experts of the All-Russian Scientific Society of Cardiology on the diagnosis and treatment of arterial hypertension (4th revision). *Sistemnye gipertenzii = Systemic Hypertension*, 2010, no. 3, pp. 5-26. (In Russ.)]

4. Петросова В.Г. Изменение уровней адипонектина и цитокинов у больных метаболическим синдромом на фоне гипотензивной монотерапии телмисартаном и амлодипином // Известия ДГПУ, 2013. № 4. С. 81-86. [Petrosova V.G. Changes in adiponectin and cytokine levels in patients with metabolic syndrome on the background of hypotensive monotherapy with telmisartan and amlodipine. *Izvestiya DGPU = News of Dagestan State Pedagogical University*, 2013, no. 4, pp. 81-86. (In Russ.)]
5. Bautista L.E., Vera L.M., Arenas I.A. Independent association between inflammatory markers (C-reactive protein, interleukin-6, and TNF-alpha) and essential hypertension. *J. Hum. Hypertens.*, 2005, Vol. 19, no. 2, pp. 149-154.
6. Chen S., Agrawal D.K. Dysregulation of T cell subsets in the pathogenesis of hypertension. *Curr. Hypertens. Rep.*, 2015, Vol. 17, no. 2, 8. doi: 10.1007/s11906-014-0521-1.
7. DiRaimondo D., Tuttolomondo A., Buttà C. Effects of ACE-inhibitors and angiotensin receptor blockers on inflammation. *Curr. Pharm. Des.*, 2012, Vol. 18, no. 28, pp. 4385-4413.
8. Gilowski W., Krysiak R., Marek B. The effect of short-term perindopril and telmisartan treatment on circulating levels of anti-inflammatory cytokines in hypertensive patients. *Endokrynol. Pol.*, 2018, Vol. 69, no. 6, pp. 667-674.
9. Justin R.A., Crowley S.D. The role of macrophages in hypertension and its complications. *Pflugers Arch.*, 2017, Vol. 469, no. 3-4, pp. 419-430.
10. Khan X., Boisvert W.A. Interleukin-10 protects against atherosclerosis by modulating multiple atherogenic macrophage function. *Thromb. Haemost.*, 2015, Vol. 113, no. 3, pp. 505-512.
11. Kringos D.S., Wienke G.W., Hutchinson A. Building primary care in a changing Europe. World Health Organization, Geneva, 2015. 174 p.
12. Leon-Cabrera S., Arana-Lechuga Y., Esqueda-León E. Reduced systemic levels of IL-10 are associated with the severity of obstructive sleep apnea and insulin resistance in morbidly obese humans. *Mediators Inflamm.*, 2015, Vol. 2015, 493409. doi: 10.1155/2015/493409.
13. McMaster W.G., Kirabo A., Madhur M.S. Inflammation, immunity, and hypertensive end-organ damage. *Circ. Res.*, 2015, Vol. 116, no. 6, pp. 1022-1033.
14. Mian M.O., Paradis P., Schiffrin E.L. Innate immunity in hypertension. *Curr. Hypertens. Rep.*, 2014, Vol. 16, no. 2, 413. doi: 10.1007/s11906-013-0413-9.
15. Nosalski R., McGinnigle E., Siedlinski M. Novel immune mechanisms in hypertension and cardiovascular risk. *Curr. Cardiovasc. Risk Rep.*, 2017, Vol. 11, no. 4, 12. doi: 10.1007/s12170-017-0537-6.
16. Taddei S., Bortolotto L. Unraveling the pivotal role of bradykinin in ACE inhibitor activity. *Am. J. Cardiovasc. Drugs*, 2016, Vol. 16, no. 5, pp. 309-321.

Авторы:

Агарков Н.М. — д.м.н., профессор кафедры биомедицинской инженерии ФГБОУ ВО «Юго-Западный государственный университет», г. Курск; старший научный сотрудник лаборатории «Проблемы старения» ФГАОУ ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет», г. Белгород, Россия

Макконен К.Ф. — д.м.н., профессор кафедры факультетской терапии ФГАОУ ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет», г. Белгород, Россия

Титов А.А. — лауреат президентской стипендии Российской Федерации, студент кафедры биомедицинской инженерии ФГБОУ ВО «Юго-Западный государственный университет», г. Курск, Россия

Бельчикова Д.Н. — студент кафедры биомедицинской инженерии ФГБОУ ВО «Юго-Западный государственный университет», г. Курск, Россия

Колпина Л.В. — к.с.н., доцент кафедры социальных технологий, Тель-Авивский университет, г. Тель-Авив, Израиль

Authors:

Agarkov N.M., PhD, MD (Medicine), Professor, Department of Biomedical Engineering, South-Western State University, Kursk; Senior Research Associate, Laboratory "Problems of Aging", Belgorod State National Research University, Belgorod, Russian Federation

Makkonen K.F., PhD, MD (Medicine), Professor, Department of Faculty Therapy, Belgorod State National Research University, Belgorod, Russian Federation

Titov A.A., Laureate of the Presidential Scholarship of the Russian Federation, Student, Department of Biomedical Engineering, South-Western State University, Kursk, Russian Federation

Belchikova D.N., Student, Department of Biomedical Engineering, South-Western State University, Kursk, Russian Federation

Kolpina L.V., PhD (Social), Associate Professor, Department of Social Technologies, Tel-Aviv University, Tel-Aviv, Israel

Поступила 08.02.2022
Принята к печати 18.02.2022

Received 08.02.2022
Accepted 18.02.2022

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ ПОЛИМЕРНЫХ КОНСТРУКЦИОННЫХ МАТЕРИАЛОВ: АКРИЛОВОЙ ПЛАСТМАССЫ И КОМПОЗИЦИОННОГО МАТЕРИАЛА НА ОСНОВЕ СТЕКЛОВОЛОКНА НА ПРОДУКЦИЮ ЦИТОКИНОВ

Годовалов А.П., Асташина Н.Б., Бажин А.А., Дрокина Т.А.

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

Резюме. В настоящее время в стоматологической практике широко используемым базисным материалом для изготовления съемных протетических конструкций является акриловая пластмасса на основе полиметилметакрилата. Для увеличения срока службы съемных пластиночных протезов нами разработана технология изготовления нового комбинированного базиса полного съемного протеза с применением композиционного материала на основе стекловолокна. Представляет интерес оценка вероятности активации воспалительного процесса при использовании конструкционных полимерных и композитных материалов в стоматологической практике. Цель исследований — в эксперименте *ex vivo* изучить изменение уровня продукции ключевых цитокинов (интерферона- γ и интерлейкина-4) мононуклеарными лейкоцитами человека, в присутствии акриловой пластмассы и композиционного материала на основе стекловолокна.

Объектом исследования служили лейкоциты периферической венозной крови, полученной от 13 практически здоровых мужчин-добровольцев (средний возраст — 24 года). Выделение лейкоцитов проводили из гепаринизированной крови путем градиентного центрифугирования. Культивирование клеток осуществляли в пластиковых круглодонных 96-луночных планшетах во влажной атмосфере с 5% CO₂ при 37 °C в течение 72 ч. По окончании срока инкубации культуральную жидкость стягивали и замораживали для последующего определения концентрации цитокинов с помощью наборов реагентов для иммуноферментного определения концентрации интерферона- γ и интерлейкина-4 производства ЗАО «Вектор-Бест». В исследовании использовали образцы конструкционных материалов двух типов: из акриловой пластмассы «Фторакс», полученные по технологии компрессионного прессования методом горячей полимеризации, в заранее заготовленных формах; из композиционного материала Trinia, полученные методом компьютерного фрезерования. В качестве контроля служили образцы аналогичной формы и размера, изготовленные из стекла. Статистический анализ проводился с помощью программного пакета Statistica 7.0. Использовали критерий Стьюдента и Манна–Уитни для оценки значимости различий. Критический уровень значимости (p) при проверке статистических гипотез принимался равным 0,05.

Продукция IFN γ в присутствии материала Trinia значительно ниже, чем в пробах со стеклом и с образцами из акриловой пластмассы. При этом численность жизнеспособных клеток существенно не отличалась от таковой в контрольных пробах. Продукция IL-4 в пробах с полимерными материа-

Адрес для переписки:

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

Address for correspondence:

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

Образец цитирования:

А.П. Годовалов, Н.Б. Асташина, А.А. Бажин, Т.А. Дрокина «Экспериментальная оценка влияния полимерных конструкционных материалов: акриловой пластмассы и композиционного материала на основе стекловолокна на продукцию цитокинов» // Медицинская иммунология, 2022. Т. 24, № 4. С. 837-842. doi: 10.15789/1563-0625-EEO-2475
© Годовалов А.П. и соавт., 2022

For citation:

A.P. Godovalov, N.B. Astashina, A.A. Bazhin, T.A. Drokina "Experimental evaluation of polymer construction materials: effects of acrylic resin and a fiberglass-based composite upon cytokine production", Medical Immunology (Russia)/ Meditsinskaya Immunologiya, 2022, Vol. 24, no. 4, pp. 837-842.
doi: 10.15789/1563-0625-EEO-2475
DOI: 10.15789/1563-0625-EEO-2475

лами и стеклом статистически значимо не различалась. Выявлено, что при расчете индивидуальных индексов стимуляции для лимфоцитов периферической крови только одного добровольца выражено стимулирующее влияние используемых в настоящем исследовании материалов. Полученные результаты указывают, что в присутствии материала Trinia проявляется противовоспалительная активность лейкоцитов, когда уровень продукции IFN γ несколько снижается, а продукция IL-4 не меняется.

Таким образом, в ходе проведенных исследований апробирован метод персонализированной оценки реактивности полимерных материалов, использующихся в качестве конструкционных для протезирования. Отсутствие повышения продукции ключевых цитокинов лимфоцитами может рассматриваться как благоприятный признак, свидетельствующий об отсутствии активации воспалительного процесса при использовании материала Trinia в качестве компонента базисов съемных протезов.

Ключевые слова: IFN γ , IL-4, мононуклеарные лейкоциты, цитокины, полимерные конструкционные материалы, акриловая пластмасса, композиционный материал на основе стекловолокна

EXPERIMENTAL EVALUATION OF POLYMER CONSTRUCTION MATERIALS: EFFECTS OF ACRYLIC RESIN AND A FIBERGLASS-BASED COMPOSITE UPON CYTOKINE PRODUCTION

Godovalov A.P., Astashina N.B., Bazhin A.A., Drokina T.A.

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

Abstract. Polymethyl methacrylate-based acrylic resin is commonly used in current dental practice as an underlying material for fabrication of overdenture restorations. To increase service life of laminar overdentures, we have developed a technique to fabricate a novel combined base for a full overdenture using a fiberglass-based composite. It makes sense to evaluate probable hazards of inflammatory process which could be activated when using structural polymer materials and composites in dental practice. Our study aimed for assessment of changes in production of key cytokines (interferon- γ and interleukin-4) by *ex vivo* incubated human mononuclear leukocytes in the presence of acrylic resin and fiberglass-based composite.

The experiments dealt with peripheral venous blood leukocytes obtained from 13 apparently healthy male volunteers (mean age = 24 years). The leukocytes were isolated from heparinized blood by gradient centrifugation. The cells were cultured in plastic round-bottom 96-well plates, in moist atmosphere with 5% CO $_2$ at 37 °C for 72 h. Following the incubation, the culture supernates were collected and frozen for further determination of cytokine concentration using ELISA reagent kits for interferon- γ and interleukin-4 measurement (Vector-Best, Russia). The samples of two structural materials were tested in the bioassays: the specimens of acrylic resin, Ftorax were compression-moulded by hot polymerization in prefabricated casts; the specimens of a composite, Trinia, were computer-milled. Glass specimens of similar shape and size were used as references. The statistical analysis used a software package, Statistica 7.0. Significance of the differences was evaluated using the Student's test and the Mann-Whitney test. When testing the statistical hypotheses, the significance level (p) was taken to be 0.05.

Significant decrease of IFN γ production was revealed in presence of Trinia than in the samples with glass and with the acrylic specimens, whereas cell viability counts did not differ from the blank values. There was no statistical differences in IL-4 production between the samples with the polymer materials and the glass. When estimating individual stimulation indexes, the materials used in this research were found to showed a pronounced stimulatory effect with peripheral blood lymphocytes from only one volunteer. These findings indicate that Trinia triggers anti-inflammatory activity of leukocytes, whereas IFN γ production level is somewhat decreased, and IL-4 production remains unchanged.

Thus, the research assessed the method for personalized evaluation of reactivity of prosthodontic structural polymer materials. Absence of increase in lymphocytic production of key cytokines can be regarded as a hopeful sign which indicates that inflammatory process is not activated when Trinia is used in overdenture bases.

Keywords: IFN γ , IL-4, mononuclear leukocytes, cytokines, polymeric structural materials, acrylic plastic, fiberglass-based composite material

Введение

Конструкционные материалы (КМ), традиционно применяемые в широкой стоматологической практике, представляют собой подгруппу биологически совместимых материалов. При этом многие авторы [12, 13, 14] не исключают неблагоприятного воздействия указанных материалов на организм человека, выражающегося в виде различных проявлений, вплоть до стимуляции воспалительного процесса. Существует мнение, что любой материал, вводимый в организм, распознается иммунной системой как чужеродный [15]. В связи с этим изучение реакции иммунной системы и вероятность активации воспалительного процесса при использовании конструкционных полимерных и композитных материалов представляют интерес как для фундаментальной, так и для практической стоматологии [9]. Известно, что в течение всей жизни человека наблюдаются изменения в активности иммунокомпетентных клеток, что связано как с возрастными особенностями, так и наличием сопутствующих заболеваний. В связи с этим при применении различных КМ необходимо использовать современные подходы для прогнозирования индивидуального иммунного ответа пациента, с оценкой реактивности иммунокомпетентных клеток, в том числе с учетом возможностей персонализированной медицины.

Традиционно наиболее широко используемым базисным материалом, применяемым для изготовления съемных протетических конструкций, является акриловая пластмасса на основе полиметилметакрилата [1]. Данный материал имеет удовлетворительные эстетические свойства, позволяет точно воспроизвести поверхность протезного ложа, доступен, технологичен. В качестве недостатков акриловой пластмассы авторы указывают на микропористость, возникающую в процессе полимеризации, а также — на невысокую ударную вязкость, что ведет к снижению ее прочности.

Особый интерес исследователей вызывает оценка биологической совместимости акриловых пластмасс, используемых для изготовления базисов съемных протезов [4]. С этой целью проведены многочисленные экспериментальные — на моделях *in vivo* и *in vitro* — и клинические исследования, результаты которых свидетельствуют, что при определенных условиях возможно изменение местного иммунитета полости рта у пациентов, пользующихся ортопедическими конструкциями на основе акриловых пластмасс. В частности, в работе [4] было выявлено преобладание острофазного ответа на акрилат, который в основном проявлялся у женщин. Ряд авторов констатируют, что выраженность воспалительного процесса

в слизистой оболочке обусловлена изменениями количественного соотношения элементов, поддерживающих иммунный гомеостаз [6]. Другие исследователи отмечают, что при прогнозировании развития осложнений в виде протезных стоматитов целесообразно учитывать соматический статус пациентов и, с целью их предупреждения, использовать индивидуальные схемы лечебно-профилактических мероприятий [5]. Таким образом, при использовании полимерных материалов в качестве конструкционных, особенно в их новых сочетаниях, существует необходимость оценки вероятности развития иммунного ответа со стороны тканей протезного ложа и окружающей слизистой оболочки рта.

По данным Огородникова М.Ю. (2004) и Иорданишвили А.К. (2012) [4], исследования с целью улучшения качественных характеристик базисных материалов акрилового ряда ведутся в следующих направлениях: 1) модификация акриловых композиций методом сополимеризации; 2) армирование и наполнение акриловых базисов; 3) усовершенствование технологий лабораторного изготовления акриловых полимеров. Для увеличения срока службы съемных пластиночных протезов нами разработана технология изготовления нового комбинированного базиса полного съемного протеза с применением композиционного материала на основе стекловолокна. Композит, армированный стекловолокном, Trinia (фирмы Bicon, LLC, Бостон, США) — высокопрочный легкий материал, схожий по структуре с базисной пластмассой [11, 12]. Нами в предыдущих исследованиях [2] в сравнительном аспекте изучена микроструктура образцов акриловой пластмассы и комбинированных образцов — с введенным каркасом из композиционного материала Trinia (фирмы Bicon, LLC, Бостон, США), с анализом их устойчивости к воздействию внешних факторов, обуславливающих старение. Было выявлено, что при комбинации указанных компонентов наблюдается устойчивость к воздействию факторов старения и внешней среды. Наличие химической связи между акриловой пластмассой и композиционным материалом на основе стекловолокна, обеспечивает их интеграцию, что в свою очередь — в перспективе, будет способствовать повышению прочности базиса полного съемного пластиночного протеза. При этом, на наш взгляд, существует необходимость изучения влияния акриловой пластмассы и композиционного материала на основе стекловолокна на продукцию цитокинов мононуклеарными лейкоцитами человека. Ранее нами был предложен метод, предполагающий оценку иммунореактивности лимфоцитов в условиях *ex vivo* [3].

