

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

Том 24, № 5. С. 865-1078

2022

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

МЕДИЦИНСКАЯ ИММУНОЛОГИЯ

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

МЕДИЦИНСКАЯ ИММУНОЛОГИЯ

сентябрь-октябрь

2022, том 24

№ 5

Основан в марте 1999 года

Главный редактор

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

Заместитель главного редактора

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

Редакционная коллегия

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

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

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

Корнева Елена Андреевна – доктор медицинских наук, профессор, заслуженный деятель науки РФ, академик РАН, главный научный сотрудник отдела общей патологии и патологической физиологии НИИ экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия

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

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

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

Ответственный секретарь:

Ракитянская Н.В.

E-mail: medimmun@spbraaci.ru

Редактор перевода:

д.м.н. Чухловин А.Б.

Редактор электронной версии:

Ерофеева В.С.

Редакция: тел./факс (812) 233-08-58

Адрес для корреспонденции:

197101, Санкт-Петербург, а/я 130.

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

© Медицинская иммунология

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

Свидетельство о регистрации № П 3612.

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

Свидетельство о регистрации ПИ № 77-15892.

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

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

Издательство «Человек»

199004, Россия, Санкт-Петербург, Малый пр. В.О., 26, оф. 3.

E-mail: mail@mirmed.ru

Тел./факс: (812) 325-25-64.

Подписано в печать 19.10.2022 г. Формат 60 x 90 1/8. Печать офсетная.

Усл. печ. л. 26,75. Тираж 2000 экз. (1-й завод – 1000 экз.) Заказ № 056

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 «Шаритэ», 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

September-October

2022, volume 24

No. 5

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, Saint Petersburg Pasteur Institute, 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 19.10.2022. Print format 60 x 90 1/8. Offset printing.

Printed sheets 26.75. 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

Павлов О.В., Чепанов С.В., Селютин А.В., Сельков С.А. ТРОМБОЦИТАРНО-ЛЕЙКОЦИТАРНЫЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ: ИММУНОРЕГУЛЯТОРНАЯ РОЛЬ И ПАТОФИЗИОЛОГИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ.....	871
Агаев Т., Титерина Е.К., Хорева М.В., Ганковская Л.В. РОЛЬ ЦИТОКИНОВ ПРИ ГЕПАТОЦЕЛЛЮЛЯРНОЙ КАРЦИНОМЕ.....	889
Артамонов А.А., Никитин Ю.В., Мешкова М.Е., Иванов А.М. РОЛЬ IFN γ В ПАТОГЕНЕЗЕ ИНФЕКЦИИ, ВЫЗВАННОЙ SARS-CoV-2	903
Ширинский В.С., Ширинский И.В. ОСТЕОИММУНОЛОГИЯ: МЕЖДИСЦИПЛИНАРНЫЙ ПОДХОД К ИЗУЧЕНИЮ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ КЛЕТОК ИММУННОЙ СИСТЕМЫ И КОСТНОЙ ТКАНИ.....	911

Оригинальные статьи

Максимова А.А., Шевела Е.Я., Сахно Л.В., Тихонова М.А., Останин А.А., Черных Е.Р. M-CSF И GM-CSF ДЕТЕРМИНИРУЮТ ФИБРОМОДУЛИРУЮЩУЮ АКТИВНОСТЬ ПОЛЯРИЗОВАННЫХ МАКРОФАГОВ ЧЕЛОВЕКА	931
Изюрова Н.В., Савочкина А.Ю., Узунова А.Н., Нохрин Д.Ю. ЦИТОКИНОВЫЙ ПРОФИЛЬ ПРИ ВНЕБОЛЬНИЧНОЙ ПНЕВМОНИИ У ДЕТЕЙ	943
Бычкова Н.В. CD3 ⁺ CD294 ⁺ Т-ЛИМФОЦИТЫ 2-ГО ТИПА ИММУННОГО ОТВЕТА И ИХ РОЛЬ В РАЗВИТИИ АЛЛЕРГИЧЕСКОГО ВОСПАЛЕНИЯ	955
Климов А.В., Салахутдинова З.В., Найдина О.А., Климов В.В., Свиридова В.С., Пронина Н.А., Слѣзкин М.И. ОЦЕНКА УРОВНЯ СРЫВА ТОЛЕРАНТНОСТИ К АЛЛЕРГЕНАМ ПРИ ЛОКАЛЬНОМ И КЛАССИЧЕСКОМ АЛЛЕРГИЧЕСКОМ РИНИТЕ	967
Довгань А.А., Драпкина Ю.С., Долгушина Н.В., Менжинская И.В., Инвизьева Е.В., Вторушина В.В., Кречетова Л.В., Сухих Г.Т. ВЛИЯНИЕ ВАКЦИНАЦИИ ОТ COVID-19 НА ИММУННЫЙ СТАТУС И ПРОФИЛЬ АУТОАНТИТЕЛ У ЖЕНЩИН РЕПРОДУКТИВНОГО ВОЗРАСТА	979
Свириденко Н.Ю., Бессмертная Е.Г., Беловалова И.М., Шеремета М.С., Бабаева Д.М., Малышева Н.М., Трошина Е.А., Мельниченко Г.А. ТРАНСФОРМИРУЮЩИЙ ФАКТОР РОСТА $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) У ПАЦИЕНТОВ С ЭНДОКРИННОЙ ОФТАЛЬМОПАТИЕЙ И БОЛЕЗНЬЮ ГРЕЙВСА – ПРЕДИКТОР ЭФФЕКТИВНОСТИ ЛЕЧЕНИЯ?.....	993
Савченко А.А., Дудина М.А., Догадин С.А., Борисов А.Г., Кудрявцев И.В., Фомина Д.В., Беленюк В.Д. ИЗМЕНЕНИЕ ФЕНОТИПА Т- И В-ЛИМФОЦИТОВ ПРИ ЛЕЧЕНИИ РАДИОАКТИВНЫМ ЙОДОМ ПАЦИЕНТОВ С БОЛЕЗНЬЮ ГРЕЙВСА.....	1007
Жданова Е.В., Костоломова Е.Г., Волкова Д.Е., Зыков А.В. КЛЕТОЧНЫЙ СОСТАВ И ЦИТОКИНОВЫЙ ПРОФИЛЬ СИНОВИАЛЬНОЙ ЖИДКОСТИ ПРИ РЕВМАТОИДНОМ АРТРИТЕ.....	1017
Печникова Н.А., Останкова Ю.В., Тотолян Арег А. ПРИМЕНЕНИЕ БИОИНФОРМАТИЧЕСКОГО АНАЛИЗА ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ГЕНОВ-КАНДИДАТОВ, АССОЦИИРОВАННЫХ С НАСЛЕДСТВЕННЫМ АНГИОТЕКОМ	1027
Бубнова Л.Н., Кузьмич Е.В., Павлова И.Е., Беляева Е.В., Терентьева М.А. СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ИММУНОГЕНЕТИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ ДОНОРОВ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ СТЕЛОВЫХ КЛЕТОК РЕГИСТРОВ ДВУХ РОССИЙСКИХ МЕГАПОЛИСОВ.....	1047

Краткие сообщения

Орловская И.А., Топоркова Л.Б., Княжева М.А., Савкин И.В., Серенко Е.В., Гойман Е.В., Шевченко Ю.А., Маркова Е.В. ВЛИЯНИЕ РАСТВОРИМЫХ ФАКТОРОВ МАКРОФАГОВ M2-ФЕНОТИПА НА ГЕМОПОЭЗ ПРИ ДЕПРЕССИВНО-ПОДОБНОМ СОСТОЯНИИ	1057
--	------

Точка зрения

Муратходжаев Д.Н., Арипова Т.У. ОСНОВА ПРОТИВОВИРУСНОЙ ЗАЩИТЫ ЧЕЛОВЕКА – РНК-ИНТЕРФЕРЕНЦИЯ	1065
---	------

Правила для авторов	1075
---------------------------	------

Авторский указатель	1078
---------------------------	------

Предметный указатель.....	1078
---------------------------	------

CONTENTS

Reviews

Pavlov O.V., Chepanov S.V., Selutin A.V., Selkov S.A.

PLATELET-LEUKOCYTE INTERACTIONS: IMMUNOREGULATORY ROLE AND PATHOPHYSIOLOGICAL RELEVANCE 871

Aghayev T., Titerina E.K., Khoreva M.V., Gankovskaya L.V.

ROLE OF CYTOKINES IN HEPATOCELLULAR CARCINOMA 889

Artamonov A.A., Nikitin Yu.V., Meshkova M.E., Ivanov A.M.

ROLE OF IFN γ IN PATHOGENESIS OF SARS-CoV-2 INFECTION 903

Shirinsky V.S., Shirinsky I.V.

OSTEOIMMUNOLOGY: AN INTERDISCIPLINARY APPROACH TO STUDYING THE RELATIONSHIPS BETWEEN IMMUNE AND BONE CELLS 911

Original articles

Maksimova A.A., Shevela E.Ya., Sakhno L.V., Tikhonova M.A., Ostanin A.A., Chernykh E.R.

M-CSF AND GM-CSF DETERMINE FIBROMODULATORY ACTIVITY OF POLARIZED HUMAN MACROPHAGES 931

Iziurova N.V., Savochkina A.Yu., Uzunova A.N., Nokhrin D.Yu.

CYTOKINE PROFILE IN COMMUNITY-ACQUIRED PNEUMONIA IN CHILDREN 943

Bychkova N.V.

CD3⁺CD294⁺T CELLS OF THE TYPE 2 IMMUNE RESPONSE: THEIR ROLE IN ALLERGIC INFLAMMATION 955

Klimov A.V., Salakhutdinova Z.V., Naidina O.A., Klimov V.V., Sviridova V.S., Pronina N.A., Slezkin M.I.

ASSESSMENT OF ALLERGEN TOLERANCE BREAKDOWN LEVELS IN LOCAL AND CLASSICAL ALLERGIC RHINITIS 967

Dovgan A.A., Drapkina Yu.S., Dolgushina N.V., Menzhinskaya I.V., Inviyaeva E.V., Vtorushina V.V., Krechetova L.V., Sukhikh G.T.

EFFECT OF COVID-19 VACCINATION ON THE IMMUNE STATUS AND AUTOANTIBODY PROFILE IN WOMEN OF REPRODUCTIVE AGE 979

Sviridenko N.Yu., Bessmertnaya E.G., Belovalova I.M., Sheremeta M.S., Babaeva D.M., Malysheva N.M., Troshina E.A., Melnichenko G.A.

TRANSFORMING GROWTH FACTOR β 1 (TGF- β 1) IN PATIENTS WITH ENDOCRINE OPHTHALMOPATHY AND GRAVES' DISEASE: A PREDICTOR OF TREATMENT EFFICIENCY? 993

Savchenko A.A., Dudina M.A., Dogadin S.A., Borisov A.G., Kudryavtsev I.V., Fomina D.V., Belenyuk V.D.

CHANGES IN THE T AND B LYMPHOCYTE SUBSET PROFILES UPON TREATMENT OF PATIENTS WITH GRAVES' DISEASE WITH RADIOACTIVE IODINE 1007

Zhdanova E.V., Kostolomova E.G., Volkova D.E., Zykov A.V.

CELLULAR COMPOSITION AND CYTOKINE PROFILE OF SYNOVIAL FLUID IN RHEUMATOID ARTHRITIS 1017

Pechnikova N.A., Ostankova Yu.V., Totolian Areg A.

APPLICATION OF BIOINFORMATICAL ANALYSIS TO IDENTIFY CANDIDATE GENES ASSOCIATED WITH HEREDITARY ANGIOEDEMA 1027

Bubnova L.N., Kuzmich E.V., Pavlova I.E., Belyaeva E.V., Terentyeva M.A.

COMPARATIVE ANALYSIS OF IMMUNOGENETIC CHARACTERISTICS OF POTENTIAL HEMATOPOIETIC STEM CELL DONORS FROM THE REGISTRIES OF TWO RUSSIAN MEGAPOLISES 1047

Short communications

Orlovskaya I.A., Toporkova L.B., Knyazheva M.A., Savkin I.V., Serenko E.V., Goiman E.V., Shevchenko Yu.A., Markova E.V.

INFLUENCE OF SOLUBLE FACTORS FROM THE M2 PHENOTYPE MACROPHAGES ON HEMATOPOIESIS IN DEPRESSION-LIKE STATE 1057

Point of view

Muratkhodjaev J.N., Aripova T.U.

RNA INTERFERENCE IS THE BASIS OF HUMAN ANTIVIRAL DEFENSE 1065

Instructions to Authors 1075

Author index 1078

Subject index 1078

ТРОМБОЦИТАРНО-ЛЕЙКОЦИТАРНЫЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ: ИММУНОРЕГУЛЯТОРНАЯ РОЛЬ И ПАТОФИЗИОЛОГИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ

Павлов О.В.¹, Чепанов С.В.¹, Селютин А.В.¹, Сельков С.А.^{1,2}

¹ ФГБНУ «Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии имени Д.О. Отта», Санкт-Петербург, Россия

² ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Резюме. Тромбоциты не только являются важнейшими участниками процессов тромбообразования и свертывания крови, но и обладают иммунорегуляторными свойствами, представляя собой связующее звено между системой гемостаза и иммунной системой. Морфофункциональные характеристики тромбоцитов обеспечивают постоянное мониторирование состояния кровеносной системы, выявление угроз различного характера, формирование ответа и вовлечение в него в том числе иммунокомпетентных клеток. Дистантные межклеточные взаимодействия тромбоцитов с лейкоцитами осуществляются посредством иммунорегуляторных молекул, которые наряду с факторами коагуляции и тромбообразования выделяются в результате активации и дегрануляции тромбоцитов. Продуцируемые активированными тромбоцитами хемокины, цитокины, ростовые факторы, некоторые из которых синтезируются *de novo*, оказывают модулирующее действие на функции клеток врожденного и адаптивного звена иммунной системы. Активированные тромбоциты вступают в непосредственный контакт с иммунокомпетентными клетками, в результате чего формируются гетеротипические агрегаты – тромбоцитарно-лейкоцитарные комплексы, – которые наряду с форменными элементами крови циркулируют в кровеносной системе. Образование и стабилизация агрегатов осуществляются за счет взаимодействия различных молекул, экспрессируемых на поверхности тромбоцитов и лейкоцитов, главную роль среди которых играет пара Р-селектин (CD62P) – PSGL-1 (CD162). Наиболее многочисленными являются комплексы тромбоцитов с моноцитами и нейтрофилами, при этом тромбоцитарно-моноцитарные комплексы отличаются наибольшей стабильностью. Микровезикулы тромбоцитарного происхождения также вступают во взаимодействие с лейкоцитами с образованием гетеротипических агрегатов и предположительно оказывают модулирующее воздействие на функции иммунных клеток посредством переноса не кодирующих молекул РНК. Формирование тромбоцитарно-лейкоцитарных комплексов приводит к взаимной активации тромбоцитов и лейкоцитов. Под действием тромбоцитов и тромбоцитарных микровезикул в моноцитах и нейтрофилах происходит усиление секреции цитокинов и реактивных форм кислорода, фагоцитарной активности, индуцируется образование нейтрофильной внеклеточной ловушки и прокоагулянтный фенотип моноцитов. Тромбоциты оказывают регуляторное влияние на дифференцировку моноцитов, усиливают адгезию и трансмиграцию лимфоцитов и НК-клеток. В очагах воспаления тромбоциты способ-

Адрес для переписки:

Павлов Олег Владимирович
ФГБНУ «Научно-исследовательский институт
акушерства, гинекологии и репродуктологии
имени Д.О. Отта»
199034, Россия, Санкт-Петербург,
Менделеевская линия, 3.
Тел.: 8 (812) 328-98-50.
Факс: 8 (812) 323-75-45.
E-mail: ovpavlov@hotmail.com

Address for correspondence:

Pavlov Oleg V.
D. Ott Institute of Obstetrics, Gynecology,
and Reproductive Medicine
199034, Russian Federation, St. Petersburg,
Mendeleevskaya Line, 3.
Phone: 7 (812) 328-98-50.
Fax: 7 (812) 323-75-45.
E-mail: ovpavlov@hotmail.com

Образец цитирования:

О.В. Павлов, С.В. Чепанов, А.В. Селютин, С.А. Сельков
«Тромбоцитарно-лейкоцитарные взаимодействия:
иммунорегуляторная роль и патофизиологическое
значение» // Медицинская иммунология, 2022. Т. 24,
№ 5. С. 871-888. doi: 10.15789/1563-0625-PLI-2511
© Павлов О.В. и соавт., 2022

For citation:

O.V. Pavlov, S.V. Chepanov, A.V. Selutin, S.A. Selkov
“Platelet-leukocyte interactions: immunoregulatory role
and pathophysiological relevance”, *Medical Immunology
(Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2022, Vol. 24, no. 5,
pp. 871-888. doi: 10.15789/1563-0625-PLI-2511
DOI: 10.15789/1563-0625-PLI-2511

ствуют экстравазации и инфильтрации лейкоцитов в поврежденные участки тканей. Нарушения во взаимодействии тромбоцитов с клетками эндотелия сосудов и клетками иммунной системы могут лежать в основе различных патологических состояний. Повышенный уровень циркулирующих тромбоцитарно-лейкоцитарных комплексов наблюдается при многих патологических состояниях, в числе которых сердечно-сосудистые и респираторно-легочные заболевания, заболевания почек, заболевания печени, сахарный диабет, репродуктивные патологии, бактериальные и вирусные инфекции. Изучение тромбоцитарно-лейкоцитарных взаимодействий необходимо для уточнения патогенеза и выработки новых терапевтических подходов к лечению этих заболеваний.

Ключевые слова: тромбоциты, лейкоциты, тромбоцитарно-лейкоцитарные комплексы, иммуномодуляция, патология

PLATELET-LEUKOCYTE INTERACTIONS: IMMUNOREGULATORY ROLE AND PATHOPHYSIOLOGICAL RELEVANCE

Pavlov O.V.^a, Chepanov S.V.^a, Selutin A.V.^a, Selkov S.A.^{a, b}

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

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

Abstract. Blood platelets are the central players in thrombosis and blood coagulation. Moreover, they also exhibit immunoregulatory properties and bridge hemostasis and immunity. Morphological and functional characteristics of the platelets ensure continuous surveillance for the vascular system, recognition of different hazards, development of appropriate response and recruitment of immune cells. Indirect platelet-leukocyte interactions are mediated by immunoregulatory molecules that are released, along with coagulation and thrombosis factors in the course of platelet activation and degranulation. Chemokines, cytokines, growth factors, some of which are synthesized *de novo*, are released from activated platelets and modulate cellular functions, thus modulating both innate and adaptive immune response. Activated platelets enter contacts with immune cells to form heterotypic aggregates, i.e., platelet-leukocyte complexes that reside in blood circulation along with other blood cells. The aggregate formation and stabilization is mediated by interaction between the molecules expressed on the surface of platelets and leukocytes, in particular, P-selectin (CD62P) and PSGL-1 (CD162). Platelet-monocyte and platelet-neutrophil complexes are most abundant, with platelet-monocyte aggregates being most stable. Moreover, the platelet-derived microvesicles also interact with leukocytes to form heterotypic aggregates, thus, probably, modulating the immune cell functions *via* transfer of non-coding RNA molecules. Formation of platelet-leukocyte complexes results into mutual activation of platelets and leukocytes. Platelets and platelet-derived microvesicles stimulate phagocytic activity, cytokine secretion, and generation of reactive oxygen species in monocytes and neutrophils, inducing formation of neutrophilic extracellular traps and procoagulant phenotype in monocytes. The blood platelets regulate monocyte differentiation, promote adhesion, as well as transmigration of lymphocytes and NK cells. At the sites of inflammation, platelets enhance extravasation and infiltration of leukocytes into the damaged tissue. Impaired interactions of platelets with endothelial layer and immune cells may underlie pathogenic conditions. Increased level of circulating platelet-leukocyte complexes is observed in various disorders including cardiovascular diseases, acute ischemic stroke, respiratory disorders, renal pathologies, liver diseases, diabetes, reproductive disorders, bacterial and viral infections. Further studies of platelet-leukocyte interactions are warranted to unveil pathogenic mechanisms and to develop new therapeutic approaches.

Keywords: platelets, leukocytes, platelet-leukocyte complexes, immunomodulation, pathology

Статья подготовлена в рамках выполнения ФНИ № 1021062812133-0-3.2.2 «Оптимизация методов предикции, профилактики и лечения «больших акушерских синдромов», а также стратегии родоразрешения у беременных из групп высокого риска, с целью улучшения акушерских и перинатальных исходов».

Введение

Тромбоциты играют центральную роль в системе гемостаза. При повреждении кровеносного сосуда тромбоциты первыми оказываются в зоне поражения и активируются в при контакте с поврежденным эндотелием. Это приводит к привлечению новых тромбоцитов, их активации,

агрегации и формированию тромба, предотвращающего кровопотерю. Процесс тромбообразования самым тесным образом оказывается связан с воспалением и иммунным ответом. Помимо того, что тромбоциты сами обладают функцией иммунной защиты, они способствуют привлечению и перемещению иммунокомпетентных клеток в места повреждения и воспаления. В последнее время все большее внимание привлекают иммуномодуляторные свойства тромбоцитов. Активированные тромбоциты и тромбоцитарные микрочастицы могут взаимодействовать с лейкоцитами, что приводит к их взаимной стимуляции. Тромбоциты способны модулировать эффекторные функции лейкоцитов, стимулировать их экстравазацию и дифференцировку, а также усиливать или ослаблять секрецию цитокинов. Одной из форм взаимодействия тромбоцитов с клетками иммунной системы является образование тромбоцитарно-лейкоцитарных комплексов (ТЛК). Имеющиеся данные об изменениях уровня ТЛК в системной циркуляции при различных инфекционных и неинфекционных заболеваниях указывают на возможную патогенетическую роль этих межклеточных образований. Комплексы, образованные тромбоцитами и разными типами иммунокомпетентных клеток, представляют собой и биомаркер активации тромбоцитов, и объект терапевтического воздействия при лечении различных патологических состояний.