Цель исследований — на основе оригинальной методики [7], в эксперименте *ex vivo* изучить изменение уровня продукции ключевых цитокинов (IFN γ и IL-4) мононуклеарными лейкоцитами человека в присутствии акриловой пластмассы и КМ на основе стекловолокна.

Материалы и методы

Объектом исследования служили лейкоциты периферической венозной крови, полученной от 13 практически здоровых мужчин-добровольцев (средний возраст — 24 года). В исследование не включались женщины, поскольку на активность лейкоцитов существенное влияние оказывают женские половые гормоны, уровень которых циклически меняется [8].

Выделение лейкоцитов проводили из гепаринизированной крови путем градиентного центрифугирования. Клеточную взвесь разводили средой 199 в соотношении 1:1 и наслаивали на градиент плотности фиколл-верографин с плотностью 1,078 г/см³, после чего смесь центрифугировали при 1500 об/мин 45 мин. После сбора интерфазной части клеточную взвесь перемешивали и трижды отмывали. Культивирование осуществляли в пластиковых круглодонных 96-луночных планшетах. Каждая культура содержала 2×10^5 клеток в 0,2 мл полной культуральной среды. Последнюю готовили *ex tempore* на основе среды 199 с добавлением 2 мМ L-глутамина, 10 мМ HEPES (N-2-гидроксиэтилпиперазин-N'-2-этансульфоновая кислота), 100 мкг/мл гентамицина сульфата и 10% аутоплазмы. В качестве Т-клеточного митогена служил конканавалин А в концентрациях 5 мкг/мл. Культивирование осуществляли во влажной атмосфере с 5% CO₂ при 37 °С в течение 72 ч. По окончании срока инкубации культуральную жидкость стягивали в новые планшеты (без перемешивания с клеточной взвесью) и замораживали для последующего определения концентрации цитокинов. Использовали наборы реагентов для иммуноферментного определения концентрации IFN γ и IL-4 производства ЗАО «Вектор-Бест».

Дизайн эксперимента

В исследовании использовали образцы КМ двух типов:

- из акриловой пластмассы «Фторакс», полученные по технологии компрессионного прессования методом горячей полимеризации, в заранее заготовленных формах;
- из композиционного материала Trinia, полученные методом компьютерного фрезерования.

Размеры образцов: длина 3 мм, ширина 2 мм и толщина 1 мм. В качестве основного контроля служили образцы аналогичной формы и размера,

изготовленные из стекла. Образцы помещали в лунки планшета, после чего заполняли их клеточной взвесью и подготовленной питательной средой. В лунки для дополнительного контроля активации клеток образцы не вносили.

Статистический анализ проводился с помощью программного пакета Statistica 7.0. Вычислялась средняя арифметическая величина (M) и стандартная ошибка средней арифметической (m). Для проверки нормальности распределения использован критерий Шапиро–Уилка. В случае распределения приближенного к нормальному использовали критерий Стьюдента, в остальных применяли критерий Манна–Уитни для оценки значимости различий. Критический уровень значимости (p) при проверке статистических гипотез принимался равным 0,05.

Результаты и обсуждение

В ходе проведенных исследований выявлено, что численность жизнеспособных клеток в разных условиях эксперимента существенно не отличалась от таковой в контрольных пробах. В то же время продукция ключевого провоспалительного цитокина — IFN γ — в присутствии материала Trinia оказалась значимо ниже, чем в пробах со стеклом (на 67,7%), с образцами из акриловой пластмассы (на 163,5%), а также с пробами, куда стимуляторы или образцы не вносили (на 55,7%; табл. 1). Хотя на первый взгляд эти различия представляются маловероятными, подобный эффект может быть связан с избирательной адгезией гликированных протеинов. Такое связывание, скорее всего, меняет функциональную активность цитокина. Однако наличие и отдаленные последствия такого феномена требуют экспериментального подтверждения.

Продукция противовоспалительного цитокина интерлейкина-4 в пробах с полимерными материалами, стеклом и со спонтанной продукцией статистически значимо не отличались (табл. 1). При этом в пробах с Кон А (стимулированная продукция) наблюдалось существенное повышение продукции IL-4.

При расчете индивидуальных индексов стимуляции показано, что для лимфоцитов периферической крови только одного добровольца установлено стимулирующее влияние используемых в настоящем исследовании материалов, что выражалось в усилении цитокин-продуцирующей функции клеток. Такая ситуация может быть обусловлена тем, что лимфоциты этого добровольца получили предшествующее воздействие со стороны эндогенных факторов (например гормонов).

В целом полученные результаты указывают, что в присутствии материала Trinia проявляется противовоспалительная активность лейкоцитов,

ТАБЛИЦА 1. ПРОДУКЦИЯ ЦИТОКИНОВ МОНОНУКЛЕАРНЫМИ КЛЕТКАМИ В ПРИСУТСТВИИ ПОЛИМЕРНЫХ МАТЕРИАЛОВ (пг/мл)

TABLE 1. PRODUCTION OF CYTOKINES BY MONONUCLEAR CELLS IN THE PRESENCE OF POLYMERIC MATERIALS (pg/ml)

Цитокин Cytokines	Композиционный полимерный материал Trinia Composite polymer material Trinia	Акриловая пластмасса Фторакс Acrylic plastic Fluorax	Стекло Glass	Спонтанная продукция Spontaneous production	Кон А-стимулированная продукция Con A-stimulated products
IFN γ	30,7 $\pm$ 0,9* ^a #	80,9 $\pm$ 7,7 [#]	51,5 $\pm$ 1,8 [#]	47,8 $\pm$ 2,4 [#]	725,8 $\pm$ 28,5
IL-4	3,0 $\pm$ 0,5 [#]	2,7 $\pm$ 0,2 [#]	3,0 $\pm$ 0,3 [#]	2,1 $\pm$ 0,1 [#]	6,3 $\pm$ 0,3

Примечание. * – $p < 0,05$ при сравнении с пробами со стеклом; ^a – $p < 0,05$ при сравнении с пробами спонтанной продукции; [#] – $p < 0,05$ при сравнении с пробами Кон А-стимулированной продукции.

Note. *, $p < 0.05$ when compared with samples with glass; ^a, $p < 0.05$ when compared with samples of spontaneous production; [#], $p < 0.05$ when compared with samples of Con A-stimulated production.

когда уровень продукции IFN γ не повышается. Известно, что IFN γ является ключевым цитокином инициации провоспалительного иммунного ответа, который лежит в основе развития осложнений [10]. IFN γ осуществляет активацию тканевых макрофагов и в первую очередь с фенотипом M1, участвует в привлечении других субпопуляций клеток в область контакта КМ тканей организма и модулирует спектр цитокинов, что в итоге создает условия для элиминации чужеродного объекта.

Отсутствие повышения продукции IL-4 является благоприятным признаком, т. к., несмотря на противовоспалительную активность, этот цитокин участвует в развитии аллергических реакций. Показано, что тканевые тучные клетки могут участвовать в повреждении конструкционных материалов. Активация тучных клеток, их дегрануляция находятся под регулирующим влиянием IL-4 [14]. В гранулах тучных клеток содержится большое количество разнообразных ферментов, способных оказать деструктивное действие и на КМ, и на ткани человека, что в процессе использования таких конструкций нежелательно [7, 13].

Что же касается акриловой пластмассы, то полученные результаты подтверждают проведенные ранее исследования других авторов об иммунологических показателях в присутствии акрилатов [5]. Однако при анализе индивидуальных профилей продукции цитокинов, для половины добровольцев характерно существенное усиление продукции IFN γ лимфоцитами в присутствии акриловой пластмассы, что нивелируется при усреднении значений.

Заключение

Таким образом, в ходе проведенных исследований в условиях *ex vivo* был апробирован метод персонализированной оценки реактивности полимерных материалов, использующихся в качестве конструкционных для протезирования. Отсутствие повышения продукции IFN γ и IL-4 лимфоцитами может рассматриваться как благоприятный признак, предполагающий безопасность использования материала Trinia в качестве компонента базисов съемных протезов.

Список литературы / References

1. Арутюнов С.Д., Ибрагимов Т.И., Царев В.Н., Лебеденко И.Ю., Савкина Н.И., Трефилов А.Г., Арутюнов А.С., Климашин Ю.И. Микробиологическое обоснование выбора базисной пластмассы съемных зубных протезов // *Стоматология*, 2002. Т. 81, № 3. С. 4-8. [Arutyunov S.D., Ibragimov T.I., Tsarev V.N., Lebedenko I.Yu., Savkina N.I., Trefilov A.G., Arutyunov A.S., Klimashin Yu.I. Microbiological validation of the choice of basic plastic for removable dentures. *Stomatologiya = Stomatology*, 2002, Vol. 81, no. 3, pp. 4-8. (In Russ.)]
2. Асташина Н.Б., Бажин А.А., Сметкин А.А., Арутюнов А.С. Сравнительная оценка микроструктуры комбинированных образцов, изготовленных на основе акриловой пластмассы // *Стоматология*, 2021. Т. 100, № 4. С. 77-82. [Astashina N.B., Bazhin A.A., Smetkin A.A., Arutyunov A.S. Comparative evaluation of the microstructure of combined samples made on the basis of acrylic plastic. *Stomatologiya = Stomatology*, 2021, Vol. 100, no. 4, pp. 77-82. (In Russ.)]
3. Годовалов А.П., Якушева Д.Э., Бусырев Ю.Б., Морозов И.А., Карпунина Т.И., Астафьева С.А. Способ индивидуальной оценки биосовместимости с организмом имплантируемых полимерных материалов / Патент РФ. № 2743220 С1, заявл. 14.07.2020. [Godovalov A.P., Yakusheva D.E., Busyrev Yu.B., Morozov I.A., Karpunina T.I., Astafieva S.A. The method of individual assessment of biocompatibility with the body of implantable polymeric materials / RF Patent. No. 2743220 C1, application 07.14.2020].

4. Емгахов З.В., Антонова И.Н., Иорданишвили А.К. Сравнительная оценка биосовместимости основных видов стоматологических базисных полимеров (экспериментальное исследование) // Пародонтология, 2012. Т. 17, № 1 (62). С. 16-20. [Emgakhov Z.V., Antonova I.N., Iordanishvili A.K. Comparative assessment of the biocompatibility of the main types of dental basic polymers (experimental study). *Parodontologiya = Periodontology*, 2012, Vol. 17, no. 1 (62), pp. 16-20. (In Russ.)]
5. Майлян Э.А., Клемин В.А., Ворожко А.А. Иммунологические показатели в динамике протезирования акриловыми протезами // Вестник Волгоградского государственного медицинского университета, 2019. № 3 (71). С. 106-109. [Maylyan E.A., Klemen V.A., Vorozhko A.A. Immunological indicators in the dynamics of protesiation with acrylic protests. *Vestnik Volgogradskogo gosudarstvennogo meditsinskogo universiteta = Journal of Volgograd State Medical University*, 2019, no. 3 (71), pp. 106-109. (In Russ.)]
6. Мухлаев С.Ю., Первов Ю.Ю., Юркевич А.В. Влияние акриловых базисных пластмасс различных производителей на параметры иммунного гомеостаза слизистой оболочки рта // Тихоокеанский медицинский журнал, 2014. № 3 (57). С. 56-58. [Mukhlaev S.Yu., Pervov Yu.Yu., Yurkevich A.V. Influence of the acrylic basic plastics of various manufacturers on the immune homeostasis parameters of the mouth mucous membrane. *Tikhookeanskiy meditsinskiy zhurnal = Pacific Medical Journal*, 2014, no. 3 (57), pp. 56-58. (In Russ.)]
7. Романова Ю.Г., Лепский В.В., Жижикин О.И. Частота проявления аллергических реакций в полости рта на акриловые пластмассы // Вестник стоматологии, 2011. № 2 (75). С. 78-80. [Romanova Yu.G., Lepsky V.V., Zhizhikin O.I. The frequency of the displays of allergic reactions to acrylic resins in oral cavity. *Vestnik stomatologii = Bulletin of Dentistry*, 2011, no. 2 (75), pp. 78-80. (In Russ.)]
8. Шилов Ю.И., Шилов С.Ю., Жукова А.Е., Барков С.Ю., Петухова А.А. Изменение уровня ацидификации фагосом у крыс в зависимости от фазы эстрального цикла // Российский иммунологический журнал, 2016. Т. 10, № 2. С. 183. [Shilov Yu.I., Shilov S.Yu., Zhukova A.E., Barkov S.Yu., Petukhova A.A. Changes in the level of acidification of phagosomes in rats depending on the phase of the estrous cycle. *Rossiyskiy immunologicheskiy zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2016, Vol. 10, no. 2, pp. 183. (In Russ.)]
9. Athanasou N.A. The pathobiology and pathology of aseptic implant failure. *Bone Joint Res.*, 2016, Vol. 5, no. 5, pp. 162-168.
10. Baseri M., Radmand F., Hamed R., Yousefi M., Kafil H.S. Immunological aspects of dental implant rejection. *Biomed. Res. Int.*, 2020, Vol. 2020, 7279509. doi: 10.1155/2020/7279509.
11. Biris C., Sver-Bechir E., Bechir A., Curt-Mola F., Caraiane A., Viorel-Badiu A. Trinia reinforced polymer as core for implants superstructure. *Mater. Plast.*, 2017, Vol. 54, no. 4, pp. 764-767.
12. Ewers R., Perpetuini P., Morgan V.J., Marincola M., Wu R., Seemann R. TRINIA™ – metal-free restorations. *Implants*, 2017, Vol. 1, pp. 22-27.
13. Kenry Liu B. Recent advances in biodegradable conducting polymers and their biomedical applications. *Biomacromolecules*, 2018, Vol. 19, no. 6, pp. 1783-1803.
14. McLeod J.J., Baker B., Ryan J.J. Mast cell production and response to IL-4 and IL-13. *Cytokine*, 2015, Vol. 75, no. 1, pp. 57-61.
15. Noonan K.Y., Lopez I.A., Ishiyama G., Ishiyama A. Immune response of macrophage population to cochlear implantation: cochlea immune cells. *Otol. Neurotol.*, 2020, Vol. 41, no. 9, pp. 1288-1295.