Тромбоциты — «патрульные» кровеносной системы

Тромбоциты являются наиболее мелкими (диаметр 2–5 мкм) и вторыми после эритроцитов по численности ($2-4 \times 10^5$ в микролитре) форменными элементами крови. Кровяные пластинки были открыты и описаны в середине девятнадцатого века. Само название «тромбоцит», данное в 1901 г., говорит об участии этих клеток в процессах тромбообразования и гемокоагуляции, т. е. в поддержании системы гемостаза. Долгое время эти функции считались основными, и результаты многочисленных исследований тромбоцитов рассматривались, главным образом, с точки зрения их гемостатической роли. Однако первые два десятилетия двадцатого века ознаменовались существенными изменениями в представлениях о свойствах и функциях тромбоцитов. В первую очередь, это касается признания того факта, что тромбоциты являются активными участниками иммунных и воспалительных реакций, в которых нередко играют иницирующую роль, выступая как факторы врожденного иммунитета, обладающие эффекторными и регуляторными свойствами [1, 2, 28, 62, 79, 106].

Показано, что тромбоциты вступают в непосредственный контакт с инфекционным агентом,

осуществляя нейтрализацию и интернализацию бактерий и вирусов [141, 146] и самостоятельно уничтожают внутриклеточных паразитов [95, 96].

Иммунорегуляторная роль тромбоцитов представляет особый интерес как в физиологическом, так и в патофизиологическом аспекте. Взаимодействие тромбоцитов с иммунокомпетентными клетками является связующим звеном между процессами тромбообразования и гемокоагуляции с одной стороны и воспалительными и иммунными реакциями с другой, т. е. между системой гемостаза и иммунной системой. Имеющиеся на сегодняшний день результаты исследований дают основания предполагать, что нарушения во взаимодействии тромбоцитов с клетками эндотелия сосудов и клетками иммунной системы могут лежать в основе различных патологических состояний, и изучение клеточно-молекулярных механизмов этих взаимодействий будет способствовать развитию новых подходов к диагностике и лечению этих заболеваний.

Для описания тесной связи между патогенетическими механизмами тромбообразования и воспаления, обуславливающими ряд патологических состояний, было введено понятие тромбовоспаления (thrombo-inflammation), которое предполагает взаимное влияние эндотелиальных клеток, системы гемостаза и иммунной системы [97]. При таких заболеваниях, как тромбоз глубоких вен, атеросклероз, сепсис и др., воспаление вызывает тромбоз, который, в свою очередь, усиливает воспалительный ответ [106].

Морфофункциональные особенности тромбоцитов позволяют им проводить непрерывное мониторирование всех участков кровеносной системы и делают их практически идеальными «патрульными», которые обладают широким набором средств детекции для отслеживания разнообразных угроз и средств сигнализации для вовлечения других клеток в процесс ликвидации этой угрозы и ее последствий. Совокупность характеристик тромбоцитов (малые размеры, автономность, оснащенность, мобильность, маневренность и вездесущность) дает основание провести аналогию с искусственными беспилотными летательными аппаратами (дронами) [79].

Тромбоциты обладают удивительно широким набором рецепторных молекул, с помощью которых улавливают разнообразные сигналы микроокружения и сигналы опасности, исходящие от поврежденных клеток и тканей собственного организма или от проникшего в организм инфекционного агента. В соответствии с разной природой улавливаемых сигналов и различиями в вызываемых ими биологических эффектах, можно выделить группы рецепторов, участвующих пре-

имущественно в гемостатических или иммунных реакциях [79].

К первым относятся молекулы, детектирующие повреждения сосудов, взаимодействующие с компонентами коагуляционного каскада и обеспечивающие адгезию тромбоцитов друг к другу и к внеклеточному матриксу. Это гликопротеиновый комплекс GPIb-IX-V, являющийся основным рецептором фактора фон Виллебранда и механорецептором [26, 64], интегрин $\alpha 2\beta 1$ и гликопротеин GPVI (связываются с коллагеном), интегрин $\alpha \text{IIb}\beta 3$ (связывается с фибриногеном), $\alpha 2\beta 2$, $\alpha 5\beta 1$, $\alpha 6\beta 1$, $\alpha \nu \beta 3$, рецепторы тромбина PAR-1 и PAR-4, рецептор лектинового типа CLEC-2, взаимодействующий с подопланином, который экспрессируется эндотелиальными клетками лимфатических сосудов.

Вовлечение тромбоцитов в иммунный ответ опосредовано рецепторами различной специфичности, многие из которых характерны для иммунокомпетентных клеток. К ним относятся Toll-like рецепторы, участвующие в распознавании консервативных структур патогенов (TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR6, TLR7, TLR9), рецепторы к Fc-фрагменту иммуноглобулинов (Fc α RI, Fc RI, Fc γ RIIa), к активированным компонентам комплемента и их фрагментам (C1qR, C3aR, C5aR), рецепторы хемокинов (CCR1, CCR3, CCR4, CXCR4, CX3CR1), рецепторы сиаловых кислот (Siglec-7, Siglec-9, Siglec-11) и др.

Важнейшую роль в активации тромбоцитов играют пуринергические рецепторы P2Y1, P2Y12 и P2X1, которые связывают молекулы АДФ и АТФ, высвобождающиеся из поврежденных клеток и из плотных гранул тромбоцитов [32, 48].

Тромбоциты первыми мобилизуются в место повреждения кровеносного сосуда, представляя собой наиболее многочисленную популяцию воспалительных клеток, которые реагируют на механическую травму или инфекцию и играют ключевую роль в регуляции формирующегося иммунного ответа. Регуляторная функция тромбоцитов реализуется либо дистантно, посредством выделения растворимых медиаторов, обладающих иммуномодуляторными эффектами, либо в результате непосредственного контакта и образования межклеточных комплексов тромбоцитов с иммунокомпетентными клетками.

Межклеточные взаимодействия тромбоцитов и лейкоцитов

Дистантное взаимодействие

Получив сигналы, свидетельствующие о повреждении сосуда, тромбоциты активируются и инициируют процесс тромбообразования, запуская каскад коагуляционных реакций. Активация тромбоцитов сопровождается их дегрануляцией, в результате которой происходит высвобождение

различных медиаторов во внешнюю среду, а молекулы, находившиеся на внутренней стороне мембран гранул, оказываются экспонированными на поверхности клеток [107]. Помимо прокоагулянтных и антикоагулянтных факторов, участвующих в регуляции свертывания крови и тромбообразования, активированные тромбоциты секретируют медиаторы воспаления, обладающие иммунорегуляторными свойствами.

Активация тромбоцитов может происходить и под воздействием сигналов иммунной опасности, которые исходят непосредственно от инфекционного агента и распознаются с помощью рецепторов к консервативным структурам микроорганизмов (pathogen-associated molecular pattern, PAMP), либо опосредованы факторами, продуцируемыми иммунокомпетентными клетками (нейтрофильные внеклеточные ловушки, цитокины).

Среди растворимых факторов, выделяемых активированными тромбоцитами, есть хемокины CCL2 (MCP-1), CCL3 (MIP-1 α), CCL5 (RANTES), CXCL1, CXCL4, CXCL5, CXCL7, CXCL8, CXCL12, цитокины IL-1 β , IL-6, IL-8, TRAIL, LIGHT, HMGB-1, MIF, ростовые факторы EGF, TGF- β , HGF, BDNF, IGF-1, PDGF, FGF- β , VEGF. Все эти молекулы могут модулировать функции клеток иммунной системы, либо вызывая их активацию, либо ослабляя иммунный ответ. В экспериментах *in vitro* CXCL4 (PF-4) стимулировал фагоцитарную активность моноцитов и выработку ими активных форм кислорода [102], повышал жизнеспособность моноцитов, индуцировал секрецию TNF α и способствовал дифференцировке в макрофаги [113]. Этот же хемокин, а также CCL5 (RANTES) индуцировали секрецию CXCL2 макрофагами [57, 58] и усиливали адгезию моноцитов на активированном эндотелии [136]. Показано, что CXCL12, выделяемый тромбоцитами, оказывает регуляторное воздействие на функции моноцитов, стимулируя их миграцию, адгезию и фагоцитарную активность, повышает жизнеспособность этих клеток, способствует их дифференцировке в M2 макрофаги, и эти эффекты опосредованы рецепторами CXCR4 и CXCR7 [21]. Еще более выраженное влияние на хемотаксис моноцитов оказывал провоспалительный цитокин MIF тромбоцитарного происхождения, который значительно усиливал трансмиграцию и адгезию моноцитов к эндотелию [126, 140]. Секретируемый активированными тромбоцитами TGF- β индуцировал экспрессию Fc γ RIII (CD16) на поверхности моноцитов, что приводило к приобретению этими клетками «неклассического» фенотипа и расширению их эффекторных функций [104]. В то же время активированные тромбоциты посредством TGF- β

повышали жизнеспособность нейтрофилов, подавляя апоптоз этих клеток [16].

Активированные тромбоциты выделяют цитокины HMGB-1, относящийся к сигналам опасности, или аларминам (damage-associated molecular pattern, DAMP), которые способны индуцировать неинфекционный воспалительный ответ. Этот фактор участвует в активации моноцитов и нейтрофилов, вызывая в последних транслокацию миелопероксидазы к клеточной мембране и повышение уровня экспрессии лейкоцитарного β 2-интегрина (CD18), а также формирование внеклеточной ловушки (нетоз) [93]. Образование нейтрофилами внеклеточных ловушек стимулируют и другие продукты активации тромбоцитов — фактор фон Виллебранда и тромбоксан A_2 [18].

Примечательно, что кроме высвобождения уже содержащихся в гранулах медиаторов, тромбоциты способны к синтезу *de novo* IL-1 β и IL-18 посредством молекул мРНК, полученных при отпочковании от родительской клетки — мегакариоцита [4, 27, 83]. Тромбоциты являются основным источником растворимой формы CD40L (sCD40L) — фактора, который индуцирует продукцию активных форм кислорода и экспрессию молекул адгезии нейтрофилами, вызывает активацию макрофагов и модулирует активность цитотоксических Т-лимфоцитов и В-клеток при иммунном ответе на инфекцию [33, 94, 134]. Однако sCD40L может вызывать и противовоспалительный ответ моноцитов, стимулируя выработку ими IL-10 и подавляя продукцию TNF α и IL-6 [45].

Формирование гетеротипических агрегатов тромбоцитов с лейкоцитами

Активированные тромбоциты вступают в непосредственный контакт с лейкоцитами, результатом чего является образование межклеточных агрегатов (комплексов). Считается, что первичным и определяющим событием в образовании ТЛК является взаимодействие Р-селектина (CD62P), высвобождаемого при активации тромбоцита из альфа-гранул на поверхность плазматической мембраны, с лигандом PSGL-1 (CD162), который конститутивно экспрессируется на поверхности лейкоцитов [131, 150]. Эта основная связь усиливается и стабилизируется за счет взаимодействия гликопротеина тромбоцитов Ib α (GPIb α , CD42b) с молекулой MAC-1 (CD11b/CD18) [118], а также CD40 на поверхности лейкоцитов с соответствующим лигандом CD40L (CD154) [131]. Тромбоцитарный комплекс GPIIb/IIIa (CD41/CD61) связывается с MAC-1 через фибриногеновый «мостик» [40], а тромбоспондин опосредует взаимодействие двух молекул CD36, экспрессируемых разными клет-

ками [117]. Кроме этого, еще несколько пар белковых молекул могут участвовать в образовании тромбоцитарно-лейкоцитарных комплексов: ICAM-2 и LFA-1 [133], JAM-C и MAC-1 [111], CD62P и CD15 [77], TREM-1L и TREM-1 [47], CLEC-2 и подоплатин [56], GPVI и CD147 [116].

Среди лейкоцитов наибольшее количество комплексов с тромбоцитами образуют моноциты и нейтрофилы, а наименьшее — В-лимфоциты и NK-клетки, тогда как дендритные клетки и Т-лимфоциты занимают в этой линейке промежуточное положение [114]. Моноциты обладают наибольшей аффинностью к тромбоцитарному CD62P, комплексы тромбоцитов с моноцитами являются более стабильными, чем комплексы с другими лейкоцитами, и составляют основную популяцию тромбоцитарно-лейкоцитарных агрегатов.

Помимо тромбоцитов во взаимодействие с лейкоцитами могут вступать более мелкие неклеточные образования — микрочастицы (микровезикулы). По данным Fendl и соавт., микрочастицы тромбоцитарного происхождения являются второй по численности популяцией и составляют 20-30% от всех микрочастиц в цельной крови [36]. Как и тромбоциты, тромбоцитарные микрочастицы связываются преимущественно с моноцитами, в меньшей степени с гранулоцитами, практически не взаимодействуя с лимфоцитами, и это связывание зависит от наличия ионов Ca^{2+} [35, 138]. Взаимодействие тромбоцитарных микровезикул с лейкоцитами было продемонстрировано в эксперименте *in vitro*, при этом тканевой фактор передавался с микровезикул на моноциты, но не на гранулоциты [86]. К настоящему времени сложилось представление о тромбоцитарных микровезикулах как об основном переносчике не кодирующих молекул РНК в системе циркуляции [129, 139]. Учитывая способность этих микровезикул связываться с лейкоцитами, можно предположить, что они оказывают модулирующее воздействие на функции лейкоцитов, в первую очередь моноцитов и нейтрофилов, посредством переноса регуляторных РНК.

Модуляция функций иммунных клеток тромбоцитами

Тромбоциты в составе ТЛК модулируют эффекторные функции лейкоцитов и таким образом участвуют в регуляции воспалительного ответа при повреждении или инфекции.

Формирование ТЛК вызывает взаимную активацию и быстрый локальный выброс тромбоцитарных цитокинов и хемокинов. Связывание Р-селектина с PSGL-1 усиливало провоспалительные свойства моноцитов, что выражалось в повышении уровня секреции ими TNF α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12, MIP-1 β [127]. По некоторым

данным, для активации моноцитов в составе тромбоцитарно-моноцитарных комплексов (ТМК) необходим RANTES, вырабатываемый тромбоцитами. Под действием RANTES в моноцитах, агрегированных с тромбоцитами, запускались сигнальные процессы и секреция хемокинов, тогда как связывание Р-селектина с PSGL-1 на поверхности моноцита в отсутствие RANTES не приводило к такому эффекту [94]. Тромбоцитарные микрочастицы также вызывали активацию моноцитов, стимулируя в них секрецию С5а компонента комплемента и TNF α [135].

Взаимодействие с активированными тромбоцитами вызывает дегрануляцию нейтрофилов и усиление секреции IL-1 β , IL-8, MMP-9 [151]. Тромбоциты и тромбоцитарные микровезикулы, связываясь с нейтрофилами, усиливают фагоцитарную активность нейтрофилов в отношении различных бактерий и могут запускать процесс нетоза — особой формы апоптоза, при которой нейтрофилы выбрасывают нити ДНК, образующие сетеподобные структуры и захватывающие внеклеточные бактерии [8, 22, 65, 103]. Индуцированный тромбоцитами ответ нейтрофилов может формироваться не только при бактериальной, но и при вирусной инфекции [63]. Кроме того, нетоз индуцируется и при стерильном воспалении под воздействием классических активаторов тромбоцитов, таких как тромбин, АДФ, арахидоновая кислота, коллаген [18, 19, 20, 93].

Как и под действием секреторных молекул тромбоцитов, защитные свойства нейтрофилов и моноцитов усиливаются при непосредственном контакте с тромбоцитами за счет стимуляции продукции и высвобождения эффективных антибактериальных факторов — реактивных форм кислорода и миелопероксидазы [72, 114]. Образование высокотоксичных продуктов окислительного взрыва позволяет осуществлять более эффективную деструкцию фагоцитированного патогена. Однако этот феномен имеет и обратную сторону — повреждающее действие на клетки и ткани хозяина. И тромбоциты могут играть протективную роль в этом процессе, предотвращая повреждение тканей путем секвестрации эластазы, выделяемой активированными нейтрофилами [44].

Кроме того, известно, что многие патологические состояния сопровождаются явлениями воспаления и оксидативного стресса, при которых баланс между оксидантами и антиоксидантами в организме нарушен в сторону преобладания субстанций, обладающих окислительными свойствами. Такое состояние способствует агрегации тромбоцитов и, возможно, формированию ими гетеротипических агрегатов с лейкоцитами. Так, например, у пациентов с инфарктом миокар-

да повышение уровня биомаркера перекисного окисления липидов малонового диальдегида сопровождалось увеличением количества комплексов тромбоцитов с моноцитами и нейтрофилами, но не с лимфоцитами [55].

В очагах воспаления тромбоциты способствуют экстравазации и инфильтрации лейкоцитов в поврежденные участки тканей. Прикрепляясь к активированному эндотелию, тромбоциты обеспечивают роллинг лейкоцитов посредством гликопротеинов GPIb и GPIIb/IIIa, взаимодействующих с MAC-1 [49, 122]. Тромбоциты усиливают адгезию и роллинг нейтрофилов за счет CD62P и CXCR2 [29, 73]. Для трансмиграции нейтрофила необходимо взаимодействие PSGL-1 или MAC-1 с тромбоцитарным Р-селектином, а затем связывание CD40 с sCD40L [29, 75, 105]. Взаимодействие активированного тромбоцита с нейтрофилом вызывает поляризацию рецепторов, что является подготовкой к трансэндотелиальной миграции [124].

Активированные нейтрофилы посредством секреторируемых хемокинов привлекают моноциты, в то время как активированные тромбоциты, непосредственно взаимодействуя с моноцитами, стимулируют экспрессию CD40, CD162, CD11b и CCR2 на их поверхности [9, 120]. Это, в свою очередь, способствует образованию новых тромбоцитарно-моноцитарных агрегатов и привлечению новых моноцитов на поверхность эндотелия [6, 120]. Связывание с тромбоцитами повышает уровень экспрессии и активации β 1- и β 2-интегринов в моноцитах и тем самым усиливает их адгезию к активированному эндотелию и трансэндотелиальную миграцию [23]. В дополнение к прямому взаимодействию тромбоцитов с моноцитами тромбоцитарные хемокины CXCL4, CCL5, MIF также стимулируют адгезию моноцитов к активированному эндотелию [126, 136, 140].

Результатом взаимодействия тромбоцитов с лейкоцитами может быть не только развитие воспалительного ответа, но и обратный, противовоспалительный эффект, например усиление продукции липоксина A4, который подавляет адгезию и трансмиграцию нейтрофилов [15].

Тромбоциты оказывают регуляторное влияние на дифференцировку, поляризацию и функциональную активность моноцитов. У человека классифицируют три субпопуляции моноцитов, основываясь на экспрессии антигенов CD14 и CD16: классические (CD14⁺⁺/CD16⁻), промежуточные (CD14⁺⁺/CD16⁺) и неклассические (CD14⁺/CD16⁺⁺). Классические моноциты являются основной фракцией, составляя 80-90% всех моноцитов, и обладают высокой фагоцитирующей способностью. Минорные субпопуляции промежуточных и неклассических моноцитов

характеризуются провоспалительным фенотипом и участием в аутоиммунных и воспалительных процессах. Большинство исследований свидетельствует о том, что тромбоциты предпочитают связываться с промежуточными и/или неклассическими моноцитами [5, 85, 142] и способствуют изменению фенотипа классических (CD16⁻) моноцитов в сторону неклассических (CD16⁺) форм [9, 104]. При ревматоидном артрите формирование тромбоцитарно-моноцитарных комплексов способствовало увеличению субпопуляции промежуточных (CD14⁺⁺/CD16⁺/CCR2⁺) моноцитов за счет повышенной экспрессии CD147 на активированных тромбоцитах [110]. Поскольку в промежуточных моноцитах были повышены уровни продукции TNF α , IL-6 и MMP-9, это может означать сдвиг в сторону воспалительной реакции. Промежуточные моноциты в большей степени взаимодействуют и с микрочастицами тромбоцитарного происхождения. В свежезабранной крови 16,6% промежуточных моноцитов образовывали комплексы с тромбоцитарными микровезикулами, тогда как для классических и неклассических моноцитов эти показатели составляли 5,5% и 3,5% соответственно [138].

Тромбоциты также индуцируют прокоагулянтный фенотип моноцитов. В крови моноциты являются основным источником тканевого фактора, который играет ключевую роль в инициации внешнего пути свертывания крови. В результате прямого контакта с тромбоцитами и при посредстве секретируемого тромбоцитами CXCL4 моноциты начинают экспрессировать тканевой фактор (CD142) [41, 67]. Обнаружено повышенное связывание фактора свертывания крови Ха и фибриногена с поверхностью моноцитов, которые образуют межклеточные агрегаты с тромбоцитами [11]. Таким образом, ТМК могут участвовать в процессах тромбообразования и воспаления.

Активированные тромбоциты взаимодействуют с лимфоцитами, хотя и в меньшей степени, чем с моноцитами и нейтрофилами. В этом взаимодействии участвуют CD62P, GPIIb/IIIa и CD40L [81]. На эффекторные функции лимфоцитов наибольшее влияние оказывают продуцируемые тромбоцитами серотонин и хемокин CXCL4 [78, 84]. Взаимодействие с тромбоцитами усиливает адгезию и трансмиграцию Т- и В-лимфоцитов и NK-клеток. Тромбоциты играют важную роль в хоминге Т-лимфоцитов, обеспечивая их перемещение в лимфатические узлы, а также осуществляют разнонаправленную модуляцию функций в зависимости от субпопуляции Т-лимфоцитов и их микроокружения [115]. Взаимодействие CD40L с CD40 на поверхности

лимфоцитов индуцирует продукцию антител В клетками и обеспечивает переключение изотипа антител [34], а также усиливает активность цитотоксических Т-лимфоцитов [80]. В свою очередь Т-лимфоциты способны регулировать эффекторные функции тромбоцитов, их агрегацию и секрецию α -гранул [80].