Авторы:

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

Асташина Н.Б. — д.м.н., профессор кафедры ортопедической стоматологии ФГБОУ ВО «Пермский государственный медицинский университет имени академика Е.А. Вагнера» Министерства здравоохранения РФ, г. Пермь, Россия

Бажин А.А. — ассистент кафедры ортопедической стоматологии ФГБОУ ВО «Пермский государственный медицинский университет имени академика Е.А. Вагнера» Министерства здравоохранения РФ, г. Пермь, Россия

Дрокина Т.А. — доцент кафедры ортопедической стоматологии ФГБОУ ВО «Пермский государственный медицинский университет имени академика Е.А. Вагнера» Министерства здравоохранения РФ, г. Пермь, Россия

Authors:

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

Astashina N.B., PhD, MD (Medicine), Professor, Department of Prosthetic Dentistry, E.A.Vagner Perm State Medical University, Perm, Russian Federation

Bazhin A.A., Assistant Professor, Department of Prosthetic Dentistry, E.A.Vagner Perm State Medical University, Perm, Russian Federation

Drokina T.A., Associate Professor, Department of Prosthetic Dentistry, E.A.Vagner Perm State Medical University, Perm, Russian Federation

Поступила 07.02.2022
Принята к печати 13.02.2022

Received 07.02.2022
Accepted 13.02.2022

ВЛИЯНИЕ ОСТРОГО ХОЛОДОВОГО СТРЕССА НА СЕКРЕЦИЮ IL-2, IL-4, IFN γ , IL-12 СПЛЕНОЦИТАМИ МЫШИ IN VIVO

Шаравьева И.Л.^{1,2}, Гейн С.В.^{1,2}

¹ Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук — филиал
ФГБУН «Пермский федеральный исследовательский центр» УрО РАН, г. Пермь, Россия

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

Резюме. Холодовой стресс индуцируется действием низкой температуры окружающей среды (воздух, вода) и оказывает существенное влияние на функционирование иммунной системы — модулирует пролиферацию лимфоцитов, секрецию цитокинов клетками врожденного и адаптивного иммунитета, экспрессию мРНК. Однако механизмы, ответственные за влияние холода на иммунитет остаются неясными. Ранее нами было показано, что холодовой стресс выражено модулирует реакции врожденного иммунитета — приводит к усилению секреции макрофагами активных форм кислорода, IL-10, но не влияет на продукцию провоспалительных цитокинов IL-1 β и TNF α . Цель работы — оценить влияние острого холодового стресса на показатели адаптивного иммунитета: антителообразование, продукцию спленоцитами мыши IL-2, IL-4, IFN γ , а также на продукцию IL-12 и кислородных радикалов с учетом временной динамики. Объектом исследования служили белые мыши самцы. Животные были разбиты на следующие группы: 1-я — контрольная, 2-я — холодовой стресс — 20 °C 10 мин, 3-я — холодовой стресс — 20 °C 60 мин. Одну часть животных через 1 ч после окончания экспериментальных воздействий внутрибрюшинно сенсибилизировали эритроцитами барана (10^8 клеток в 0,2 мл в 0,9% NaCl). На 5-е сутки оценивали в селезенке число антителообразующих клеток методом локального гемолиза в геле агарозы. Другую часть мышей — через 1 и 6 ч после окончания стрессорного воздействия выводили из эксперимента, выделяли селезенку и клетки перитонеальной полости. Определение концентрации цитокинов в супернатантах проводили с использованием иммуноферментных тест-систем, продукцию активных форм кислорода перитонеальными макрофагами оценивали с помощью реакции люминолзависимой хемилюминесценции. Установлено, что 10- и 60-минутный холодовой стресс не оказывали статистически значимого влияния на антителообразование, спонтанную и стимулированную продукцию IL-4 спленоцитами, на фоне 60-минутного стресса наблюдалось угнетение продукции IL-2. В то же время оба варианта стресса угнетали продукцию спленоцитами IFN γ , у животных, подвергнутых 60-минутному охлаждению, было выявлено также снижение продукции IL-12. Помимо этого, 60-минутный стресс приводил к выраженному и стойкому увеличению продукции кислородных радикалов, которые могут оказывать негативное влияние на развитие иммунных реакций. Таким образом, острый холодовой стресс приводил к угнетению продукции спленоцитами цитокинов Т-клеточного звена иммунитета.

Ключевые слова: холодовой стресс, IL-4, IL-12, IFN γ , спленоциты, макрофаги, активные формы кислорода, антителообразование

Адрес для переписки:

Шаравьева Ирина Леонидовна
Институт экологии и генетики микроорганизмов
Уральского отделения Российской академии наук
614000, Россия, г. Пермь, ул. Ленина, 11.
Тел.: 8 (912) 781-81-25.
E-mail: irin.sh@gmail.com

Address for correspondence:

Sharavyeva Irina L.
Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms
614000, Russian Federation, Perm, Lenin str., 11.
Phone: 7 (912) 781-81-25.
E-mail: irin.sh@gmail.com

Образец цитирования:

И.Л. Шаравьева, С.В. Гейн «Влияние острого холодового стресса на секрецию IL-2, IL-4, IFN γ , IL-12 спленоцитами мыши in vivo» // Медицинская иммунология, 2022. Т. 24, № 4. С. 843–848.
doi: 10.15789/1563-0625-IOA-2383
© Шаравьева И.Л., Гейн С.В., 2022

For citation:

I.L. Sharavyeva, S.V. Gein “Influence of acute cold stress on the secretion of IL-2, IL-4, IFN γ , IL-12 in vivo by mouse splenocytes”, *Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2022, Vol. 24, no. 4, pp. 843–848.
doi: 10.15789/1563-0625-IOA-2383
DOI: 10.15789/1563-0625-IOA-2383

INFLUENCE OF ACUTE COLD STRESS ON THE SECRETION OF IL-2, IL-4, IFN γ , IL-12 *IN VIVO* BY MOUSE SPLENOCYTES

Sharavyeva I.L.^a, Gein S.V.^{a, b}

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

^b Perm State University, Perm, Russian Federation

Abstract. Current literature contains a large amount of data on the modifying effect of cold stress on the functions of immune cell system, in particular, on the secretion of cytokines by the cells of innate and adaptive immunity, mRNA expression. However, the modulatory mechanisms of cold stress effects upon immune response are still not studied in details. We have previously shown that cold stress strongly modulates innate immunity reactions, in particular, leads to increased macrophage secretion of reactive oxygen species, IL-10, but does not affect production of pro-inflammatory cytokines (IL-1 β and TNF α). In this work, we aimed for evaluation of effects exerted by acute cold stress upon some adaptive immunity indices, i.e., antibody synthesis, production of IL-2, IL-4, IFN γ by murine splenocytes as well as production of IL-12 and oxygen radicals, taking into account appropriate time-dependent changes. **Materials and methods.** White male mice were the object of the present study. The animals were divided into the following groups: 1st (control), 2nd (cold stress exposure, at -20 °C for 10 min), 3rd (cold stress at -20 °C for 60 min). Subgroups of the animals were intraperitoneally sensitized with sheep erythrocytes (10⁸ cells in 0.2 ml in 0.9% NaCl) one hour after ending of the cold exposure. On the day 5, the number of antibody-forming cells in the spleen was assessed by the method of local hemolysis in agarose gel. The other subgroup of animals was removed from the experiment 1 and 6 hours after the end of stress exposure, the spleen and cells were isolated from peritoneal cavity. The cytokine concentrations in supernatants were determined by means of enzyme-linked immunosorbent assay systems; production of reactive oxygen species in peritoneal cells was assessed using a luminol-dependent chemiluminescence reaction. It was established that 10- and 60-min cold stress did not have a statistically significant effect on the antibody production, spontaneous and stimulated production of IL-4 by splenocytes. However, inhibition of IL-2 production was observed 60 min following cold stress of either type. At the same time, inhibited IFN γ production was revealed after the both stress regimens. In the animals subjected to cooling for 60 min, a decrease in IL-12 production was also detected. In addition, the 60-min stress led to a pronounced and persistently increased production of oxygen radicals, which may exert negative effects on the development of immune responses. Hence, the acute cold stress led to inhibition of the production of cytokines related to the T cell immune response.

Keywords: cold stress, IL-4, IL-12, IFN γ , splenocytes, macrophages, reactive oxygen species, antibody secretion

Работа выполнена в рамках государственного задания, номер государственной регистрации темы № АААА-А19-119112290007-7.

Введение

Двунаправленные нейроиммунные взаимодействия оказывают выраженное влияние на реакции врожденного и адаптивного иммунитета, в том числе антителогенез, цитолитическую активность и пролиферацию лимфоцитов, продукцию про- и противовоспалительных цитокинов, тем самым поддерживая постоянство внутренней среды организма. Изменение гормонального баланса при стрессе преимущественно приводит к подавлению иммунных реакций, последствиями которого являются увеличение восприимчивости организма к инфекциям, усиление онкогенеза, обострение аутоиммунных состояний [9]. Интересным является тот факт, что некоторые

виды стрессов и умеренные физические нагрузки могут усиливать иммунный ответ [6]. Холодовой стресс является одной из форм стресса и индуцируется действием низкой температуры окружающей среды (воздух, вода). Показано, что Т-клеточное звено иммунитета как при остром, так и при хроническом холодовом стрессе может активироваться, а продукция IFN γ — возрастать. По одним данным концентрация IFN γ в сыворотке крови при остром холодовом стрессе повышалась, тогда как при хроническом — снижалась [13]. По данным других авторов, холодовой стресс приводил к повышению продукции IFN γ спленоцитами мыши независимо от типа стимуляции [5] или продолжительности воздействия [14]. Ранее нами было показано, что холодовой стресс оказывает выраженное действие на реакции врожденного иммунитета, в частности усиливает секрецию IL-10, модулирует продук-

цию активных форм кислорода, но не влияет на продукцию провоспалительных цитокинов IL-1 и TNF α [3]. В настоящей работе мы оценили влияние острого холодного стресса на показатели адаптивного иммунитета: антителогенез, продукцию спленоцитами мыши IL-2, IL-4, IFN γ , а также на продукцию IL-12 и кислородных радикалов перитонеальными макрофагами с учетом временной динамики.

Материалы и методы

Эксперимент выполнен на белых мышах самцах массой тела 20–22 г. Животные содержались в условиях лабораторного вивария, при естественном освещении, неограниченном доступе к воде и кормам. Эксперименты проведены в соответствии с этическими нормами и рекомендациями по гуманизации работы с лабораторными животными, отраженными в «Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей» (Страсбург, 1986).

Мыши подвергались острому переохлаждению при -20°C в течение 10 или 60 мин. Все животные были разбиты на следующие группы: 1-я — контрольная, 2-я — холодовой стресс 10 мин, 3-я — холодовой стресс 60 мин. Одну половину животных через 1 ч после окончания экспериментальных воздействий внутрибрюшинно сенсибилизировали эритроцитами барана (10^8 клеток в 0,2 мл в 0,9% NaCl). На 5-е сутки оценивали в селезенке число антителообразующих клеток (АОК) методом локального гемолиза в геле агарозы [8]. Вторую половину мышей — через 1 и 6 ч после окончания стрессорного воздействия выводили из эксперимента методом декапитации под эфирным наркозом, выделяли селезенку и клетки перитонеальной полости.

Для определения продукции цитокинов спленоциты культивировали в среде RPMI 1640 с добавлением 10% инактивированной фетальной сыворотки, 100 ЕД/мл гентамицина, в 24-луночных планшетах содержащих $2,5 \times 10^6$ кл/мл. В качестве индуктора использовали конканавалин А (КонА, Sigma; 20 мкг/мл). Супернатанты 12 ч (IL-12p70) и 48 ч (IL-2, IL-4, IFN γ) культур собирали в пробирки «Эппендорфф», замораживали и хранили при -20°C . Определение концентрации цитокинов в супернатантах проводили с использованием иммуноферментных тест-систем (R&D, США).

Оценку продукции активных форм кислорода (АФК) перитонеальными макрофагами осуществляли с использованием реакции люминолзависимой хемилюминесценции (ЛХЗЛ). Реакцию проводили в 96-луночных плоскодонных планшетах, каждая лунка содержала 10^5 клеток в

100 мкл раствора Хенкса. В качестве индуктора ЛХЗЛ использовали опсонизированный зимозан в концентрации 150 мкг/мл. В качестве маркера выраженности реакции ЛХЗЛ использовался люминол 10^{-5}M (Sigma). Регистрация результатов проводилась в течение часа с интервалом в 5 мин с помощью многофункционального спектрофотометра TECAN (Австрия).

Статистическая обработка результатов проведена с использованием непарного однофакторного дисперсионного анализа и LSD-критерия для межгруппового сравнения. Все данные на рисунках представлены в виде средней и ее стандартной ошибки ($M \pm m$).

Результаты и обсуждение

Установлено, что через 1 ч после окончания 10 и 60 мин холодовой стресс не оказывал статистически значимого влияния на антителогенез, спонтанную и стимулированную продукцию IL-4 спленоцитами. Стимулированная продукция IL-2 на фоне 10-минутного стресса также не изменялась, а на фоне 60-минутного стресса — угнеталась. В культурах нестимулированных клеток IL-2 не детектировался (табл. 1).

Выраженный эффект двух вариантов острого холодowego стресса был выявлен в отношении продукции IFN γ . Как видно из рисунка 1, обе экспериментальные модели угнетали спонтанную продукцию IFN γ через 1 ч после окончания действия стресса, через 6 ч — интенсивность спонтанной продукции IFN γ у стрессированных животных статистически значимо не отличалась от контрольной группы. В стимулированных культурах угнетающее влияние на секрецию IFN γ было зарегистрировано у животных, подвергнутых 60-минутному стрессу как через 1 ч, так и через 6 ч после воздействия. 10-минутный стресс через 6 ч на стимулированную продукцию цитокина значимого влияния не оказывал, однако можно отметить имеющую место выраженную тенденцию к угнетению данного показателя.

В дальнейшем мы оценили влияние стресса на продукцию спленоцитами IL-12, который, как известно, направляет дифференцировку Т-хелперов в направлении Th1-клеток и индуцирует продукцию IFN γ . В спонтанных культурах IL-12 не детектировался, однако в стимулированных КонА культурах продукция IL-12 на фоне 60-минутного стресса статистически значимо снижалась как через 1 ч, так и через 6 ч после окончания стрессорного воздействия, 10-минутный стресс на секрецию IL-12 не влиял.

Учитывая, что продуцентами IL-12 являются клетки моноцитарно-макрофагального ряда, дополнительно мы оценили продукцию активных форм кислорода макрофагами перитонеальной

ТАБЛИЦА 1. ВЛИЯНИЕ ХОЛОДОВОГО СТРЕССА НА КОЛИЧЕСТВО АОК В СЕЛЕЗЕНКЕ И ПРОДУКЦИЮ СПЛЕНОЦИТАМИ IL-2 И IL-4

TABLE 1. EFFECT OF COLD STRESS ON THE NUMBER OF PFC IN THE SPLEEN AND SPLENOCYTE PRODUCTION OF IL-2 AND IL-4

Воздействие Experimental impact	Log ₁₀ АОК/орган Log ₁₀ PFC/spleen	IL-2 (пг/мл) IL-2 (pg/ml)		IL-4 (пг/мл) IL-4 (pg/ml)	
		Спонтанная Spontaneous	КонА ConA	Спонтанная Spontaneous	Кон А Con A
Контроль Control	4,43±0,14 (n = 12)	0 (n = 18)	301,58±55,05 (n = 18)	0,84±0,34 (n = 19)	33,60±8,97 (n = 19)
Стресс 10 мин Stress 10 min	4,58±0,18 (n = 6)	0 (n = 11)	287,75±32,90 (n = 11)	0,97±0,79 (n = 9)	39,88±9,15 (n = 9)
Стесс 60 мин Stress 60 min	4,07±0,26 (n = 10)	0 (n = 10)	154,84±29,23* (n = 10)	2,34±1,29 (n = 10)	31,91±8,27 (n = 10)

Примечание: * – p < 0,05 по сравнению с контролем.

Note. *, p < 0.05 to control.

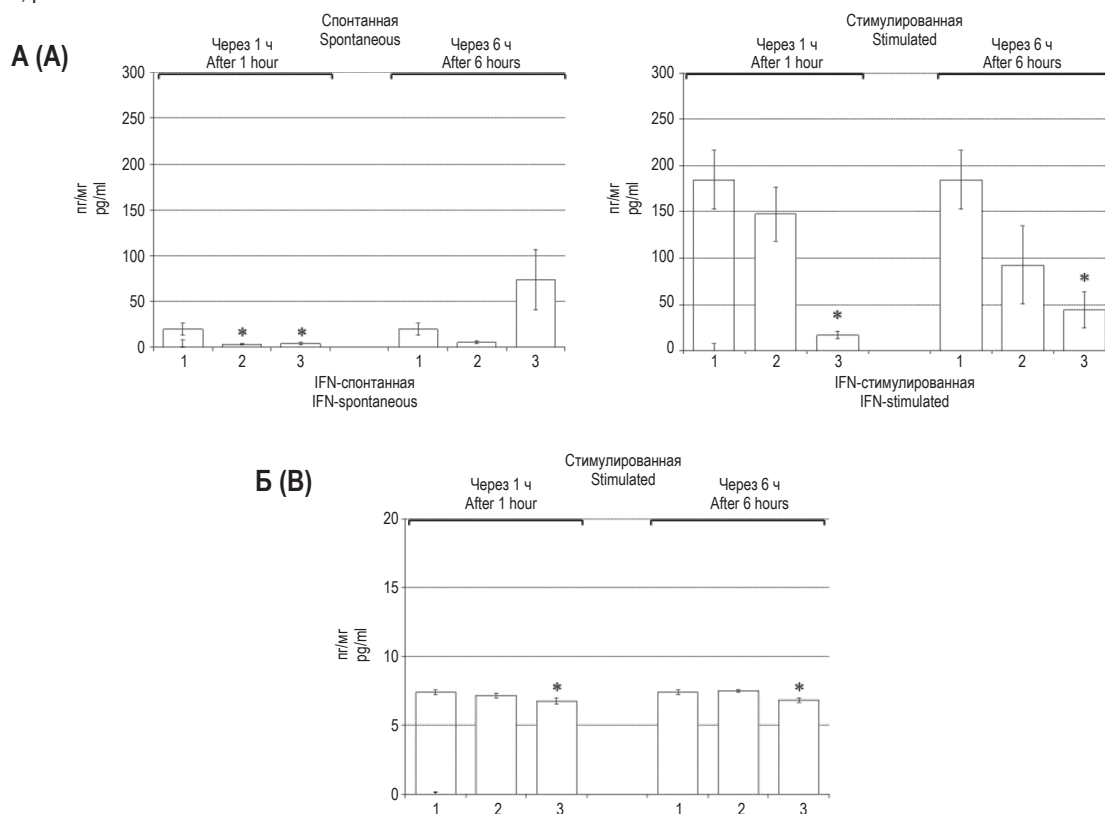


Рисунок 1. Влияние холодового стресса на спонтанную и стимулированную продукцию IFN γ (А) и стимулированную продукцию IL-12 (Б) спленоцитами мыши *in vivo* через 1 и через 6 ч после окончания воздействия

Примечание. По оси абсцисс: 1 – контроль, 2 – стресс 10 мин, 3 – стресс 60 мин. * – p < 0,05 по отношению к контролю. n = 9 в каждой выборке.