Связывание тромбоцитов с дендритными клетками опосредовано молекулами CD62P/CD162 и JAM-C/MAC-1. Это взаимодействие стимулирует мобилизацию дендритных клеток в место повреждения, их адгезию к эндотелию и облегчает проникновение через сосудистую стенку в межклеточное пространство очага воспаления [76].

Тромбоцитарно-лейкоцитарные комплексы при патологических состояниях

На сегодняшний день неизвестно, выполняют ли ТМК какую-либо физиологическую функцию. Такие факты, как повышенный более чем в два раза уровень циркулирующих ТМК у здоровых детей по сравнению со здоровыми взрослыми [145], позволяют предположить, что ТМК играют роль в нормальном развитии, однако этот вопрос, несомненно, требует тщательного изучения. В то же время накоплено значительное количество экспериментальных данных, свидетельствующих об участии этих образований в патологических процессах, носящих характер воспаления (тромбовоспаления) и затрагивающих различные системы и органы. Взаимодействие активированных тромбоцитов с лейкоцитами рассматривается как патофизиологический механизм, имеющий критическое значение для связывания процессов тромбообразования и воспаления.

Сердечно-сосудистые заболевания

В научной литературе упоминание о тромбоцитарно-лейкоцитарных комплексах чаще всего встречается в связи с патологиями сердечно-сосудистой системы. Тромбоциты играют ключевую роль в патогенезе атеросклероза и тромбоза, при этом тромбоцитарно-лейкоцитарные агрегаты, в первую очередь ТМК, служат достаточно показательным маркером активации тромбоцитов.

Более чем двукратное повышение количества циркулирующих ТМК наблюдалось у группы пациентов, имеющих различные сердечно-сосудистые заболевания (патология коронарных и периферических артерий, аневризма брюшной аорты, стеноз сонной артерии), и уровень ТМК коррелировал с уровнями экспрессии маркеров активации тромбоцитов, характеризующих адгезионные свойства — Р-селектина и CD40 [5]. Уровень комплексов с тромбоцитами при остром инфаркте миокарда в общей популяции моноцитов повышался в 2,5 раза, а наибольший вклад

в формирование ТМК вносили промежуточные моноциты (18,41%), тогда как доля комплексов, образованных классическими и неклассическими моноцитами, составляла 7,90% и 6,76% соответственно [85]. В другом исследовании также наблюдалось повышенное образование комплексов промежуточных моноцитов с тромбоцитами в острой фазе инфаркта миокарда [154]. При исследовании пациенток с инфарктом миокарда положительная корреляция между количеством ТМК и степенью тяжести атеросклеротических поражений была выявлена как в опытной, так и в контрольной группе [12]. Значительное повышение уровня ТМК с 12,3% до 35,7% ($p < 0,01$) и положительная корреляция с уровнем биомаркеров системного воспаления (С-реактивный белок, $r = 0,628$, $p < 0,001$) и повреждения сердечной мышцы (тропонин I, $r = 0,557$, $p < 0,001$) наблюдались при остром коронарном синдроме без подъема ST-сегмента [153]. У пациентов с критической ишемией конечностей отмечалась повышенная агрегация с тромбоцитами в общей популяции моноцитов, субпопуляциях промежуточных и неклассических моноцитов, а также в популяции нейтрофилов [30]. В пилотном исследовании Baumer и соавт. была продемонстрирована корреляция между клиническими показателями сердечно-сосудистых заболеваний и уровнем гетеротипических агрегатов, образованных тромбоцитами с некоторыми фракциями иммунных клеток крови, в частности с Т-лимфоцитами, NK-клетками, NKT и субпопуляцией неклассических моноцитов [13]. Таким образом, определение ТМК может быть использовано в клинических целях для определения риска сердечно-сосудистых заболеваний.

Ишемический инсульт

Повышение уровня циркулирующих ТМК с 9,3% до 14,2% в первые сутки после наступления острого ишемического инсульта при отсутствии изменений других показателей, таких как экспрессия Р-селектина и агрегация тромбоцитов, позволяет рассматривать тромбоцитарно-лейкоцитарные агрегаты как более чувствительный биомаркер активации тромбоцитов [123]. Сообщается об увеличении количества ТМК, образованных моноцитами, нейтрофилами и лимфоцитами [128]. В других исследованиях отмечалось повышенное связывание тромбоцитов с моноцитами и нейтрофилами, но не с лимфоцитами [53, 61, 92]. При этом краткосрочное увеличение уровня ТМК было характерно для острой фазы и сменялось более продолжительным повышением количества тромбоцитарно-нейтрофильных комплексов (ТНК) [92]. Взаимодействия тромбоцитов с лейкоцитами может приводить к повреждению мозга, способствуя инфильтрации

лейкоцитов, усиления проницаемости гематоэнцефалического барьера и увеличению зоны инфаркта [59, 60]. Повышенная экспрессия CD40L тромбоцитами и усиленное формирование ТМК ассоциируются с неблагоприятным клиническим исходом у пациентов, перенесших ишемический инсульт, и могут служить прогностическими маркерами [88].

Респираторно-легочные заболевания

Взаимодействие тромбоцитов с нейтрофилами играет ключевую роль в патогенезе острого повреждения легких (ОПЛ), которое характеризуется усиленной инфильтрацией нейтрофилов из сосудов в легочные структуры и секрецией медиаторов воспаления, в частности тромбоксана A_2 (TxA_2). В модели экспериментально индуцированного ОПЛ у мышей в системной циркуляции и микрокапиллярах легких наблюдалось повышение уровня ТНК и продуцируемого ими TxA_2 [152]. Связывание тромбоцитов с нейтрофилами было обусловлено взаимодействием Р-селектина с PSGL-1, и блокада этого взаимодействия с помощью специфических антител снижала как содержание тромбоцитарно-нейтрофильных агрегатов в крови, так и миграцию нейтрофилов в ткань легкого, а также другие патологические изменения, и в целом предотвращала развитие заболевания [152]. В модели септического ОПЛ также была продемонстрирована определяющая роль тромбоцитов в активации нейтрофилов, и в этом взаимодействии не участвовали Р-селектин и GPIIb/IIIa тромбоцитов, однако оно было опосредовано PSGL-1 нейтрофилов, хемокинами CCL17, CCL22 и продуцируемыми тромбоцитами CCL5 и CXCL4 [43, 71]. У пациентов с хронической обструктивной болезнью легких (ХОБЛ) отмечено увеличение количества циркулирующих ТМК, уровень которых дополнительно повышался при переходе заболевания в острую фазу [3, 90]. Однако усиление взаимодействия тромбоцитов с моноцитами при ХОБЛ не обусловлено активацией тромбоцитов, поскольку повышение уровня не сопровождалось изменением активационного статуса тромбоцитов, повышенной реактивностью при стимуляции агонистами *ex vivo* и коагулометрических показателей в плазме крови [3, 90]. Эти данные указывают на то, что при ХОБЛ фактором, инициирующим формирование ТМК, может являться активация моноцитов, и связывание моноцитов с тромбоцитами опосредовано не взаимодействием Р-селектина с PSGL-1, а другими молекулами, в частности MAC-1, экспрессия которой усиливается при активации моноцита, и GPIIb, конститутивно экспрессируемой тромбоцитами.

Заболевания почек

Во многих случаях гломерулопатия является следствием системного иммунного воспали-

тельного ответа, при котором различные типы иммунокомпетентных клеток могут оказывать повреждающее действие на структуру и функции клубочкового аппарата почек [68, 69, 70]. Участие тромбоцитов в этих процессах опосредовано их непосредственным взаимодействием с лейкоцитами, о чем свидетельствуют результаты экспериментов. Отсутствие или блокирование тромбоцитарного Р-селектина значительно снижало инфильтрацию нейтрофилов и вызванное этим нарушение функции почек в моделях экспериментального гломерулонефрита [73, 147] и постшемической почечной недостаточности [119]. В клубочковых капиллярах происходит постоянное динамическое взаимодействие тромбоцитов с моноцитами и нейтрофилами, а при воспалении количество и длительность таких взаимодействий значительно возрастает, причем мобилизация и активация нейтрофилов происходит только в присутствии тромбоцитов [37]. Повышение уровня циркулирующих ТЛК отмечается у пациентов, перенесших трансплантацию почки, у пациентов, проходящих процедуру гемодиализа, а также при хронических заболеваниях почек и при острой почечной недостаточности [7, 24, 42, 144]. Все эти факты позволяют рассматривать ТЛК в качестве потенциального прогностического биомаркера при патологиях почек.

Заболевания печени

Поскольку физиологическая роль тромбоцитов заключается в поддержании целостности кровеносных сосудов, эти клетки важны для обеспечения нормального функционирования печени, а также участвуют в ее регенерации в случае повреждения [99, 125]. Однако при патологических состояниях взаимодействие тромбоцитов с лейкоцитами может способствовать развитию заболевания и поражению печени. В модели хронического заболевания печени у мышей тромбоциты стимулировали инфильтрацию нейтрофилов и цитотоксических Т-лимфоцитов в печень, и этот эффект был опосредован секрецией хемокина CXCL4 [149]. В модели стерильного воспаления тромбоциты выстилали эндотелий печеночных синусоидов, прилегающих к месту повреждения, создавая тем самым субстрат, по которому нейтрофилы перемещались к поврежденному участку [122]. При вирусной инфекции наблюдалась мобилизация тромбоцитов и нейтрофилов в микроциркуляторное русло печени и их взаимодействие, которое приводило к образованию крупных гетеротипических агрегатов и выбрасыванию нейтрофилами внеклеточных ловушек [63]. Это свидетельствует о модулирующей функции тромбоцитов, которые в результате непосредственного контакта с патогеном вызывают активацию лейкоцитов. При вирус-

ном гепатите С тромбоциты обеспечивают мобилизацию иммунокомпетентных клеток и тем самым способствуют повреждению клеток печени цитотоксическими лимфоцитами и развитию воспалительного процесса. Антитромбоцитарная терапия в хронической фазе заболевания снижала приток CD8⁺Т-лимфоцитов и воспалительных лейкоцитов в печень, ослабляла степень фиброзных изменений и замедляла развитие гепатоцеллюлярной карциномы [121]. В системной циркуляции пациентов с циррозом печени наблюдалось повышение уровней активированных тромбоцитов, активированных моноцитов и ТМК, причем увеличение количества ТМК происходило преимущественно за счет фракции CD14^{dim}CD16⁺ моноцитов [112].

Сахарный диабет

Тромбоцитарно-лейкоцитарные взаимодействия интенсифицируются при состояниях, характеризующихся наличием воспаления и эндотелиальной дисфункции, к каковым относится сахарный диабет. В экспериментальной модели сахарного диабета I типа у мышей повышение уровня ТЛК в крови происходило в основном за счет формирования агрегатов тромбоцитов с лимфоцитами [137]. У пациентов с сахарным диабетом отмечалось значительное увеличение доли активированных тромбоцитов и тромбоцитарно-моноцитарных агрегатов, в то время как количество агрегатов тромбоцитов с нейтрофилами и лимфоцитами не претерпевало заметных изменений [46, 66, 148]. В другом исследовании у пациентов с сахарным диабетом I и II типа наблюдалось повышение уровней и ТМК, и ТНК [31]. Более тяжелые формы заболевания, осложненные пролиферативной ретинопатией, нефропатией и микроангиопатией, сопровождались и более высоким уровнем циркулирующих ТМК и ТНК [31, 54, 66]. Повышенный уровень ТМК может служить ранним маркером диабета II типа, поскольку изменение этого показателя наблюдается на том этапе заболевания, когда еще отсутствуют признаки воспаления и сосудистых нарушений [101].

Репродуктивные патологии

Сведения о тромбоцитарно-лейкоцитарных взаимодействиях при беременности немногочисленны и противоречивы. В большинстве своем они относятся к такой мультисистемной патологии, как преэклампсия, которая проявляется во второй половине беременности и характеризуется эндотелиальной дисфункцией, активацией тромбоцитов и системным воспалительным ответом. Основными симптомами преэклампсии являются повышенное артериальное давление, протеинурия и отеки. Свидетельствами активации тромбоцитов у пациенток с преэклампси-

ей являются повышенный уровень экспрессии Р-селектина (CD62P), увеличение количества CD62P⁺ тромбоцитарных микрочастиц и тромбоцитарно-моноцитарных агрегатов по сравнению с пациентками, имеющими неосложненную беременность [89]. Моноциты, входящие в состав ТМК, синтезируют повышенное количество Flt-1 (VEGF-R1) и его растворимой формы sFlt-1, которая является патогенетическим фактором и маркером преэклампсии, и тем самым участвуют в увеличении уровня sFlt-1 в циркуляции при этой акушерской патологии [91]. В этом же исследовании было показано, что активированные *in vitro* тромбоциты, индуцируют секрецию sFlt-1 моноцитами. Таким образом, активация тромбоцитов и их взаимодействие с моноцитами может являться одним из патогенетических механизмов преэклампсии. Однако другая группа исследователей не обнаружила ни признаков активации тромбоцитов при преэклампсии, ни существенных различий в количестве тромбоцитарно-моноцитарных и тромбоцитарно-нейтрофильных агрегатов, а также в уровнях экспрессии тканевого фактора моноцитами между группами женщин с преэклампсией, беременными нормотензивными и небеременными женщинами [38]. По нашим данным, доля ТМК при преэклампсии у разных пациенток может варьировать от 12% до 93% в среднем, примерно двукратно превышая аналогичный показатель, наблюдаемый при физиологическом течении беременности. Кроме того, при стимуляции *in vitro* разными концентрациями АДФ, отдельные субпопуляции демонстрируют пониженную способность к образованию агрегатов с активированными тромбоцитами (неопубликованные данные).

Тромбофилические состояния могут являться причиной другой акушерской патологии – привычного невынашивания беременности. Повышенный уровень тромбоцитарно-лейкоцитарных агрегатов обнаружен у женщин с наследственной или приобретенной тромбофилией и имеющими в анамнезе несколько эпизодов потери беременности в разные сроки беременности [87]. Таким образом, ТМК могут играть роль в патогенезе привычного невынашивания беременности и представляют интерес и в качестве диагностического маркера, и в качестве терапевтической мишени.

Бактериальные инфекции

Благодаря большому разнообразию рецепторных молекул тромбоциты обладают способностью детектировать сигналы воспаления и инфекции и инициировать иммунный ответ. При этом они продуцируют ряд факторов, обладающих противомикробными и иммунорегуляторными свойствами, в результате чего происходит элиминация патогена и/или стимуляция клеток

иммунной системы [106]. В условиях бактериального заражения активация иммунокомпетентных клеток тромбоцитами осуществляется как посредством секретируемых молекул, так и при непосредственном контакте с образованием гетеротипических комплексов. В исследовании Gawaz и соавт. было показано, что образование комплексов тромбоцитов с моноцитами и нейтрофилами усиливалось при сепсисе, но уровень агрегации тромбоцитов с нейтрофилами снижался при неблагоприятном развитии болезни, приводящем к гибели пациента [39]. В более позднем исследовании у пациентов с сепсисом также наблюдался повышенный уровень тромбоцитарно-моноцитарных агрегатов, причем это повышение происходило за счет популяции классических моноцитов, и риск летального исхода был связан с дальнейшим увеличением содержания этих комплексов [142]. Положительная корреляция между уровнем ТМК и смертностью от сепсиса была обнаружена в группе пациентов старше 65 лет, но не у более молодых пациентов [109]. Иммунорегуляторная роль тромбоцитов подтверждается результатами экспериментов с животными: тромбоцитопения снижала количество циркулирующих ТМК и выживаемость мышей с пневмонией, вызванной *Klebsiella pneumoniae* [25], а также выживаемость в моделях ЛПС-индуцированной эндотоксемии и бактериального сепсиса [143], а трансфузия тромбоцитов приводила к снижению уровней TNF α и IL-6 в крови и повышала выживаемость животных [143]. В то же время увеличение количества ТМК у пациентов, инфицированных *Mycobacterium tuberculosis*, было обусловлено не активацией тромбоцитов, а активацией моноцитов, и тромбоциты оказывали иммуномодулирующее действие, подавляя продукцию провоспалительных цитокинов TNF α , IL-1 β , IL-6, IFN γ и стимулируя продукцию IL-10 мононуклеарами крови [74].

Вирусные инфекции

Активация тромбоцитов и усиление взаимодействия тромбоцитов с лейкоцитами происходит при различных клинических и экспериментальных вирусных инфекциях [52]. Аденовирусная инфекция вызывает тромбоцитопению, активацию тромбоцитов, повышение уровня тромбоцитарных и лейкоцитарных микровезикул, а также индуцирует формирование ТМК [100]. В крови пациентов, инфицированных вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ), отмечалось повышенное содержание ТМК, которое коррелировало с уровнями маркеров активации и агрегации тромбоцитов, тогда как уровень ТНК не претерпевал существенных изменений [82, 98, 120]. Лихорадка денге также сопровождается увеличением количества ТМК, причем это увеличение наиболее выражено

у пациентов с тромбоцитопенией, а тромбоциты, выделенные из крови инфицированных, стимулируют продукцию цитокинов IL-1 β , IL-8 и IL-10 моноцитами *in vitro* [51, 132]. Тромбоциты, инфицированные вирусом *in vitro*, не только вызвали активацию моноцитов, индуцируя продукцию провоспалительных цитокинов, но и осуществляли репрограммирование метаболизма моноцитов [10]. При ОПЛ, вызванном вирусом гриппа А (H1N1) уровень циркулирующих тромбоцитарно-моноцитарных агрегатов был примерно в 2,5 раза выше, чем у здоровых, и в 2 раза выше, чем у пациентов с бактериальной пневмонией [108]. В связи с пандемией, вызванной новой коронавирусной инфекцией (COVID-19), накапливается информация о тромботических состояниях, возникающих при этой инфекции, а также об участии тромбоцитов в патофизиологических механизмах, лежащих в основе этих осложнений. О роли тромбоцитов в патогенезе тромбовоспаления у пациентов с пневмонией, вызванной SARS-CoV-2, свидетельствуют повышенные уровни активации (экспрессия Р-селектина), прокоагулянтной активности (АПТТ), секреции цитокинов, хемокинов и ростовых факторов (IL-1 α , IL-1 β , IL-1 γ , IL-4, IL-10, IL-13, IL-17, IL-27, IFN α , IFN γ , MCP-1, VEGF), а также увеличение содержания циркулирующих ТМК и ТНК в 3,5 и 4 раза соответственно [130]. В другом исследовании значимое повышение уровня активации тромбоцитов, количества тромбоцитарно-моноцитарных агрегатов и уровня экспрессии тканевого фактора моноцитами в составе этих агрегатов наблюдалось у пациентов с тяжелым течением заболевания, но не у пациентов с состоянием легкой и средней тяжести и бессимптомных пациентов [50]. В общей когорте пациентов с COVID-19, нуждающихся в дополнительной оксигенации, отмечалось возрастание уровня экспрессии Р-селектина тромбоцитами, а также количества ТМК и ТНК и уровня экспрессии тканевого фактора в этих комплексах по сравнению со здоровыми испытуемыми, однако количество ТМК и ТНК в группе пациентов с

более тяжелой формой заболевания, требующей механической вентиляции легких, было достоверно ниже, чем у остальных пациентов [17]. Интересно, что инкубация клеток крови здоровых людей в плазме крови заболевших вызвала активацию тромбоцитов и их агрегацию с моноцитами и нейтрофилами, и эти изменения не были связаны с непосредственным воздействием вируса на клетки [17]. Высказываются предположения о том, что взаимодействия тромбоцитов и лейкоцитов, приводящие к формированию гетеротипических комплексов и выбрасыванию внеклеточных ловушек нейтрофилами, могут являться причиной тромботических явлений характерных для коронавирусной инфекции [14].

Заключение

Рассматриваемые прежде исключительно как важнейший элемент системы гемостаза, тромбоциты к настоящему времени приобретают репутацию активных участников иммунного ответа и воспалительных реакций, в которых тромбоциты осуществляют эффекторные реакции, характерные для клеток врожденного звена иммунной системы, и выполняют иммуномодуляторные функции. Совокупность свойств тромбоцитов делает их связующим звеном между процессами тромбообразования и воспаления, и эта функция реализуется при взаимодействии тромбоцитов с лейкоцитами, механизмы которого остаются во многом неизученными. Обусловленный тромбоцитами воспалительный ответ, вероятно, лежит в основе многих заболеваний, поскольку повышенный уровень образования тромбоцитарно-лейкоцитарных комплексов наблюдается при различных патологических состояниях, имеющих характер воспаления. Дальнейшее изучение физиологических и патогенетических механизмов межклеточных взаимодействий необходимо для выявления закономерностей формирования этих комплексов и выработки стратегии лечения этих заболеваний.

Список литературы / References

1. Серебряная Н.Б., Шанин С.Н., Фомичева Е.Е., Якуцени П.П. Тромбоциты как активаторы и регуляторы воспалительных и иммунных реакций. Часть 1. Основные характеристики тромбоцитов как воспалительных клеток // Медицинская иммунология, 2018. Т. 20, № 6. С. 785-796. [Serebryanaya N.B., Shanin S.N., Fomicheva E.E., Yakutseni P.P. Blood platelets as activators and regulators of inflammatory and immune reactions. Part 2. Basic characteristics of platelets as inflammatory cells. *Meditsinskaya Immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2018, Vol. 20, no. 6, pp. 785-796. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2018-6-785-796.
2. Серебряная Н.Б., Шанин С.Н., Фомичева Е.Е., Якуцени П.П. Тромбоциты как активаторы и регуляторы воспалительных и иммунных реакций. Часть 2. Тромбоциты как участники иммунных реакций // Медицинская иммунология, 2019. Т. 21, № 1. С. 9-20. [Serebryanaya N.B., Shanin S.N., Fomicheva E.E., Yakutseni P.P. Blood platelets as activators and regulators of inflammatory and immune reactions. Part 2. Thrombocytes as participants of immune reactions. *Meditsinskaya Immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2019, Vol. 21, no. 1, pp. 9-20. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2019-1-9-20.