Figure 1. Cold stress effect on spontaneous and stimulated production of IFN γ (A) and stimulated production of IL-12 (B) by mouse splenocytes *in vivo* after 1 and 6 hours stress

Note. On axis x: 1, control; 2, stress 10 min; 3, stress 60 min. *, p < 0.05 to control. n = 9 in each sample.

полости мышей через 1 и 6 ч после окончания стресса (рис. 2). Установлено, что через 1 ч после окончания стресса 10-минутный стресс не влиял на спонтанную и угнетал стимулированную

продукцию АФК. Стресс в течение 60 мин активировал и спонтанную и стимулированную продукцию АФК. Через 6 ч после окончания действия 10-минутного стресса эффектов на спонтанную и

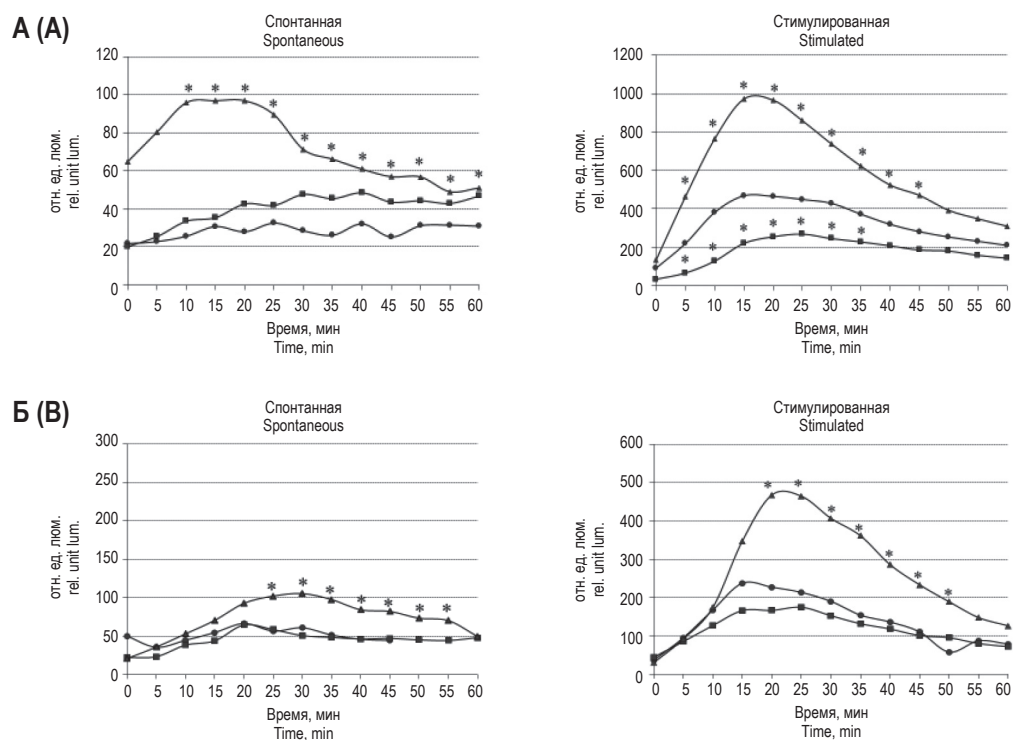


Рисунок 2. Влияние холодного стресса на спонтанную и стимулированную продукцию АФК через 1 (А) и через 6 ч (Б) после окончания воздействия

Примечание. ● – контроль; ■ – стресс 10 мин; ▲ – стресс 60 мин. * – $p < 0,05$ по отношению к контролю. $n = 9$ в каждой выборке.

Figure 2. Cold stress effect on spontaneous and stimulated ROS production after 1 (A) and 6 hours (B) stress

Note. ●, control; ■, stress 10 min; ▲, stress 60 min. *, $p < 0.05$ to control. $n = 9$ in each sample.

стимулированную продукцию АФК не выявлено, однако у мышей, подвергнутых 60-минутному стрессу, повышенная секреция АФК сохранялась.

Таким образом, острый холодный стресс приводил к угнетению продукции спленocyтaми цитокинов Т-клеточного звена иммунитета, которое сохранялось в течение 6 ч после окончания действия стресса. Ранее было показано, что при остром холодном стрессе на уровне транскрипции происходит увеличение экспрессии мРНК к большому количеству цитокинов [6], в том числе к IL-2, IL-4, IFN γ . Однако, как показывают полученные данные, спонтанная и стимулированная секреция клетками селезенки IFN γ , даже при непродолжительном холодном стрессе, снижается, что в свою очередь согласуется с результатами, полученными другой исследовательской группой [4]. При этом, несмотря на изменение продукции отдельных цитокинов, в общем адаптивный иммунитет слабо реагировал на холодный стресс, не менялся такой интегральный показатель как количество АОК, не изменялась динамика секреции IL-4. Если провести параллели с другими моделями стресса, то, например, 60-минутный ротационный стресс выражено модулировал пролиферацию спленocyтa и образование АОК в селезенке [1]. При этом уровни кортикостерона в периферической крови у холодной и ротацион-

ной модели были сопоставимо высокими [2, 3]. Однако не только гормоны коры надпочечников могут быть ответственны за подавление функциональной активности клеток иммунной системы. Иммуносупрессия при холодном стрессе также может быть связана и с продукцией макрофагами активных форм кислорода. Есть данные, указывающие на негативное влияние кислородных радикалов на иммунный ответ [10, 11]. Как видно из полученных нами результатов, наиболее сильное супрессорное влияние на продукцию IL-2, IFN γ и IL-12 выявлено у 60-минутного стресса, эта же модель приводила к выраженному и стойкому увеличению продукции кислородных радикалов. Анализ временной динамики изменения показателей выявил более выраженное и длительное действие 60 мин воздействия, эффекты которого сохранялись через 6 ч после стресса. Влияние 10 мин стресса носило более кратковременный характер и через 6 ч после окончания стресса практически нивелировалось.

Закключение

Подводя общий итог, можно сказать, что острый холодный стресс угнетает продукцию цитокинов, ответственных за процесс Th1-поляризации Т-клеток и, как следствие, тормозит реакции клеточного звена иммунитета.

Список литературы / References

1. Гейн С.В., Шаравьева И.Л. Влияние блокады опиатных рецепторов на антителогенез и пролиферативный ответ спленоцитов при стрессе // Экспериментальная и клиническая фармакология, 2013. Т. 76, № 1. С. 30-34. [Gein S.V., Sharavyeva I.L. Effect of opioid receptor blockade on antibody response and proliferative response under stress conditions. *Eksperimentalnaya i klinicheskaya farmakologiya = Russian Journal of Experimental and Clinical Pharmacology*, 2013, Vol. 76, no. 1, pp. 30-34. (In Russ.)]
2. Гейн С.В., Шаравьева И.Л. Влияние блокады опиатных рецепторов на микробицидный потенциал и продукцию ИЛ-1 β , ФНО- α и ИЛ-10 перитонеальными макрофагами в условиях стресса // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины, 2016. Т. 161, № 3. С. 313-317. [Gein S.V., Sharavyeva I.L. Effect of opiate receptor blockade on microbicidal potential and production of IL-1 β , TNF- α and IL-10 by peritoneal macrophages under stress. *Byulleten eksperimentalnoy biologii i meditsiny = Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 2016, Vol. 131, no. 3, pp. 313-317. (In Russ.)]
3. Гейн С.В., Шаравьева И.Л. Влияние холодового стресса на функциональную активность перитонеальных макрофагов мыши в условиях блокады опиатных рецепторов // Российский физиологический журнал им. Сеченова, 2016. Т. 102, № 2. С. 188-194. [Gein S.V., Sharavyeva I.L. Influence of cold stress on functional activity of mouse peritoneal macrophages under opiate receptors blockade. *Rossiyskiy fiziologicheskiy zhurnal im. Sechenova = Russian Journal of Physiology*, 2016, Vol. 102, no. 2, pp. 188-194. (In Russ.)]
4. Макарова О.В., Трунова Г.В., Диатроптов М.Е., Серебряков С.Н., Кондашевская М.В., Малайцев В.В. Сравнительная характеристика продукции цитокинов активированными конканавалином А спленоцитами мышей BALB/C и C57BL/6 при холодном воздействии // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины, 2005. Т. 139, № 2. С. 188-190. [Makarova O.V., Trunova G.V., Diatroptov M.E., Serebryakov S.N., Kondashevskaya M.V., Malaitsev V.V. Comparative characterization of cytokine production by concanavalin A-activated splenocytes from BALB/C and C57BL/6 mice after cold exposure. *Byulleten eksperimentalnoy biologii i meditsiny = Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 2005, Vol. 139, no. 2, pp. 220-222. (In Russ.)]
5. Aviles H., Johnson M.T., Monroy F.P. Effects of cold stress on spleen cell proliferation and cytokine production during chronic *Toxoplasma gondii* infection. *Neuroimmunomodulation*, 2004, Vol. 11, no. 2, pp. 93-102.
6. Hangalapura B.N., Nieuwland M.G., de Vries Reilingh G., Heetkamp M.J., van den Brand H., Kemp B., Parmentier H.K. Effects of cold stress on immune responses and body weight of chicken lines divergently selected for antibody responses to sheep red blood cells. *Poult. Sci.*, 2003, Vol. 82, no. 11, pp. 1692-1700.
7. Hangalapura B.N., Kaiser M.G., Poel J.J., Parmentier H.K., Lamont S.J.. Cold stress equally enhances *in vivo* pro-inflammatory cytokine gene expression in chicken lines divergently selected for antibody responses. *Dev. Comp. Immunol.*, 2006, Vol. 30, no. 5, pp. 503-511.
8. Jerne N.K., Nordin A.A. Plaque formation in agar by single antibody-producing cells. *Science*, 1963, Vol. 140, no. 3565, 405. doi: 10.1126/science.140.3565.405.
9. McEwen B.S., Biron C.A., Brunson K.W., Bulloch K., Chambers W.H., Dhabhar F.S., Goldfarb R.H., Kitson R.P., Miller A.H., Spencer R.L. Weiss J.M. The role of adrenocorticoids as modulators of immune function in health and disease: neural, endocrine and immune interactions. *Brain Res. Brain Res. Rev.*, 1997, Vol. 23, no. 1-2, pp. 79-133.
10. Palermo-Neto J., de Oliveira Massoco C., de Souza W.R. Effects of physical and psychological stressors on behavior, macrophage activity, and Ehrlich tumor growth. *Brain Behav. Immun.*, 2003, Vol. 17, no. 1, pp. 43-54.
11. Riquelme P., Tomiuk S., Kammler A., Fändrich F., Schlitt H.J., Geissler E.K., Hutchinson J.A. IFN- γ -induced iNOS expression in mouse regulatory macrophages prolongs allograft survival in fully immunocompetent recipients. *Mol. Ther.*, 2013, Vol. 21, no. 2, pp. 409-422.
12. Zhang Z., Chen B., Yuan L., Niu C. Acute cold stress improved the transcription of pro-inflammatory cytokines of Chinese soft-shelled turtle against *Aeromonas hydrophila*. *Dev. Comp. Immunol.*, 2015, Vol. 49, no. 1, pp. 127-137.
13. Zhao F.Q., Zhang Z.W., Qu J.P., Yao H.D., Li M., Li S., Xu S.W. Cold stress induces antioxidants and Hsps in chicken immune organs. *Cell Stress Chaperones*, 2014, Vol. 19, no. 5, pp. 635-648.
14. Zhao F.Q., Zhang Z.W., Yao H.D., Wang L.L., Liu T., Yu X.Y., Li S., Xu S.W. Effects of cold stress on mRNA expression of immunoglobulin and cytokine in the small intestine of broilers. *Res. Vet. Sci.*, 2013, Vol. 95, no. 1, pp. 146-155.

Авторы:

Шаравьева И.Л. — к.б.н., научный сотрудник лаборатории биохимии развития микроорганизмов, Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук, г. Пермь, Россия

Гейн С.В. — д.м.н., директор Института экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук; профессор кафедры микробиологии и иммунологии ФГБОУ ВО «Пермский государственный национальный исследовательский университет», г. Пермь, Россия

Authors:

Sharavyeva I.L., PhD (Biology), Research Associate, Laboratory of Developmental Biochemistry of Microorganisms, Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Perm, Russian Federation

Gein S.V., PhD, MD (Medicine), Director, Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Ural Branch, Russian Academy of Sciences; Professor, Department of Microbiology and Immunology, Perm State University, Perm, Russian Federation

Поступила 02.07.2021
Принята к печати 04.01.2022

Received 02.07.2021
Accepted 04.01.2022

ИССЛЕДОВАНИЕ АССОЦИИ ПОЛИМОРФИЗМА Arg753Gln (rs574308) ГЕНА TOLL-ПОДОБНОГО РЕЦЕПТОРА 2 (TLR2) С РИСКОМ РАЗВИТИЯ САРКОИДОЗА ЛЕГКИХ (НА ПРИМЕРЕ ЖИТЕЛЕЙ КАРЕЛИИ)

Малышева И.Е.¹, Топчиева Л.В.¹, Тихонович Э.Л.²

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

² ГБУЗ «Республиканская больница имени В.А. Баранова», г. Петрозаводск, Россия

Резюме. Генетические факторы играют важную роль в развитии и прогрессировании многих патологий, к числу которых относится саркоидоз легких. Это системное воспалительное гранулематозное заболевание неизвестной этиологии, характеризующееся образованием в пораженных тканях эпителиоидноклеточных гранул. Интенсивность развития воспалительного ответа может зависеть от многих факторов, в том числе от генетического фона организма. Генетический фон может определять не только восприимчивость людей к возникновению саркоидоза легких, но также клинические характеристики протекания данного заболевания и силу развития воспалительных реакций со стороны иммунной системы. В числе генетических факторов может выступать аллельный полиморфизм генов. У носителей определенных аллельных вариаций генов можно наблюдать либо увеличение, либо уменьшение продукции провоспалительных факторов. Среди генов-кандидатов, чьи продукты могут быть вовлечены в восприимчивость людей к формированию гранулемы — гены, кодирующие Toll-подобные рецепторы (Toll-like receptors, TLRs). Сведения о связи носительства аллельных вариаций указанных генов с восприимчивостью к саркоидозу легких, а также вклад полиморфных вариантов этих генов в развитие, прогрессирование и терапию данного заболевания еще весьма малочисленны и зачастую противоречивы.

Цель исследования заключалась в изучении связи полиморфизма Arg753Gln (rs574308) гена Toll-подобного рецептора 2 (TLR2) с риском развития саркоидоза легких.

Обследовано 253 человека (122 больных русской национальности (проживающих в Республике Карелия)) с диагнозом «морфологически верифицированный саркоидоз с поражением легких» (ср. возраст — $41,00 \pm 12,56$ года) и 131 здоровый донор (контрольная группа) (ср. возраст — $44,00 \pm 14,23$ года). Исследовано распределение аллелей и генотипов по полиморфному маркеру Arg753Gln (rs574308) гена TLR2 в группе больных саркоидозом легких и в группе здоровых доноров. Идентификацию аллелей данного полиморфного маркера проводили методом полимеразной цепной реакции с последующим анализом длин рестрикционных фрагментов (ПЦР-ПДРФ метод).

Статистически значимых различий в распределении частот аллелей и генотипов полиморфному маркеру Arg753Gln (rs574308) гена TLR2 между контрольной группой и группой больных саркоидозом легких не выявлено: $\chi^2 = 2,0$, $df = 1$, $p = 0,158$ и $\chi^2 = 2,19$, $df = 2$, $p = 0,140$ соответственно.

Полиморфный маркер Arg753Gln (rs574308) гена Toll-подобного рецептора 2 не связан с риском развития саркоидоза легких у русского населения Республики Карелия.

Ключевые слова: саркоидоз легких, Toll-подобные рецепторы, ген TLR2, генетический полиморфизм, rs574308, ассоциация

Адрес для переписки:

Малышева Ирина Евгеньевна
Институт биологии
185910, Россия, г. Петрозаводск, ул. Пушкинская, 11.
Тел.: 8 (8142) 57-31-07.
Факс: 8 (8142) 76-98-10.
E-mail: i.e.malysheva@yandex.ru

Address for correspondence:

Malysheva Irina E.
Institute of Biology
185910, Russian Federation, Petrozavodsk, Pushkinskaya str., 11.
Phone: 7 (8142) 57-31-07.
Fax: 7 (8142) 76-98-10.
E-mail: i.e.malysheva@yandex.ru

Образец цитирования:

И.Е. Малышева, Л.В. Топчиева, Э.Л. Тихонович
«Исследование ассоциации полиморфизма Arg753Gln (rs574308) гена Toll-подобного рецептора 2 (TLR2) с риском развития саркоидоза легких (на примере жителей Карелии)» // Медицинская иммунология, 2022. Т. 24, № 4. С. 849-852.

doi: 10.15789/1563-0625-ABA-2496

© Малышева И.Е. и соавт., 2022

For citation:

I.E. Malysheva, L.V. Topchieva, E.L. Tikhonovich
“Association between Arg753Gln (rs574308) polymorphism of the Toll-like receptor 2 (TLR2) gene and the risk of pulmonary sarcoidosis among the residents of Karelia”, Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2022, Vol. 24, no. 4, pp. 849-852.

doi: 10.15789/1563-0625-ABA-2496

DOI: 10.15789/1563-0625-ABA-2496

ASSOCIATION BETWEEN Arg753Gln (rs574308) POLYMORPHISM OF THE TOLL-LIKE RECEPTOR 2 (TLR2) GENE AND THE RISK OF PULMONARY SARCOIDOSIS AMONG THE RESIDENTS OF KARELIA

Malysheva I.E.^a, Topchieva L.V.^a, Tikhonovich E.L.^b

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

^b V. Baranov Republican Hospital, Petrozavodsk, Russian Federation

Abstract. Genetic factors play an important role in the development and progression of many disorders including lung sarcoidosis which is a systemic inflammatory granulomatous disease of unknown etiology, characterized by the formation of epithelioid cell granules in affected tissues. Intensity of the developing inflammation may partially depend on genetic factors which may influence both susceptibility to lung sarcoidosis, and also clinical course of the disease and the degree of inflammatory response from the immune system. Allelic polymorphism of distinct genes is therefore worth of study. In the carriers of certain allele variants, one may observe either increase, or a decreased production of pro-inflammatory factors. Among the candidate factors involved in higher susceptibility of humans, one may consider Toll-like receptors (TLRs) which may contribute to formation of granulomas. Relevant data concerning association between the allele variants of these genes and susceptibility to lung sarcoidosis, and its clinical course are still quite limited and contradictory. The aim of the present study was to analyze the association between the Arg753Gln (rs574308) polymorphism of the Toll-like receptor 2 (TLR2) gene and the risk of developing pulmonary sarcoidosis.

A total of 253 persons were under study including 122 patients diagnosed with morphologically verified sarcoidosis with lung involvement (average age, 41.00±12.56 years), and 131 healthy donors comprising a control group (average age, 44.00±14.23 years). The distribution of alleles and genotypes for the Arg753Gln (rs574308) polymorphic TLR2 gene marker was studied in the groups of patients with pulmonary sarcoidosis and healthy donors. The test alleles of this polymorphic marker were typed by means of PCR technique followed by length analysis restriction fragments (PCR-RFLP method).

There were no statistically significant differences in the distribution of allele and genotype frequencies for the polymorphic marker Arg753Gln (rs574308) of the TLR2 gene between the control group and the group of patients with pulmonary sarcoidosis: $\chi^2 = 2.0$, $df = 1$, $p = 0.158$ and $\chi^2 = 2.19$, $df = 2$, $p = 0.140$, respectively.

The polymorphic marker Arg753Gln (rs574308) of Toll-like receptor 2 gene is not associated with the risk of developing pulmonary sarcoidosis among ethnic Russians of the Republic of Karelia.

Keywords: pulmonary sarcoidosis, Toll-like receptors, TLR2 gene, genetic polymorphism, rs574308, association

Финансовое обеспечение исследований осуществлялось из средств федерального бюджета на выполнение государственного задания Карельского научного центра Российской академии наук (тема: FMEN-2022-0009; № г. р. 122031100064-4).

Введение

Саркоидоз легких (болезнь Бенье—Бека—Шаумана) относится к системным воспалительным заболеваниям, характеризующимся образованием эпителиоидно-клеточных гранул с преимущественным поражением легких и внутригрудных лимфатических узлов [1]. Принято считать, что развитие воспаления и образование гранул при саркоидозе возникает в ответ на воздействие неустановленного этиологического фактора у генетически восприимчивых людей [4]. В качестве причин развития саркоидоза легких могут выступать бактериальные антигены (например присутствие микобактерий, пропионобактерии и др.). В исследовании некоторых авторов показано, что в крови некоторых больных с саркоидозом выявлены антитела к микобактериальным антигенам [5].

Среди генов-кандидатов, чьи продукты могут быть вовлечены в генетическую предрасположенность к саркоидозу легких, — гены, кодирующие Toll-подобные рецепторы (Toll-like receptors, TLRs). Указанные рецепторы играют важную роль в распознавании лигандов молекул микроорганизмов, а также эндогенных молекул, которые образуются при патологических процессах в различных тканях [8]. Имеющиеся в литературе данные о роли аллельного полиморфизма генов Toll-подобных рецепторов, в частности *TLR2*, в патогенезе саркоидоза противоречивы и мало изучены. Так, в исследовании Veltkamp и соавт. показано, что полиморфный маркер -16934 А/Т в промоторной области гена *TLR2* ассоциирован с саркоидозом. Носительство аллельных вариантов по указанному полиморфному маркеру связано с клиническими особенностями течения данного заболевания [11]. Эффективность распознавания патоген-ассоциированных и молекулярных паттернов клеточного повреждения и проведения сигнала на эффекторные системы иммунных клеток во многом зависит от функциональных особенностей рецепторов, которые, в свою очередь, могут определяться наличием мутаций в

разных областях кодирующих их генов. Так, замена аргинина на глицин в позиции 753 аминокислотной последовательности белка Toll-подобного рецептора 2 Arg753Gln (rs5743708) приводит к изменению его электростатического потенциала и конформационным изменениям и, в конечном итоге, к изменению силы проведения сигнала от рецептора [13]. Эта мутация ассоциирована с повышенным риском развития ряда заболеваний, например таких как инфекционный эндокардит, туберкулез, астма, atopический дерматит и др. [3, 6, 7, 12, 14]. Сведения о влиянии полиморфного маркера Arg753Gln (rs5743708) гена *TLR2* на риск развития саркоидоза легких отсутствуют. В настоящей работе мы провели исследование по изучению связи полиморфного маркера Arg753Gln (rs5743708) гена Toll-подобного рецептора 2 с риском развития саркоидоза легких у русского населения Республики Карелия.

Материалы и методы

Обследовано 253 человека (122 пациента русской национальности (проживающих в Республике Карелия)) с диагнозом «морфологически верифицированный саркоидоз с поражением легких» (ср. возраст — $41,00 \pm 12,56$ года) и 131 здоровый донор (контроль) (ср. возраст — $44,00 \pm 14,23$ года). Саркоидоз диагностировался в соответствии с критериями на основе клинико-рентгенологических и лабораторных изменений, соответствовал консенсусу Всемирной ассоциации саркоидоза и других гранулематозных заболеваний 1999 г. и национальным клиническим рекомендациям [2]. Образцы венозной крови использовали в качестве материала для исследования. До проведения исследования информированное добровольное согласие было получено от всех пациентов. Работа одобрена комитетом по медицинской этике ГБУЗ «Республиканская больница им. В.А. Баранова» протокол № 96 от 11.07.2017.

Для выделения геномной ДНК из лейкоцитов периферической крови (ЛПК) использовали наборы Analytikjena (Германия). Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) проводили на прибо-

ре iCycler iQ5 («Био-Рад», США). ПЦР-ПДФ-анализ применяли для генотипирования по полиморфному локусу rs574308 гена *TLR2*. Сиквенс праймеров указан в работе [10]. ПЦР-продукты обрабатывали эндонуклеазой рестрикции MspI (1 ед.а.) («Сибэнзим», Россия) в течение 3 часов при 37 °С. Фрагменты рестрикции разделяли в 8%-ном полиакриламидном геле, окрашивали 1%-ным раствором бромистого этидия и визуализировали в проходящем УФ-свете.

Для статистической обработки результатов исследования использовали пакет программ StatGraphics Centurion XVI. Для определения достоверности различий частот аллелей и генотипов в исследуемых группах применяли критерий χ^2 . Различия считали значимыми при $p < 0,05$. Данные по возрасту представлены как: медиана (Me) и межквартильный интервал (interquartile range — IQR).

Исследования выполнены на научном оборудовании Центра коллективного пользования Федерального исследовательского центра «Карельский научный центр Российской академии наук».

Результаты и обсуждение

Распределение частот генотипов по полиморфному маркеру rs574308 гена *TLR2* в группе больных саркоидозом и в контрольной группе соответствовало ожидаемому, согласно закону Харди–Вайнберга ($\chi^2 = 0,50$, $df = 2$, $p = 0,780$ и $\chi^2 = 1,44$, $df = 2$, $p = 0,486$ соответственно). Частота встречаемости аллелей и генотипов исследуемого полиморфного маркера гена *TLR2* была аналогичной популяциям европейских стран [9]. Между контрольной группой и исследуемой группой больных не установлено статистически значимых различий в распределении частот аллелей и генотипов по полиморфному маркеру rs574308 гена *TLR2* (табл. 1).

Как было отмечено ранее, полиморфный маркер Arg753Gln (rs5743708) гена Toll-подобного рецептора 2 ассоциирован с риском развития

ТАБЛИЦА 1. РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ЧАСТОТ АЛЛЕЛЕЙ И ГЕНОТИПОВ ПОЛИМОРФНОГО МАРКЕРА Arg753Gln (rs5743708) ГЕНА TOLL-ПОДОБНОГО РЕЦЕПТОРА 2 В КОНТРОЛЬНОЙ ГРУППЕ И В ГРУППЕ БОЛЬНЫХ САРКОИДОЗОМ ЛЕГКИХ

TABLE 1. DISTRIBUTION OF ALLELE AND GENOTYPE FREQUENCIES OF THE Arg753Gln (rs5743708) POLYMORPHIC MARKER OF THE TOLL-LIKE RECEPTOR 2 GENE IN THE CONTROL GROUP AND IN THE GROUP OF PATIENTS WITH PULMONARY SARCOIDOSIS

Показатель Indicator		Контрольная группа Control group (n = 131)	Больные саркоидозом легких Patients with pulmonary sarcoidosis (n = 122)	Критерий χ^2 Criterion χ^2
Аллели Alleles	G	237 (0,905)	229 (0,939)	2,0 (df = 1, p = 0,158)
	A	25 (0,095)	15 (0,061)	
Генотипы Genotypes	GG	106 (0,809)	107 (0,877)	2,19 (df = 2, p = 0,140)
	GA	25 (0,190)	15 (0,123)	
	AA	0	0	

Примечание. n — число обследованных лиц. Данные представлены в виде абсолютных значений (относительная частота).
Note. n is the number of examined persons. Data are presented as absolute values (relative frequency).

ряда патологий. Указанная мутация в гене *TLR2*, в позиции 2258 G/A, приводит к изменению аминокислотной последовательности белка *TLR2*. В позиции 753 происходит замена аргинина (Arg) на глутамин (Gln) в TIR-домене (внутриклеточная часть молекулы белка). Это может привести к изменению электростатического потенциала белковой молекулы и/или конформационным изменениям. В результате чего наблюдается нарушение процесса гетеродимеризации *TLR2* с *TLR6*, фосфорилирование тирозина, и рекрутирование адаптерных белков MyD88 и Mal, что влияет на передачу сигнала от Toll-подобного

рецептора 2 на NF-κB (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells, NF-κB) [13, 15].

Таким образом, полиморфный маркер Arg753Gln (rs5743708) гена Toll-подобного рецептора 2 не связан с риском развития саркоидоза легких у русского населения Республики Карелия.

Заключение

В настоящем исследовании не установлена ассоциация полиморфизма гена Toll-подобного рецептора 2 (rs574308) с риском развития саркоидоза лёгких у русского населения Республики Карелия.

Список литературы / References

1. Baughman R.P., Culver D.A., Judson M.A. A concise review of pulmonary sarcoidosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 2011, Vol. 183, no. 5, pp. 573-581.
2. Bickett A.N., Lower E.E., Baughman R.P. Sarcoidosis diagnostic score: a systematic evaluation to enhance the diagnosis of sarcoidosis. *Chest*, 2018, Vol. 154, no. 5, pp. 1052-1060.
3. Bustamante J., Tamayo E., Flórez S., Telleria J., Bustamante E., López J., San Román J.A., Alvarez F.J. Toll-like receptor 2 R753Q polymorphisms are associated with an increased risk of infective endocarditis. *Rev. Esp. Cardiol.*, 2011, Vol. 64, no. 11, pp. 1056-1059.
4. Chen E., Moller D. Etiologies of sarcoidosis. *Clin. Rev. Allergy Immunol.*, 2015, Vol. 49, no. 1, pp. 6-18.
5. Dubaniewicz A., Kampf S., Singh M. Serum antimycobacterial heat shock proteins antibodies in sarcoidosis and tuberculosis. *Tuberculosis (Edinb)*, 2006, Vol. 86, no. 1, pp. 60-70.
6. Gao Y., Xiao H., Wang Y., Xu F. Association of single-nucleotide polymorphisms in toll-like receptor 2 gene with asthma susceptibility: A meta-analysis. *Medicine (Baltimore)*, 2017, Vol. 96, no. 20, e6822. doi: 10.1097/MD.00000000000006822.
7. Guo X., Xia Y. The rs5743708 gene polymorphism in the *TLR2* gene contributes to the risk of tuberculosis disease. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.*, 2015, Vol. 8, no. 9, pp. 11921-11928.
8. Nie L., Cai S., Shao J., Chen J. Toll-like receptors, associated biological roles, and signaling networks in non-mammals. *Front. Immunol.*, 2018, Vol. 9, 1523. doi: 10.3389/fimmu.2018.01523.
9. Reference SNP (refSNP) Cluster Report: rs5743708 Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs5743708>.
10. Selvaraj P., Harishankar M., Singh B., Jawahar M., Banurekha V. Toll-like receptor and TIRAP gene polymorphisms in pulmonary tuberculosis patients of South India. *Tuberculosis (Edinb)*, 2010, Vol. 90, no. 5, pp. 306-310.
11. Veltkamp M., Wijnen P., van Moorsel C., Rijkers G., Ruven H., Heron M., Bekers O., Claessen A., Drent M., van den Bosch J., Grutters J. Linkage between Toll-like receptor (TLR) 2 promotor and intron polymorphisms: functional effects and relevance to sarcoidosis. *Clin. Exp. Immunol.*, 2007, Vol. 149, no. 3, pp. 453-462.
12. Wang X., Zhang L., Li Y., Hou H., Sun H. [Association between toll-like receptors 2 and 5 polymorphisms and neonatal sepsis]. *Zhongguo Dang Dai Er Ke Za Zhi.*, 2015, Vol. 17, no. 12, pp. 1316-1321.
13. Xiong Y., Song C., Snyder G., Sundberg E., Medvedev A. R753Q polymorphism inhibits Toll-like receptor (TLR) 2 tyrosine phosphorylation, dimerization with TLR6, and recruitment of myeloid differentiation primary response protein 88. *J. Biol. Chem.*, 2012, Vol. 287, no. 45, pp. 38327-38337.
14. Zhang Y., Wang H.C., Feng C., Yan M. Analysis of the association of polymorphisms rs5743708 in *TLR2* and rs4986790 in *TLR4* with Atopic Dermatitis Risk. *Immunol. Invest.*, 2019, Vol. 48, no. 2, pp. 169-180.
15. Żukowski M., Taryma-Leśniak O., Kaczmarczyk M., Kotfis K., Szydlowski Ł., Ciechanowicz A., Brykczynski M., Żukowska A. Relationship between toll-like receptor 2 R753Q and T16934A polymorphisms and *Staphylococcus aureus* nasal carriage. *Anaesthesiol. Intensive Ther.*, 2017, Vol. 49, no. 2, pp. 110-115.