3. Aleva F.E., Temba G., de Mast Q., Simons S.O., de Groot P.G., Heijdra Y.F., van der Ven A. Increased platelet-monocyte interaction in stable COPD in the absence of platelet hyper-reactivity. *Respiration*, 2018, Vol. 95, no. 1, pp. 35-43.
4. Allam O., Samarani S., Jenabian M.A., Routy J.P., Tremblay C., Amre D., Ahmad A. Differential synthesis and release of IL-18 and IL-18 binding protein from human platelets and their implications for HIV infection. *Cytokine*, 2017, Vol. 90, pp. 144-154.
5. Allen N., Barrett T.J., Guo Y., Nardi M., Ramkhalawon B., Rockman C.B., Hochman J.S., Berger J.S. Circulating monocyte-platelet aggregates are a robust marker of platelet activity in cardiovascular disease. *Atherosclerosis*, 2019, Vol. 282, pp. 11-18.
6. Armstrong P.C., Kirkby N.S., Chan M.V., Finsterbusch M., Hogg N., Nourshargh S., Warner T.D. Novel whole blood assay for phenotyping platelet reactivity in mice identifies ICAM-1 as a mediator of platelet-monocyte interaction. *Blood*, 2015, Vol. 126, no. 10, pp. e11-e18.
7. Ashman N., Macey M.G., Fan S.L., Azam U., Yaqoob M.M. Increased platelet-monocyte aggregates and cardiovascular disease in end-stage renal failure patients. *Nephrol. Dial. Transplant.*, 2003, Vol. 18, no. 10, pp. 2088-2096.
8. Assinger A., Laky M., Schabbauer G., Hirschl A.M., Buchberger E., Binder B.R., Volf I. Efficient phagocytosis of periodontopathogens by neutrophils requires plasma factors, platelets and TLR2. *J. Thromb. Haemost.*, 2011, Vol. 9, no. 4, pp. 799-809.
9. Badrnya S., Schrottmaier W.C., Kral J.B., Yaiw K.C., Volf I., Schabbauer G., Soderberg-Naucler C., Assinger A. Platelets mediate oxidized low-density lipoprotein-induced monocyte extravasation and foam cell formation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 2014, Vol. 34, no. 3, pp. 571-580.
10. Barbosa-Lima G., Hottz E.D., de Assis E.F., Liechocki S., Souza T.M.L., Zimmerman G.A., Bozza F.A., Bozza P.T. Dengue virus-activated platelets modulate monocyte immunometabolic response through lipid droplet biogenesis and cytokine signaling. *J. Leukoc. Biol.*, 2020, Vol. 108, no. 4, pp. 1293-1306.
11. Barnard M.R., Linden M.D., Frelinger A.L., 3rd, Li Y., Fox M.L., Furman M.I., Michelson A.D. Effects of platelet binding on whole blood flow cytometry assays of monocyte and neutrophil procoagulant activity. *J. Thromb. Haemost.*, 2005, Vol. 3, no. 11, pp. 2563-2570.
12. Barrett T.J., Schlegel M., Zhou F., Gorenchtein M., Bolstorff J., Moore K.J., Fisher E.A., Berger J.S. Platelet regulation of myeloid suppressor of cytokine signaling 3 accelerates atherosclerosis. *Sci. Transl. Med.*, 2019, Vol. 11, no. 517, eaax0481. doi: 10.1126/scitranslmed.aax0481.
13. Baumer Y., Gutierrez-Huerta C.A., Saxena A., Dagur P.K., Langerman S.D., Tamura K., Ceasar J.N., Andrews M.R., Mitchell V., Collins B.S., Yu Q., Teague H.L., Playford M.P., Bleck C.K.E., Mehta N.N., McCoy J.P., Powell-Wiley T.M. Immune cell phenotyping in low blood volumes for assessment of cardiovascular disease risk, development, and progression: a pilot study. *J. Transl. Med.*, 2020, Vol. 18, no. 1, 29. doi: 10.1186/s12967-020-02207-0.
14. Brambilla M., Canzano P., Becchetti A., Tremoli E., Camera M. Alterations in platelets during SARS-CoV-2 infection. *Platelets*, 2022, Vol. 33, no. 2, pp. 192-199.
15. Brancialeone V., Gobetti T., Cenac N., le Faouder P., Colom B., Flower R.J., Vergnolle N., Nourshargh S., Perretti M. A vasculo-protective circuit centered on lipoxin A4 and aspirin-triggered 15-epi-lipoxin A4 operative in murine microcirculation. *Blood*, 2013, Vol. 122, no. 4, pp. 608-617.
16. Brunetti M., Martelli N., Manarini S., Mascetra N., Musiani P., Cerletti C., Aiello F.B., Evangelista V. Polymorphonuclear leukocyte apoptosis is inhibited by platelet-released mediators, role of TGFbeta-1. *Thromb. Haemost.*, 2000, Vol. 84, no. 3, pp. 478-483.
17. Canzano P., Brambilla M., Porro B., Cosentino N., Tortorici E., Vicini S., Poggio P., Cascella A., Pengo M.F., Veglia F., Fiorelli S., Bonomi A., Cavalca V., Trabattini D., Andreini D., Omodeo Sale E., Parati G., Tremoli E., Camera M. Platelet and endothelial activation as potential mechanisms behind the thrombotic complications of COVID-19 patients. *JACC Basic Transl. Sci.*, 2021, Vol. 6, no. 3, pp. 202-218.
18. Carestia A., Kaufman T., Rivadeneyra L., Landoni V.I., Pozner R.G., Negrotto S., D'Atri L.P., Gomez R.M., Schattner M. Mediators and molecular pathways involved in the regulation of neutrophil extracellular trap formation mediated by activated platelets. *J. Leukoc. Biol.*, 2016, Vol. 99, no. 1, pp. 153-162.
19. Carestia A., Kaufman T., Schattner M. Platelets: new bricks in the building of neutrophil extracellular traps. *Front. Immunol.*, 2016, Vol. 7, 271. doi: 10.3389/fimmu.2016.00271.
20. Caudrillier A., Kessenbrock K., Gilliss B.M., Nguyen J.X., Marques M.B., Monestier M., Toy P., Werb Z., Looney M.R. Platelets induce neutrophil extracellular traps in transfusion-related acute lung injury. *J. Clin. Invest.*, 2012, Vol. 122, no. 7, pp. 2661-2671.
21. Chatterjee M., von Ungern-Sternberg S.N., Seizer P., Schlegel F., Buttcher M., Sindhu N.A., Muller S., Mack A., Gawaz M. Platelet-derived CXCL12 regulates monocyte function, survival, differentiation into macrophages and foam cells through differential involvement of CXCR4-CXCR7. *Cell Death Dis.*, 2015, Vol. 6, no. 11, e1989. doi: 10.1038/cddis.2015.233.
22. Clark S.R., Ma A.C., Tavener S.A., McDonald B., Goodarzi Z., Kelly M.M., Patel K.D., Chakrabarti S., McAvoy E., Sinclair G.D., Keys E.M., Allen-Vercoe E., Devinney R., Doig C.J., Green F.H., Kubes P. Platelet TLR4 activates neutrophil extracellular traps to ensnare bacteria in septic blood. *Nat. Med.*, 2007, Vol. 13, no. 4, pp. 463-469.