Авторы:

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

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

Тихонович Э.Л. — к.м.н., заведующая отделением респираторной терапии ГБУЗ «Республиканская больница имени В.А. Баранова», г. Петрозаводск, Россия

Authors:

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

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

Tikhonovich E.L., PhD (Medicine), Head, Department of Respiratory Therapy, V. Baranov Republican Hospital, Petrozavodsk, Russian Federation

Поступила 07.04.2022
Принята к печати 22.05.2022

Received 07.04.2022
Accepted 22.05.2022

ВНЕКЛЕТОЧНАЯ ДНК В КРОВИ КАК ПОКАЗАТЕЛЬ ВОСПАЛИТЕЛЬНОЙ РЕАКЦИИ *IN VIVO*

Демченко Е.Н., Гаврилова Е.Д., Гойман Е.В., Вольский Н.Н.,
Колесникова О.П., Козлов В.А.

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

Резюме. Повышенная концентрация внеклеточной ДНК (внДНК) в циркулирующей крови человека и животных является признаком воспалительных состояний и отличительной характеристикой различных патофизиологических процессов, протекающих в организме. Цель — исследовать возможную роль фактора некроза опухоли (TNF α) в изменениях содержания внДНК периферической крови в ответ на экспериментально созданную ситуацию системного воспаления. В работе использовали 40 самок мышей-гибридов (C57Bl/6хDBA/2)F₁ в возрасте 6–8 недель. Концентрацию внДНК, и ее отдельных фракций, определяли с помощью флуоресцентного красителя PicoGreen. Динамику воспалительного процесса оценивали через 4, 8, 11 и 24 часа после введения LPS.

Показан значимый рост уровня внДНК плазмы крови при одновременном падении уровня внДНК связанной с поверхностью клеток под действием липополисахарида *E. coli* (LPS). Отношение количества внДНК, связанной с поверхностью клеток, к суммарной внДНК дозозависимо снижается уже через 4 часа после введения животным LPS, что позволяет считать это соотношение характерным признаком нетоза нейтрофильных гранулоцитов при развитии острого воспаления. При одновременном введении с LPS рекомбинантного белка, нейтрализующего действие TNF α , описанные эффекты существенно подавляются, в то время как увеличенное поступление нейтрофилов в ткани определяются неким иным фактором, прямо не связанным с продукцией этого цитокина.

На основании полученных данных предлагается гипотеза о том, что индукция нетоза воспалительными стимулами вызывает увеличение концентрации внДНК в плазме крови не только за счет вновь возникающей при нетозе нейтрофилов экстрацеллюлярной ДНК, но и вследствие освобождения, под действием выделяющихся при нетозе протеаз, той фракции внДНК, которая ранее была прочно связана с мембранами клеток во всех тканях организма.

Ключевые слова: внеклеточная ДНК, воспаление, нетоз, LPS, TNF-связывающий белок

Адрес для переписки:

Гаврилова Елена Давидовна
ФГБНУ «Научно-исследовательский институт
фундаментальной и клинической иммунологии»
630099, Россия, г. Новосибирск,
ул. Ядринцевская, 14, каб. 15.
Тел.: 8 (383) 222-04-38.
Факс: 8 (383) 222-70-28.
E-mail: edav.gavr@mail.ru

Address for correspondence:

Gavrilova Elena D.
Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology
630099, Russian Federation, Novosibirsk,
Yadrintsevskaya str., 14, room 15.
Phone: 7 (383) 222-04-38.
Fax: 7 (383) 222-70-28.
E-mail: edav.gavr@mail.ru

Образец цитирования:

Е.Н. Демченко, Е.Д. Гаврилова, Е.В. Гойман,
Н.Н. Вольский, О.П. Колесникова, В.А. Козлов
«Внеклеточная ДНК в крови как показатель
воспалительной реакции *in vivo*» // Медицинская
иммунология, 2022. Т. 24, № 4. С. 853–860.
doi: 10.15789/1563-0625-EDI-2504
© Демченко Е.Н. и соавт., 2022

For citation:

E.N. Demchenko, E.D. Gavrilova, E.V. Goiman,
N.N. Volsky, O.P. Kolesnikova, V.A. Kozlov "Extracellular
DNA in blood: an index of *in vivo* inflammatory response",
Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya,
2022, Vol. 24, no. 4, pp. 853–860.
doi: 10.15789/1563-0625-EDI-2504
DOI: 10.15789/1563-0625-EDI-2504

EXTRACELLULAR DNA IN BLOOD: AN INDEX OF *IN VIVO* INFLAMMATORY RESPONSE

Demchenko E.N., Gavrilova E.D., Goiman E.V., Volsky N.N.,
Kolesnikova O.P., Kozlov V.A.

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

Abstract. Increased concentration of cell-free DNA (cfDNA) in the circulating blood of humans and animals is a sign of inflammatory conditions and a distinctive characteristic of various pathophysiological processes in the body. The aim of the present study was to investigate the possible role of tumor necrosis factor (TNF α) in changes of cfDNA contents in peripheral blood as a response to experimentally induced systemic inflammation.

We used 40 female hybrid mice (C57Bl/6xDBA/2) F1 at the age of 6–8 weeks. The concentration of cfDNA and its individual fractions was determined using a PicoGreen fluorescent dye. The dynamics of inflammatory process was evaluated after 4, 8, 11 and 24 hours following LPS injection. A significant increase in the blood plasma cfDNA levels was shown under the action of *E. coli* lipopolysaccharide (LPS), along with simultaneous decreased levels of cfDNA, associated with cell surface. The ratio of cell surface-bound cfDNA to the total cfDNA contents was reduced in dose-dependent manner as early as 4 hours after LPS injection to the animals, thus allowing us to consider this ratio a characteristic sign of netosis of neutrophilic granulocytes during the development of acute inflammation. The described effects are significantly suppressed with co-injection of recombinant TNF α neutralizing protein along with LPS, whereas increased intake of neutrophils in the tissues is determined by some other factors which are not directly related to the production of this cytokine.

Based on the obtained data, we proposed a following hypothesis: induction of netosis by inflammatory stimuli causes an increase in the concentration of cfDNA in blood plasma not only due to *de novo* emerging extracellular DNA by neutrophil netosis, but also by the release of distinct cfDNA fraction that was previously firmly bound to cell membranes in multiple body tissues under the action of proteases released during netosis.

Keywords: extracellular DNA, inflammation, netosis, LPS, TNF α binding protein

Исследование выполнено за счет средств федерального бюджета для выполнения государственного задания на научно-исследовательские работы «Молекулярно-генетические и эпигенетические механизмы регуляции иммунного ответа в норме и патологии» (ПК № 01201356997) и «Изучение иммунопатогенеза фенотипов социально значимых заболеваний человека и полиморбидности как основа для разработки новых методов персонифицированной диагностики и лечения» (ПК № 122012000366-9).

Введение

На основании исследований последних десятилетий было сформировано устойчивое представление о том, что концентрация внеклеточной ДНК (внДНК) в циркулирующей крови человека и животных может быть использована как показатель динамики различных патофизиологических процессов, протекающих в организме. Так, в частности, было обнаружено, что ее содержание в плазме и на поверхности клеток крови существенно изменяется у пациентов с различными

видами опухолей [1, 5], при сепсисе [9], при заболеваниях, обусловленных нарушениями деятельности иммунной системы [1], при инфаркте миокарда [3] и при развитии других патологических состояний. Нами было показано, что у мышей с хронической реакцией «трансплантат против хозяина» динамика содержания внДНК в плазме крови может служить прогностическим показателем, оценивающим вероятность развития того или иного варианта иммунопатологии [2].

Важным источником поступающей в кровь внДНК предполагается процесс так называемого «нетоза» нейтрофильных лейкоцитов [9], который резко увеличивается под влиянием воспалительных стимулов и заключается в пермеабиллизации клеточных мембран с выходом ядерного материала и содержимого гранул за пределы клетки с формированием специфической «сети», образованной нитями хроматина в комплексе с разнообразными белками, в том числе гидролитическими ферментами. Такая сеть способна адсорбировать на своих нитях бактериальные частицы, обездвиживая их и вызывая их лизис,

так что нетоз играет роль одного из врожденных механизмов неспецифического иммунитета. Показано [11], что при индукции у животных воспалительной реакции повышение уровней внДНК в плазме крови развивается параллельно увеличению концентрации миелопероксидазы, специфичной для нейтрофильных лейкоцитов, свидетельствуя, что значительная часть регистрируемой в плазме крови внДНК появляется в результате массового нетоза нейтрофилов. Ранее полученные нами данные [2] также указывают, что показатели активации нейтрофильного звена неспецифического иммунитета увеличиваются совместно с нарастанием в плазме крови концентрации внДНК.

Однако конкретные патофизиологические механизмы, обуславливающие изменения концентрации внДНК в крови при системной воспалительной реакции и связывающие этот параметр с другими показателями нейтрофильного ответа на провоспалительные агенты, изучены еще далеко не полностью. **Целью настоящей работы** было исследование возможной роли фактора некроза опухоли (TNF α) в изменениях содержания внДНК периферической крови в ответ на экспериментально созданную ситуацию системного воспаления. В качестве воспалительного стимула был выбран липополисахарид *E. coli* (LPS) в дозе, вызывающей достаточно выраженную, но краткую воспалительную реакцию организма, а роль TNF α оценивалась с помощью параллельного введения экспериментальной группе мышей белка, нейтрализующего эффекты TNF α за счет наличия в своем составе TNF α -связывающего домена белка CRMB вируса натуральной оспы [4].

Полученные результаты свидетельствуют о разнонаправленном влиянии индуктора воспаления на содержание различных фракций внДНК в циркулирующей крови и о существенном участии TNF α в этом процессе, что позволяет сформулировать некоторые нетривиальные предположения о механизме увеличения концентрации внДНК в плазме крови при воспалительных реакциях и о роли в этом нетоза нейтрофильных лейкоцитов.

Материалы и методы

В работе использовали самок мышей-гибридов (C57Bl/6хDBA/2)F₁ в возрасте 6–8 недель, полученных из экспериментально-биологической клиники лабораторных животных НИИФКИ. Животных содержали в стандартных условиях вивария в соответствии с правилами, принятыми Европейской конвенцией по защите животных, используемых для экспериментальных целей (Страсбург, 1986). Исследование одобрено эти-

ческим комитетом НИИФКИ (протокол № 92 от 10.11.2015 г.)

Животным экспериментальных групп однократно в/б вводили LPS *E. coli* штамма 111:B4 (Sigma, США) в дозах 10 нг/мышь, 1 мкг/мышь и 100 мкг/мышь, животным контрольных групп вводился соответствующий объем PBS. В одной из групп мышам за 30 мин до инъекции LPS вводили TNF α -связывающий белок (anti-TNF) в дозе 10 нг/мышь. У всех животных до введения LPS (нулевая точка) было определено количество лейкоцитов в крови, а также концентрация внДНК в плазме крови и внДНК, связанной с цитоплазматическими мембранами клеток крови. Динамику воспалительного ответа оценивали через 4, 8, 11, 24 часа после введения LPS по тем же параметрам.

Выделение и количественное определение внДНК проводили согласно методике [10]. Кровь из хвостовой вены животных собирали в пробирки, содержащие 3 × PBS (PBS-10 мМ фосфатный буфер pH 7,4, 0,15 М NaCl) и 15 мМ ЭДТА в качестве антикоагулянта. Плазму отделяли центрифугированием при 400 g в течение 20 мин. К осажденным клеткам добавляли девятикратный объем PBS с 5 мМ ЭДТА, супернатант отделяли центрифугированием при 400 g в течение 20 мин. Для определения внДНК, связанной с клеточной поверхностью, клетки инкубировали 5 мин с 0,25% раствором трипсина, реакцию останавливали добавлением ингибитора трипсина из соевых бобов (Sigma, США) и центрифугированием отделяли супернатант, содержащий внДНК. Выделение ДНК из полученных фракций проводили на колонках компании «БиоСилика» (г. Новосибирск) согласно прилагаемой инструкции. Определение ДНК проводили с помощью флуоресцентного красителя PicoGreen (Invitrogen, США). ДНК рассчитывалась по калибровочной кривой, построенной для известных концентраций стандартной двухцепочечной λ ДНК.

Статистическую обработку результатов проводили, используя тест Манна–Уитни и ранговый коэффициент корреляции Спирмена, с помощью программы Statistica 6.0. Данные представлены в виде средних значений для каждой из экспериментальных групп животных. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

В качестве простейшей модели, позволяющей исследовать влияние воспаления на уровни внДНК в периферической крови животных, было выбрано однократное введение LPS в умеренной дозе (1 мкг/мышь). Ранее [2] было показано, что такая доза LPS вызывает повышение характерных для воспалительной реакции пока-

зателей (лейкоцитоза и соотношения «нейтрофилы/лимфоциты»), и при этом эффекты ее введения ограничены во времени — через 24 часа после инъекции параметры возвращаются к нормальному уровню. На рисунке 1 графически представлены суммарные результаты двух аналогичных экспериментов, отражающие влияние LPS на уровни вДНК в крови животных в различные сроки после его введения. В качестве отдельных параметров, описывающих различные фракции вДНК, было определено: количество вДНК в ЭДТА-плазме (ЭДТА играет роль антикоагулянта и ингибитора нуклеаз) (рис. 1А), количество вДНК, прочно связанной с белками на поверхности цитоплазматических мембран клеток крови и переходящей в раствор лишь под действием протеолитического фермента (рис. 1Б) и суммарное количество вДНК, рассчитываемое как результат сложения двух предыдущих показателей (рис. 1В).

Видно, что, в то время как суммарное количество находящейся в крови вДНК не обнаруживает определенной динамики и существенно не изменяется после введения LPS, значения двух других измеренных параметров закономерно изменяются во времени и демонстрируют статистически подтверждаемое влияние воспалительной реакции на их величину. Первое, что следует здесь отметить, это противоположность эффектов инъекции LPS на значения вДНК плазмы и вДНК, связанной с поверхностью клеток. Можно сказать, что два этих параметра находятся — в данной модели — в противофазе: LPS явно увеличивает количество вДНК плазмы, и в то же время развитие воспаления приводит к существенному уменьшению той фракции вДНК, которая прочно (и, вероятно, ковалентно) связана с мембранными белками клеточной поверхности. На рисунке 2 показана динамика соотношения между вДНК, связанной с мембранами клеток, и суммарной вДНК крови при развитии ответа на LPS. Видно, что этот показатель дозозависимо снижается уже через 4 часа после введения препарата (рис. 2А) и что при дозе 1 мкг/мышь снижение данного показателя сохраняется в течение суток после инъекции LPS (рис. 2Б).

О противоположном по знаку влиянии воспаления на разные фракции вДНК говорит и наличие умеренной отрицательной корреляции между вДНК плазмы и долей вДНК, связанной с клеточной поверхностью, во всей вДНК крови: коэффициент корреляции (ρ) между этими параметрами после введения LPS равен $-0,45$. При этом можно считать, что такая отрицательная корреляция между исследуемыми параметрами усиливается при разворачивании воспалительной реакции организма на вводимый животным

LPS, поскольку у интактных мышей (без введения LPS) связь между этими параметрами существенно ниже ($\rho = -0,31$).

На графиках, представленных на рисунке 1, приведены также данные, характеризующие влияние на исследуемые параметры специфического белка, вводимого мышам одной из групп непосредственно перед инъекцией LPS и частично отменяющего те эффекты воспалительного агента, которые опосредуются стимуляцией продукции TNF α в организме животного. Сравнивая черные (группа с введением только LPS) и серые (группа с введением LPS + anti-TNF) столбцы, можно наглядно убедиться, что нейтрализующий TNF α агент частично отменяет воздействие LPS на параметры, характеризующие содержание разных фракций вДНК в крови животных. При этом TNF-связывающий белок, как и следовало ожидать, уменьшает количество вДНК в плазме (по сравнению со значениями этого параметра в группе мышей, которым вводили только LPS), и одновременно тормозит падение уровня связанной с клеточными мембранами вДНК, снижающееся при воздействии воспалительного агента (рис. 1Б, В).

Учитывая данные, что значительная часть регистрируемой в плазме крови вДНК появляется в результате массового нетоза нейтрофилов, разумно предполагать, что и в наших экспериментах изменения фракций вДНК в ответ на LPS объясняются аналогичным образом. Поскольку хорошо известно, что TNF α , продуцируемый в организме в ответ на воспалительные стимулы, является одним из индукторов нетоза нейтрофилов [7], обнаруженные нами эффекты anti-TNF также свидетельствуют в пользу того, что наблюдаемые после введения LPS закономерные изменения фракций вДНК в основном определяются индукцией нетоза нейтрофилов этим воспалительным стимулом.

В то же время, как это видно на рисунке 3, введение anti-TNF существенно не влияет на реакцию лейкоцитов периферической крови в ответ на воспалительный агент. В группе мышей, которым был введен только LPS, изменения числа лейкоцитов происходят параллельно изменениям уровней вДНК в крови (ср. данные в соответствующие сроки после введения LPS на рисунках 1 и 3). При этом воспаление вызывает увеличение числа нейтрофилов и повышение уровня вДНК в плазме, в то время как число лимфоцитов (моноклеарных клеток) и уровень связанной с мембранами вДНК резко снижаются после введения LPS. В группе же мышей, которым вводили LPS + anti-TNF, такой параллелизм между изменениями исследуемых показателей существенно размывается, поскольку

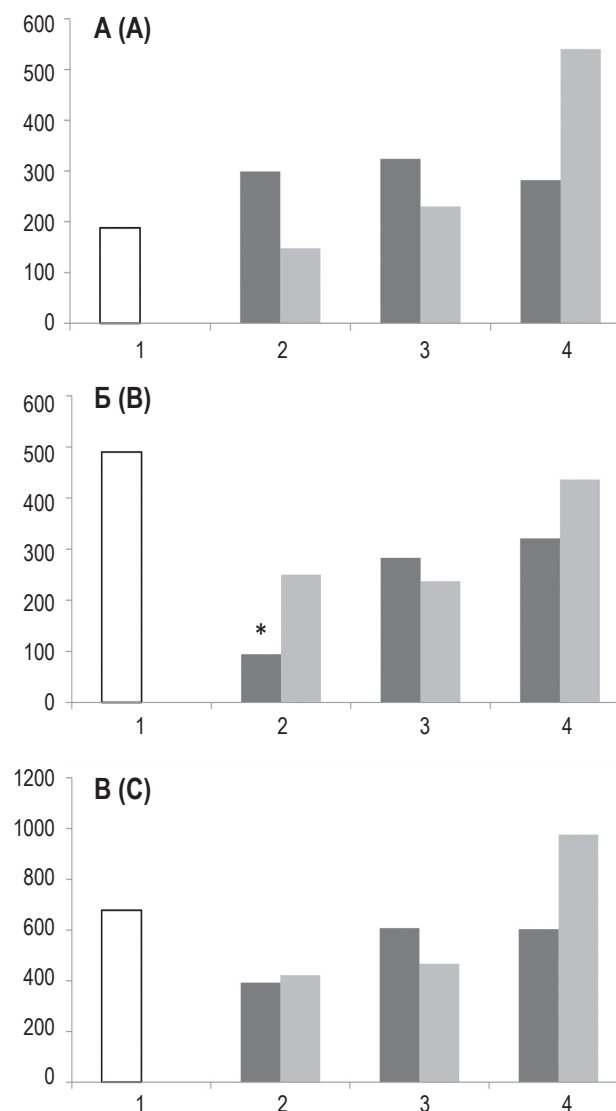


Рисунок 1. Концентрация внеклеточной ДНК в крови мышей (C57Bl/6xDBA/2)_{F1} в различные сроки после введения LPS и эффекты TNF-связывающего белка
Примечание. По оси абсцисс – время после введения LPS, час. 1 – 0 ч, 2 – 8 ч, 3 – 11 ч, 4 – 24 ч. По оси ординат – уровень внеклеточной ДНК, нг/мл. А – вДНК, циркулирующая в плазме (ccfDNA). Б – вДНК, связанная с клеточной поверхностью (csbDNA). В – суммарная вДНК (sumDNA). Белый столбец – контрольная группа, черные столбцы – опытная группа с введением LPS, серые столбцы – опытная группа с введением LPS и TNF-связывающего белка (anti-TNF). * – достоверное отличие от контроля ($p < 0,05$).

Figure 1. Concentration of extracellular DNA in the blood of (C57Bl/6xDBA/2)_{F1} mice at various times after LPS administration and the effects of TNF-binding protein
Note. Abscissa, time after LPS administration, hour. 1, 0 h; 2, 8 h; 3, 11 h; 4, 24 h. The y-axis shows the level of extracellular DNA, ng/mL. (A) exDNA circulating in plasma (ccfDNA). (B) exDNA associated with the cell surface (csbDNA). (C) total cfDNA (sumDNA). White column, control group; black columns, experimental group with the introduction of LPS; gray columns, experimental groups with the introduction of LPS and TNF-binding protein (anti-TNF). *, significant difference from control ($p < 0.05$).

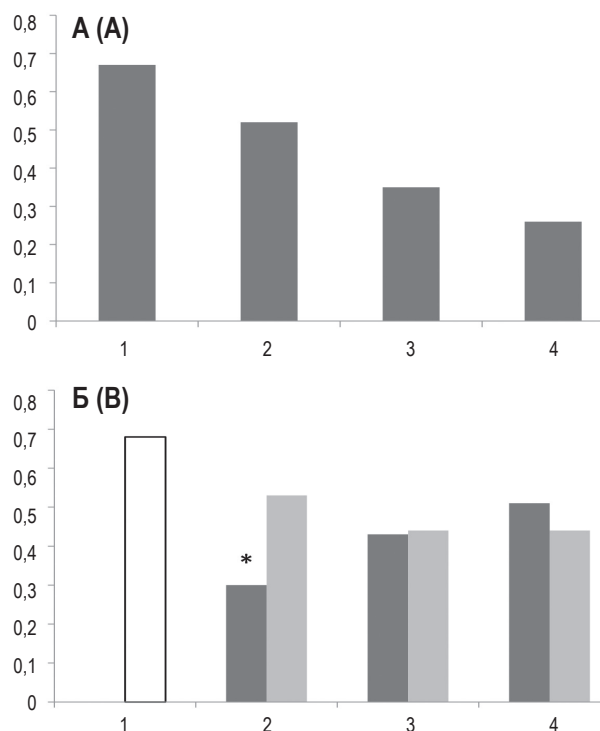


Рисунок 2. Динамика соотношения между вДНК, связанной с мембранами клеток и суммарной вДНК крови при развитии ответа на LPS

Примечание. По оси ординат – отношение вДНК, связанной с поверхностью клеток к суммарной фракции вДНК (csbDNA / sumDNA). По оси абсцисс: А – дозы ЛПС: 1 – 0, 2 – 10 нг, 3 – 1 мкг, 4 – 100 мкг. Б – время после введения ЛПС, час, 1 – 0 ч, 2 – 8 ч, 3 – 11 ч, 4 – 24 ч. Белый столбец – контрольная группа, черные столбцы – опытная группа с введением LPS, серые столбцы – опытная группа с введением LPS и TNF-связывающего белка (anti-TNF). * – достоверное отличие от контроля ($p < 0,05$).

Figure 2. Dynamics of the ratio between cfDNA associated with cell membranes and total blood cfDNA during the development of response to LPS

Note. Along the y-axis, the ratio of cfDNA associated with the cell surface to the total fraction of cfDNA (csbDNA / sumDNA). Abscissa, (A) doses of LPS: 1, 0; 2, 10 ng; 3, 1 mcg; 4, 100 mcg. (B) time after the introduction of LPS, hour, 1, 0 h; 2, 8 h; 3, 11 h; 4, 24 h. White column, control group; black columns, experimental group with the introduction of LPS; gray columns, experimental group with the introduction of LPS and TNF-binding protein (anti-TNF). *, significant difference from control ($p < 0.05$).

ку нейтрализующий TNF белок подавляет реакцию фракций вДНК на развитие воспаления (предположительно снижая опосредуемую TNFα индукцию нетоза нейтрофилов), но не оказывает значимого влияния на вызванные введением LPS изменения лейкоцитов крови. Этот вывод о рассогласовании динамики разных показателей интенсивности воспаления на фоне введения anti-TNF подтверждается и сравнением корреляционных связей между исследуемыми параме-

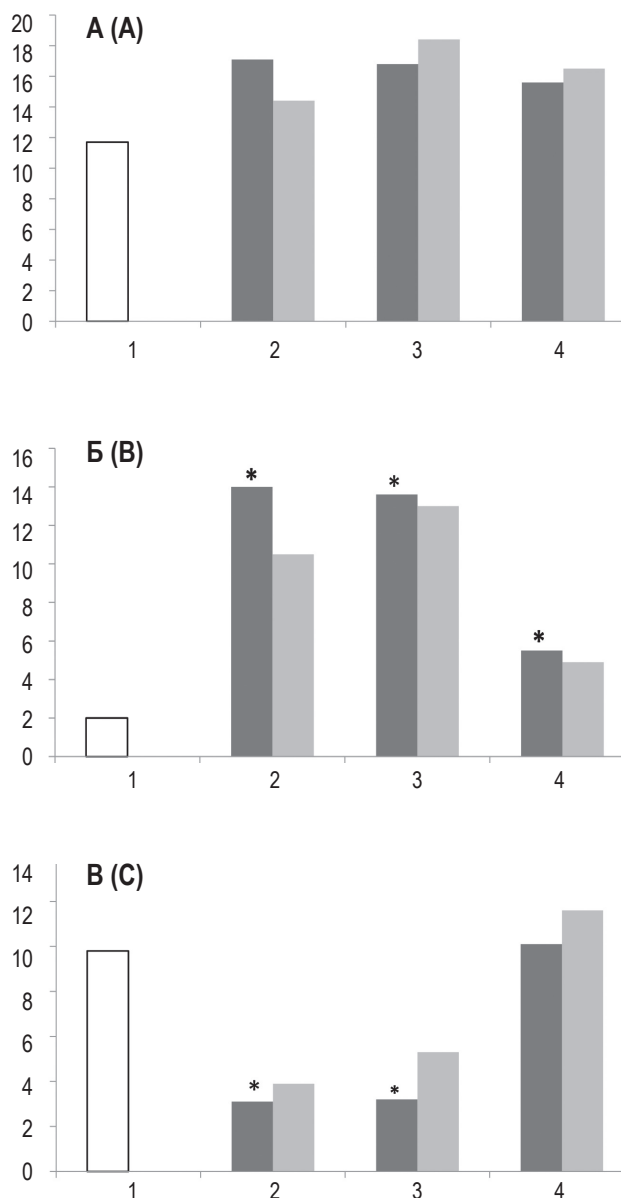


Рисунок 3. Влияние LPS на полиморфоядерные элементы периферической крови и эффекты TNF-связывающего белка

Примечание. А – лейкоциты, Б – нейтрофилы, В – лимфоциты. Белый столбец – контрольная группа, черные столбцы – опытная группа с введением LPS, серые столбцы – опытная группа с введением LPS и TNF-связывающего белка (anti-TNF).

По оси ординат – количество клеток в 10³/л. По оси абсцисс – время после введения ЛПС, час. 1 – 0, 2 – 8 ч, 3 – 11 ч, 4 – 24 ч. * – достоверное отличие от контроля ($p < 0,05$).

Figure 3. Effect of LPS on peripheral blood polymorphonuclear elements and effects of TNF-binding protein

Note. (A) leukocytes, (B) neutrophils, (C) lymphocytes. White column, control group; black columns, experimental group with the introduction of LPS; gray columns, experimental groups with the introduction of LPS and TNF-binding protein (anti-TNF). On the y-axis, the number of cells in 10³/L. Abscissa, time after LPS injection, hour. 1, 0 h; 2, 8 h; 3, 11 h; 4, 24 h. *, significant difference from control ($p < 0.05$).

трами в группах мышей с введением только LPS и с одновременным введением LPS + anti-TNF. Обнаружено, что без «отключения» эффектов TNF α между значениями уровней мембраносвязанной вДНК и содержанием нейтрофилов в крови существует тесная отрицательная корреляция ($\rho = -0,89$, $p < 0,05$), которая заметно уменьшается на фоне введения anti-TNF ($\rho = -0,47$, $p < 0,05$). Таким образом, полученные в наших экспериментах результаты хорошо укладываются в господствующее сегодня представление о том, что наблюдаемые при остром воспалении изменения содержания вДНК в крови тесно связаны с активацией нетоза нейтрофилов, и, согласно нашим данным, одним из важных факторов, опосредующих индукцию нетоза в этих условиях, можно считать повышенную продукцию TNF α .

Обнаруженное нами расхождение между эффектами LPS на уровни вДНК крови и его же влиянием на гранулопоэз в костном мозге и соответствующее ему повышение количества нейтрофилов в циркулирующей крови позволяет с большой степенью уверенности предполагать, что возрастающая после введения ЛПС продукция TNF α имеет своим следствием резко усиливающийся процесс нетоза, в то время как стимуляция гранулопоэза и увеличенное поступление нейтрофилов в ткани определяются в этой ситуации неким иным фактором, прямо не связанным с продукцией TNF α . Имеющиеся на сегодня литературные данные дают возможность выдвинуть на роль гипотетического фактора, который может опосредовать стимулирующее влияние ЛПС на гранулоцитопоэз, увеличенную продукцию IFN γ . Показано [8], что в опытах *in vitro* непосредственное воздействие этого цитокина на макрофаги приводит к существенному ингибированию 27-холестеролгидроксилазы – цитохром-Р-450-зависимого фермента, превращающего холестерин в 27-гидроксихолестерин, который служит в клетке основным активирующим лигандом ядерных рецепторов LXR. Как сегодня известно, одним из эффектов активации LXR является торможение – через ингибирующее влияние на каскад цитокинов: IL-23 $\rightarrow$ IL-17 $\rightarrow$ GM-CSF – гранулоцитопоэза в костном мозге (об этом механизме влияния LXR см. в фундаментальной статье Hong et al. [6]). Следовательно, можно ожидать, что после инъекции LPS выделяющийся в больших количествах IFN γ должен снижать степень активации LXR и, соответственно, активировать цитокиновый каскад, стимулирующий, в конечном итоге, усиленную продукцию нейтрофилов. Такой патофизиологический механизм мог бы убедительно объяснить полученные нами результаты, в которых обнаружилась независимость регуляторных ме-

ханизмов, ответственных за стимуляцию притока нейтрофилов в ткани с одной стороны и за стимуляцию процесса нетоза в этих клетках, уже мигрировавших в ткани — с другой.

Наиболее интересным результатом вышеописанных опытов можно, по нашему мнению, считать тот факт, что активация нетоза нейтрофилов воспалительным агентом сопровождается разнонаправленным эффектом на количество внДНК в плазме и ее фракцию, прочно связанную с поверхностными белками цитоплазматической мембраны, а также то вытекающее отсюда обстоятельство, что доля мембраносвязанной фракции внДНК существенно снижается при воспалительной активации нетоза. Это наблюдение говорит, в частности, о том, что последний параметр может быть более чувствительным (и, вероятно, более устойчивым) показателем воспалительной активации нетоза нейтрофилов, и в этом качестве он может быть использован в клинической практике.

Заключение

Обнаружившиеся в наших экспериментах увеличение внДНК плазмы с одновременным снижением мембраносвязанной внДНК наталкивает на предположение, что, по крайней мере, часть появляющейся в плазме внДНК является той «слущенной» с клеток внДНК, которая была прочно связана с поверхностными белками мембран до момента действия воспалительного стимула. Но в этом случае возрастание уровня внДНК плазмы, с одной стороны рассматриваемое как следствие массового нетоза, а с другой — понимаемое как переход части внДНК из одной фракции в другую, должно быть связано с нетозом

каким-то другим — до сих пор не принимаемым во внимание — образом. По нашему мнению, следует с новой точки зрения взглянуть на тот широко известный факт, что процесс нетоза характеризуется выходом во внеклеточное пространство не только нитей ДНК, но и огромного количества разнообразных протеаз, находившихся до того в специфических гранулах нейтрофилов. Вполне возможно, что эффект этих протеолитических ферментов, выделяющихся при стимуляции нетоза в тканях организма, в значительной степени аналогичен эффекту трипсина, добавляемому к клеткам крови *in vitro* в использованной нами методике определения внДНК. В таком случае, надо полагать, увеличение количества внДНК в плазме при активации нетоза обусловлено не только (а возможно, и не столько) выделяющейся экстрацеллюлярно ДНК нетозных клеток, но и освобождением и переходом в другую фракцию той ДНК, которая до того была прочно связана с мембранами клеток и потому не определялась как внДНК в плазме крови. Такой взгляд на сущность связи между увеличением уровня внДНК в плазме крови и реакцией нейтрофилов на воспалительные стимулы имеет право на существование и наилучшим образом согласуется с теми результатами, которые были получены в наших экспериментах. Эта гипотеза не менее обоснована имеющимися на сегодняшний день данными, чем предшествующее ей представление о роли нетоза в увеличении внДНК плазмы в ответ на воспалительные стимулы, и позволяет наметить новые пути экспериментального и клинического изучения внДНК, как потенциального параметра, способного характеризовать протекающие в организме патофизиологические процессы.

Список литературы / References

1. Козлов В.А. Свободная внеклеточная ДНК в норме и при патологии // Медицинская иммунология, 2013. Т. 15, № 5. С. 399-412. [Kozlov V.A. Free extracellular DNA in normal state and under pathological conditions. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2013, Vol. 15, no. 5, pp. 399-412. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2013-5-399-412.
2. Колесникова О.П., Гойман Е.В., Демченко Е.Н., Гаврилова Е.Д., Козлов В.А. Ранние маркеры фенотипической гетерогенности системной красной волчанки в экспериментальной модели // Бюллетень сибирской медицины, 2017. Т. 16, № 4. С. 155-164. [Kolesnikova O.P., Goiman E.V., Gavrilova E.D., Demchenko E.N., Kozlov V.A. Early markers of phenotypic heterogeneity in the induced model of systemic lupus erythematosus. *Byulleten sibirskoy meditsiny = Bulletin of Siberian Medicine*, 2017, Vol. 16, no. 4, pp. 155-164. (In Russ.)]
3. Судаков Н.П., Попкова Т.П., Новикова М.А., Катышев А.И., Никифоров С.Б., Пушкарев Б.Г., Гольдберг О.А., Клименков И.В., Лепехова С.А., Апарцин К.А., Ежикеева С.Д., Тен М.Н., Константинов Ю.М. Взаимосвязь уровня свободно циркулирующей митохондриальной ДНК крови с активностью маркеров цитолиза при экспериментальной острой мелкоочаговой ишемии миокарда // Сибирский медицинский журнал, 2013. № 5. С. 83-85. [Sudakov N.P., Popkova T.P., Novikova M.A., Katyshev A.I., Nikiforov S.B., Pushkarev B.G., Goldberg O.A., Klimenkov I.V., Lepekova S.A., Apartsin K.A., Ezhikeeva S.D., Ten M.N., Konstantinov Yu.M. Interrelation between the level of free circulating mtDNA of blood with the activity of cytolysis markers in the experimental acute small-focal myocardial ischemia. *Sibirskiy meditsinskiy zhurnal = Siberian Medical Journal*, 2013, no. 5, pp. 83-85. (In Russ.)]
4. Цырендоржиев Д.Д., Орловская И.А., Сенников С.В., Трегубчак Т.В., Гилева И.П., Цырендоржиева М.Д., Щелкунов С.Н. Биологические эффекты индивидуально синтезированного TNF-связывающего

домена белка CrmB вируса натуральной оспы // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины, 2014. Т. 157, № 2. С. 214-217. [Tsyrendorzhiev D.D., Orlovskaya I.A., Sennikov S.V., Tsyrendorzhieva M.D., Tregubchak T.V., Gileva I.P., Shchelkunov S.N. Biological effects of individually synthesized TNF-binding domain of variola virus CrmB protein. *Byulleten eksperimental'noy biologii i meditsiny = Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 2014, Vol. 157, no. 2, pp. 249-252. (In Russ.)]

5. Bryzgunova N.V., Tamkovich S.N., Cherepanova A.V., Yarmoshchuk S.V., Permyakova V.I., Anykeeva O.Y., Laktionov P.P. Redistribution of free- and cell-surface-bound DNA in blood of benign and malignant prostate tumor patients. *Acta Naturae*, 2015, Vol. 7, no. 2, pp. 115-118.

6. Hong C., Kidani Y., A-Gonzalez N., Phung T., Ito A., Rong X., Ericson K., Mikkola H., Beaven S.W., Miller L.S., Shao W.-H., Cohen P.L., Castrillo A., Tontonoz P., Bensinger S.J. Coordinate regulation of neutrophil homeostasis by liver X receptors in mice. *J. Clin. Invest.*, 2012, Vol. 122, no. 1, pp. 337-347.

7. Joshi M.B., Lad A., Bharath Prasad A.S., Balakrishnan A., Ramachandra L., Satyamoorthy K. High glucose modulates IL-6 mediated immune homeostasis through impeding neutrophil extracellular trap formation. *FEBS Lett.*, 2013, Vol. 587, no. 14, pp. 2241-2246.

8. Reiss A.B., Awadallah N.W., Malhotra S., Montesinos M.C., Chan E.S.L., Javitt N.B., Cronstein B.N. Immune complexes and IFN γ decrease cholesterol 27-hydroxylase in human arterial endothelium and macrophages. *J. Lipid Res.*, 2001, Vol. 42, no. 11, pp. 1913-1922.

9. Sollberger G., Tilley D.O., Zychlinsky A. Neutrophil extracellular traps: The biology of chromatin externalization. *Dev. Cell*, 2018, Vol. 44, no. 5, pp. 542-553.

10. Tamkovich S.N., Litviakov N.V., Bryzgunova O.E., Dobrodeev A.Y., Rykova E.Y., Tuzikov S.A., Zav'yalov A.A., Vlassov V.V., Cherdyntseva N.V., Laktionov P.P. Cell-surface-bound circulating DNA as a prognostic factor in lung cancer. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 2008, Vol. 1137, no. 1, pp. 214-217.

11. van der Meer A.J., Kroeze A., Hoogendijk A.J., Soussan A.A., van der Schoot C.E., Willemin W.A., Voermans C., van der Poll T., Zeerleder S. Systemic inflammation induces release of cell-free DNA from hematopoietic and parenchymal cells in mice and humans. *Blood Adv.*, 2019, Vol. 3, no. 5, pp. 724-728.

Авторы:

Демченко Е.Н. — к.х.н., научный сотрудник лаборатории экспериментальной иммунотерапии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

Гаврилова Е.Д. — к.б.н., заведующая лабораторией экспериментальной иммунотерапии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

Гойман Е.В. — к.м.н., научный сотрудник лаборатории экспериментальной иммунотерапии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

Вольский Н.Н. — к.м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории экспериментальной иммунотерапии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

Колесникова О.П. — д.м.н., главный научный сотрудник лаборатории экспериментальной иммунотерапии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

Козлов В.А. — д.м.н., профессор, академик РАН, научный руководитель ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

Authors:

Demchenko E.N., PhD (Chemistry), Research Associate, Laboratory of Experimental Immunotherapy, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

Gavrilova E.D., PhD (Biology), Head, Laboratory of Experimental Immunotherapy, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

Goiman E.V., PhD (Medicine), Research Associate, Laboratory of Experimental Immunotherapy, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

Volsky N.N., PhD (Medicine), Leading Research Associate, Laboratory of Experimental Immunotherapy, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

Kolesnikova O.P., PhD, MD (Medicine), Chief Research Associate, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

Kozlov V.A., PhD, MD (Medicine), Professor, Scientific Director, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

Поступила 17.04.2022
Принята к печати 22.05.2022

Received 17.04.2022
Accepted 22.05.2022

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 «УРАЛ-ПРЕСС» — индекс 42311. Подписка на электронную версию журнала на сайте www.elibrary.ru

АВТОРСКИЙ УКАЗАТЕЛЬ

Агарков Н.М.	793, 831	Годовалов А.П.	837	Макконен К.Ф.	831	Сушенцева Н.Н.	705
Алешина Г.М.	779	Гойман Е.В.	853	Мальшева И.Е.	849	Татаркова Е.А.	751
Антонов А.В.	765	Гордеева Л.А.	765	Минасова А.А.	807	Титов А.А.	831
Апалько С.В.	705	Давуд Али А.	729	Мотлохова Е.А.	821	Тихонович Э.Л.	849
Асташина Н.Б.	837	Демченко Е.Н.	853	Муженя Д.В.	751	Топчиева Л.В.	849
Бажин А.А.	837	Долгушин И.И.	807	Мун С.А.	765	Тугуз А.Р.	751
Барило А.А.	799	Дрокина Т.А.	837	Никушкина К.В.	807	Тырнова Е.В.	779
Батурина И.Л.	807	Загрешенко Д.С.	821	Новиков П.С.	821	Уразов С.П.	705
Бельчикова Д.Н.	831	Климов В.В.	821	Поленок Е.Г.	765	Хамди О.Р.	729
Бойков А.В.	705	Клюева С.Н.	741	Полковникова И.А.	705	Черевко Н.А.	821
Бугоркова С.А.	741	Козлов В.А.	853	Пыхова Л.Р.	807	Черкас А.В.	705
Вержбицкая Н.Е.	765	Колесникова О.П.	853	Розенштейн А.З.	821	Чернов А.Н.	705
Вольский Н.Н.	853	Колпина Л.В.	831	Розенштейн М.Ю.	821	Шапошник И.И.	807
Воронина Е.Н.	765	Колпинский Г.И.	765	Руденко К.А.	751	Шаравьева И.Л.	843
Гаврилова Е.Д.	853	Кондаков С.Э.	821	Савочкина А.Ю.	807	Шумилов Д.С.	751
Гейн С.В.	843	Костянко М.В.	765	Сайд М.З.	659	Шербак С.Г.	705
Генкель В.В.	807	Кравцов А.Л.	741	Смирнов В.В.	705	Янов Ю.К.	779
Глотов О.С.	705	Кузнецова А.С.	807	Смирнова С.В.	799	Ясим Б.И.	729
Глушков А.Н.	765	Лев И.В.	793	Смольков И.В.	751		

ПРЕДМЕТНЫЙ УКАЗАТЕЛЬ

аденоиды	779	корреляции	706	субпопуляционный состав	
акриловая пластмасса	838	макрофаги	843	циркулирующих моноцитов	808
активные формы кислорода	843	метаболический синдром	822	телмисартан	831
аллерген	799	механизмы действия	706	тромбоциты	742
антитела	766	моноклеарные лейкоциты	838	угроза прерывания беременности ..	752
антителогенез	843	мутации	729	холодовой стресс	843
апоптоз	659	небные миндалины	779	хронический средний отит	779
артериальная гипертензия	831	нейтрофилы	742	цитокины	742, 838
ассоциация	849	некроптоз	659	экспрессия гена	779
атеросклероз	808	нетоз	659, 742, 853	эритроциты	742
атопический дерматит	799	относительный риск	793	эстрадиол	766
атопия	799	отосклероз	779	ACE2	729
аутоиммунные заболевания	706	очаговая алопеция	799	β-дефенсин-3 человека	779
аутореактивность	659	пироптоз	659	COVID-19	742
аутофагия	659	пищевая толерантность	822	CRP	752
бактериальные заболевания	706	пищевые антигены	822	CYP1A1	752
бензо[а]пирен	766	поверхностные	729	CYP	766
бронхиальная астма	752	пожилые пациенты	793	EDN1	752
вирусные заболевания	706	полимерные конструкционные		GST	766
внеклеточная ДНК	853	материалы	838	HMGB1	808
воспаление	659, 706, 752, 822, 853	полипы носа	779	IFNγ	838, 843
ген TLR2	849	полипы околоносовых пазух	779	IL-4	838, 843
генетический полиморфизм	849	поллиноз	799	IL4	752
гиперреактивность к пищевым		прогестерон	766	IL10	752
антигенам	822	прогностическое значение		IL-12	843
гортань	779	фосфолипазы A2	706	LPS	853
диабетическая ретинопатия	793	рак молочной железы	752, 766	MHC I класса	659
диагностическое значение		ревматические болезни	659	MHC II класса	659
фосфолипазы A2	706	реология крови	822	MMP1	752
изоформы фосфолипазы A2	706	саркоидоз легких	849	NOS3	752
иммунопатогенез	799	секреторная фосфолипаза A2	706	RBD	729
иммунопатология	793	сердечно-сосудистые		rs574308	849
интерлейкины крови	831	заболевания	706, 752	SARS-CoV-2	729, 742
интерлейкины слезной жидкости ..	793	слизистая носа	779	TGFβ1	752
ишемическая болезнь сердца	752	слизистая околоносовых пазух	779	TNF-связывающий белок	853
композиционный материал на		спайк-протеин	729	TNFRSF11B	752
основе стекловолокна	838	спленциты	843	Toll-подобные рецепторы	849



Рисунок 1. Пациентка П., 6 лет, диагноз: очаговая алопеция, ограниченная форма

Примечание. Выявлена сенсibilизация к целому куриному яйцу (++) , пищевым злакам (++) , какао (+). Слева направо: динамика регресса повреждения кожи через 12 месяцев от назначения элиминационной диеты.

Figure 1. Patient P., 6 years old, diagnosis: alopecia areata, limited form

Note. Sensitization to the whole chicken egg (++) , food cereals (++) , cocoa (+) was revealed. From left to right: dynamics of regression of skin damage after 12 months from the introduction of an elimination diet.



Рисунок 2. Пациентка П., 10 лет, диагноз: очаговая алопеция, ограниченная форма

Примечание. Выявлена сенсibilизация к пищевым злакам (++) , пыльце деревьев (++++). Слева направо: динамика регресса повреждения кожи через 6 месяцев от назначения элиминационной диеты.

Figure 2. Patient P., 10 years old, diagnosis: alopecia areata, limited form

Note. Sensitization to food cereals (++) , tree pollen (++++) was revealed. From left to right: dynamics of regression of skin damage after 6 months from the introduction of an elimination diet.



Рисунок 3. Пациентка П., 33 года, диагноз: очаговая алопеция, диффузная форма

Примечание. Выявлена сенсibilизация к белку коровьего молока (+++), пищевым злакам (++) , пыльце луговых трав (+++). Слева направо: динамика регресса повреждения кожи через 6 месяцев от назначения элиминационной диеты.

Figure 3. Patient P., 33 years old, diagnosis: alopecia areata, diffuse form

Note. Sensitization to cow's milk protein (+++), food cereals (++) , meadow grass pollen (+++) was revealed. From left to right: dynamics of regression of skin damage after 6 months from the introduction of an elimination diet.

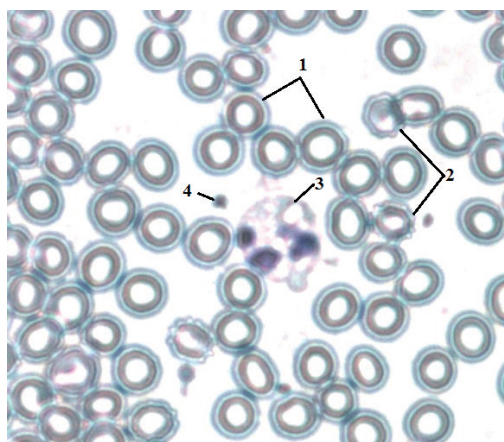


Рисунок 1. Мазок крови реконвалесцента. Окраска по Романовскому–Гимзе, ×400

Примечание. 1 – дискцит, 2 – эхиноцит, 3 – цитоплазматическая вакуолизация нейтрофила, 4 – тромбоцит.

Figure 1. Convalescent blood smear. Staining according to Romanovsky–Giemsa, ×400

Note. 1, discocyte; 2, echinocyte; 3 – cytoplasmic vacuolization of the neutrophil; 4, platelet.

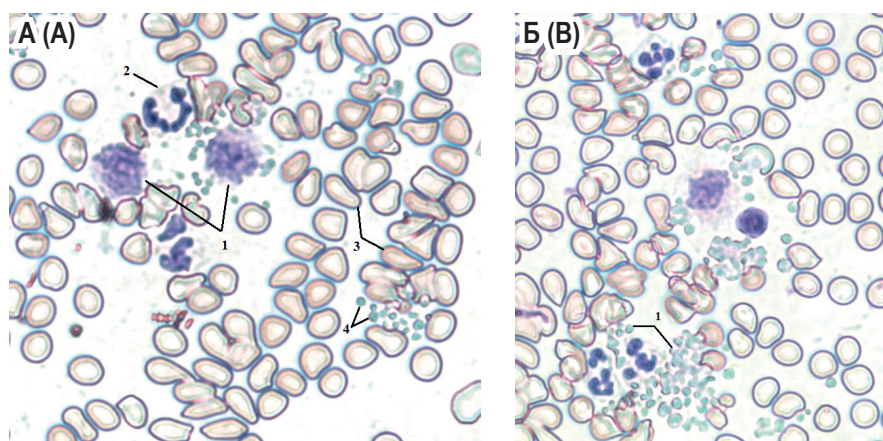


Рисунок 2. Мазок крови реконвалесцента. Окраска по Романовскому–Гимзе, ×400

Примечание. А. 1 – нейтрофилы с деконденсированным хроматином на стадии преднетиоза, 2 – сегментоядерный нейтрофил, 3 – овалциты, 4 – тромбоциты.

Б. 1 – участок нейтрофил-тромбоцитарной агрегации.

Figure 2. Convalescent blood smear. Staining according to Romanovsky–Giemsa, ×400

Note. А. 1, neutrophils with decondensed chromatin at the stage of prenetosis; 2, segmented neutrophil; 3, ovalocytes; 4, platelets. Б. 1, neutrophil-platelet aggregation site.

ПОДПИСНОЙ ИНДЕКС:
УРАЛ-ПРЕСС – 42311