23. da Costa Martins P.A., van Gils J.M., Mol A., Hordijk P.L., Zwaginga J.J. Platelet binding to monocytes increases the adhesive properties of monocytes by up-regulating the expression and functionality of beta1 and beta2 integrins. *J. Leukoc. Biol.*, 2006, Vol. 79, no. 3, pp. 499-507.
24. Daugirdas J.T., Bernardo A.A. Hemodialysis effect on platelet count and function and hemodialysis-associated thrombocytopenia. *Kidney Int.*, 2012, Vol. 82, no. 2, pp. 147-157.
25. de Stoppelaar S.F., van 't Veer C., Claushuis T.A., Albersen B.J., Roelofs J.J., van der Poll T. Thrombocytopenia impairs host defense in gram-negative pneumonia-derived sepsis in mice. *Blood*, 2014, Vol. 124, no. 25, pp. 3781-3790.
26. Deng W., Xu Y., Chen W., Paul D.S., Syed A.K., Dragovich M.A., Liang X., Zakas P., Berndt M.C., di Paola J., Ware J., Lanza F., Doering C.B., Bergmeier W., Zhang X.F., Li R. Platelet clearance via shear-induced unfolding of a membrane mechanoreceptor. *Nat. Commun.*, 2016, Vol. 7, 12863. doi: 10.1038/ncomms12863.
27. Denis M.M., Tolley N.D., Bunting M., Schwertz H., Jiang H., Lindemann S., Yost C.C., Rubner F.J., Albertine K.H., Swoboda K.J., Fratto C.M., Tolley E., Kraiss L.W., McIntyre T.M., Zimmerman G.A., Weyrich A.S. Escaping the nuclear confines: signal-dependent pre-mRNA splicing in anucleate platelets. *Cell*, 2005, Vol. 122, no. 3, pp. 379-391.
28. Deppermann C., Kubes P. Platelets and infection. *Semin. Immunol.*, 2016, Vol. 28, no. 6, pp. 536-545.
29. Diacovo T.G., Roth S.J., Buccola J.M., Bainton D.F., Springer T.A. Neutrophil rolling, arrest, and transmigration across activated, surface-adherent platelets via sequential action of P-selectin and the beta 2-integrin CD11b/CD18. *Blood*, 1996, Vol. 88, no. 1, pp. 146-157.
30. Dopheide J.F., Rubrech J., Trumpp A., Geissler P., Zeller G.C., Bock K., Dunschede F., Trinh T.T., Dorweiler B., Munzel T., Radsak M.P., Espinola-Klein C. Leukocyte-platelet aggregates-a phenotypic characterization of different stages of peripheral arterial disease. *Platelets*, 2016, Vol. 27, no. 7, pp. 658-667.
31. Elalamy I., Chakroun T., Gerotziakas G.T., Petropoulou A., Robert F., Karroum A., Elgrably F., Samama M.M., Hatmi M. Circulating platelet-leukocyte aggregates: a marker of microvascular injury in diabetic patients. *Thromb. Res.*, 2008, Vol. 121, no. 6, pp. 843-848.
32. Eltzschig H.K., Sitkovsky M.V., Robson S.C. Purinergic signaling during inflammation. *N. Engl. J. Med.*, 2012, Vol. 367, no. 24, pp. 2322-2333.
33. Elzey B.D., Ratliff T.L., Sowa J.M., Crist S.A. Platelet CD40L at the interface of adaptive immunity. *Thromb. Res.*, 2011, Vol. 127, no. 3, pp. 180-183.
34. Elzey B.D., Tian J., Jensen R.J., Swanson A.K., Lees J.R., Lentz S.R., Stein C.S., Nieswandt B., Wang Y., Davidson B.L., Ratliff T.L. Platelet-mediated modulation of adaptive immunity. A communication link between innate and adaptive immune compartments. *Immunity*, 2003, Vol. 19, no. 1, pp. 9-19.
35. Fendl B., Eichhorn T., Weiss R., Tripisciano C., Spittler A., Fischer M.B., Weber V. Differential interaction of platelet-derived extracellular vesicles with circulating immune cells: Roles of TAM receptors, CD11b, and phosphatidylserine. *Front. Immunol.*, 2018, Vol. 9, 2797. doi: 10.3389/fimmu.2018.02797.
36. Fendl B., Weiss R., Fischer M.B., Spittler A., Weber V. Characterization of extracellular vesicles in whole blood: Influence of pre-analytical parameters and visualization of vesicle-cell interactions using imaging flow cytometry. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2016, Vol. 478, no. 1, pp. 168-173.
37. Finsterbusch M., Norman M.U., Hall P., Kitching A.R., Hickey M.J. Platelet retention in inflamed glomeruli occurs via selective prolongation of interactions with immune cells. *Kidney Int.*, 2019, Vol. 95, no. 2, pp. 363-374.
38. Freitas L.G., Sathler-Avelar R., Vitelli-Avelar D.M., Bela S.R., Teixeira-Carvalho A., Carvalho M., Martins-Filho O.A., Dusse L.M. Preeclampsia: integrated network model of platelet biomarkers interaction as a tool to evaluate the hemostatic/immunological interface. *Clin. Chim. Acta*, 2014, Vol. 436, pp. 193-201.
39. Gawaz M., Fateh-Moghadam S., Pilz G., Gurland H.J., Werdan K. Platelet activation and interaction with leucocytes in patients with sepsis or multiple organ failure. *Eur. J. Clin. Invest.*, 1995, Vol. 25, no. 11, pp. 843-851.
40. Gawaz M.P., Loftus J.C., Bajt M.L., Frojmovic M.M., Plow E.F., Ginsberg M.H. Ligand bridging mediates integrin alpha IIb beta 3 (platelet GPIIb-IIIa) dependent homotypic and heterotypic cell-cell interactions. *J. Clin. Invest.*, 1991, Vol. 88, no. 4, pp. 1128-1134.
41. Gorbet M.B., Sefton M.V. Material-induced tissue factor expression but not CD11b upregulation depends on the presence of platelets. *J. Biomed. Mater. Res. A*, 2003, Vol. 67, no. 3, pp. 792-800.
42. Graff J., Harder S., Wahl O., Scheuermann E.H., Gossmann J. Anti-inflammatory effects of clopidogrel intake in renal transplant patients: effects on platelet-leukocyte interactions, platelet CD40 ligand expression, and proinflammatory biomarkers. *Clin. Pharmacol. Ther.*, 2005, Vol. 78, no. 5, pp. 468-476.
43. Grommes J., Alard J.E., Drechsler M., Wantha S., Morgelin M., Kuebler W.M., Jacobs M., von Hundelshausen P., Markart P., Wygrecka M., Preissner K.T., Hackeng T.M., Koenen R.R., Weber C., Soehnlein O. Disruption of platelet-derived chemokine heteromers prevents neutrophil extravasation in acute lung injury. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 2012, Vol. 185, no. 6, pp. 628-636.
44. Gros A., Syvannarath V., Lamrani L., Ollivier V., Loyau S., Goerge T., Nieswandt B., Jandrot-Perrus M., Ho-Tin-Noe B. Single platelets seal neutrophil-induced vascular breaches via GPVI during immune-complex-mediated inflammation in mice. *Blood*, 2015, Vol. 126, no. 8, pp. 1017-1026.
45. Gudbrandsdottir S., Hasselbalch H.C., Nielsen C.H. Activated platelets enhance IL-10 secretion and reduce TNF- α secretion by monocytes. *J. Immunol.*, 2013, Vol. 191, no. 8, pp. 4059-4067.

46. Harding S.A., Sommerfield A.J., Sarma J., Twomey P.J., Newby D.E., Frier B.M., Fox K.A. Increased CD40 ligand and platelet-monocyte aggregates in patients with type 1 diabetes mellitus. *Atherosclerosis*, 2004, Vol. 176, no. 2, pp. 321-325.
47. Haselmayer P., Grosse-Hovest L., von Landenberg P., Schild H., Radsak M.P. TREM-1 ligand expression on platelets enhances neutrophil activation. *Blood*, 2007, Vol. 110, no. 3, pp. 1029-1035.
48. Hechler B., Gachet C. Purinergic receptors in thrombosis and inflammation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 2015, Vol. 35, no. 11, pp. 2307-2315.
49. Hillgruber C., Steingraber A.K., Poppelmann B., Denis C.V., Ware J., Vestweber D., Nieswandt B., Schneider S.W., Goerge T. Blocking von Willebrand factor for treatment of cutaneous inflammation. *J. Invest. Dermatol.*, 2014, Vol. 134, no. 1, pp. 77-86.
50. Hottz E.D., Azevedo-Quintanilha I.G., Palhinha L., Teixeira L., Barreto E.A., Pao C.R.R., Rigby C., Franco S., Souza T.M.L., Kurtz P., Bozza F.A., Bozza P.T. Platelet activation and platelet-monocyte aggregate formation trigger tissue factor expression in patients with severe COVID-19. *Blood*, 2020, Vol. 136, no. 11, pp. 1330-1341.
51. Hottz E.D., Medeiros-de-Moraes I.M., Vieira-de-Abreu A., de Assis E.F., Vals-de-Souza R., Castro-Faria-Neto H.C., Weyrich A.S., Zimmerman G.A., Bozza F.A., Bozza P.T. Platelet activation and apoptosis modulate monocyte inflammatory responses in dengue. *J. Immunol.*, 2014, Vol. 193, no. 4, pp. 1864-1872.
52. Hottz E.D., Quirino-Teixeira A.C., Merij L.B., Pinheiro M.B.M., Rozini S.V., Bozza F.A., Bozza P.T. Platelet-leukocyte interactions in the pathogenesis of viral infections. *Platelets*, 2022, Vol. 33, no. 2, pp. 200-207.
53. Htun P., Fateh-Moghadam S., Tomandl B., Handschu R., Klinger K., Stellos K., Garlich C., Daniel W., Gawaz M. Course of platelet activation and platelet-leukocyte interaction in cerebrovascular ischemia. *Stroke*, 2006, Vol. 37, no. 9, pp. 2283-2287.
54. Hu H., Li N., Yngen M., Ostenson C.G., Wallen N.H., Hjemdahl P. Enhanced leukocyte-platelet cross-talk in Type 1 diabetes mellitus: relationship to microangiopathy. *J. Thromb. Haemost.*, 2004, Vol. 2, no. 1, pp. 58-64.
55. Huang G.Y., Yang L.J., Wang X.H., Wang Y.L., Xue Y.Z., Yang W.B. Relationship between platelet-leukocyte aggregation and myocardial perfusion in patients with ST-segment elevation myocardial infarction after primary percutaneous coronary intervention. *Heart Lung*, 2016, Vol. 45, no. 5, pp. 429-433.
56. Hur J., Jang J.H., Oh I.Y., Choi J.I., Yun J.Y., Kim J., Choi Y.E., Ko S.B., Kang J.A., Kang J., Lee S.E., Lee H., Park Y.B., Kim H.S. Human podoplanin-positive monocytes and platelets enhance lymphangiogenesis through the activation of the podoplanin/CLEC-2 axis. *Mol. Ther.*, 2014, Vol. 22, no. 8, pp. 1518-1529.
57. Hwaiz R., Rahman M., Syk I., Zhang E., Thorlacius H. Rac1-dependent secretion of platelet-derived CCL5 regulates neutrophil recruitment via activation of alveolar macrophages in septic lung injury. *J. Leukoc. Biol.*, 2015, Vol. 97, no. 5, pp. 975-984.
58. Hwaiz R., Rahman M., Zhang E., Thorlacius H. Platelet secretion of CXCL4 is Rac1-dependent and regulates neutrophil infiltration and tissue damage in septic lung damage. *Br. J. Pharmacol.*, 2015, Vol. 172, no. 22, pp. 5347-5359.
59. Ishikawa M., Vowinkel T., Stokes K.Y., Arumugam T.V., Yilmaz G., Nanda A., Granger D.N. CD40/CD40 ligand signaling in mouse cerebral microvasculature after focal ischemia/reperfusion. *Circulation*, 2005, Vol. 111, no. 13, pp. 1690-1696.
60. Ishikawa M., Zhang J.H., Nanda A., Granger D.N. Inflammatory responses to ischemia and reperfusion in the cerebral microcirculation. *Front. Biosci.*, 2004, Vol. 9, pp. 1339-1347.
61. Ishikawa T., Shimizu M., Kohara S., Takizawa S., Kitagawa Y., Takagi S. Appearance of WBC-platelet complex in acute ischemic stroke, predominantly in atherothrombotic infarction. *J. Atheroscler. Thromb.*, 2012, Vol. 19, no. 5, pp. 494-501.
62. Jenne C.N., Urrutia R., Kubes P. Platelets: bridging hemostasis, inflammation, and immunity. *Int. J. Lab. Hematol.*, 2013, Vol. 35, no. 3, pp. 254-261.
63. Jenne C.N., Wong C.H., Zemp F.J., McDonald B., Rahman M.M., Forsyth P.A., McFadden G., Kubes P. Neutrophils recruited to sites of infection protect from virus challenge by releasing neutrophil extracellular traps. *Cell Host Microbe*, 2013, Vol. 13, no. 2, pp. 169-180.
64. Ju L., Chen Y., Xue L., Du X., Zhu C. Cooperative unfolding of distinctive mechanoreceptor domains transduces force into signals. *eLife*, 2016, Vol. 5, e15447. doi: 10.7554/eLife.15447.
65. Jy W., Mao W.W., Horstman L., Tao J., Ahn Y.S. Platelet microparticles bind, activate and aggregate neutrophils *in vitro*. *Blood Cells. Mol. Dis.*, 1995, Vol. 21, no. 3, pp. 217-231.
66. Kaplar M., Kappelmayer J., Veszpremi A., Szabo K., Udvardy M. The possible association of *in vivo* leukocyte-platelet heterophilic aggregate formation and the development of diabetic angiopathy. *Platelets*, 2001, Vol. 12, no. 7, pp. 419-422.
67. Kasthuri R.S., Glover S.L., Jonas W., McEachron T., Pawlinski R., Arepally G.M., Key N.S., Mackman N. PF4/heparin-antibody complex induces monocyte tissue factor expression and release of tissue factor positive microparticles by activation of FcγRIIb. *Blood*, 2012, Vol. 119, no. 22, pp. 5285-5293.
68. Kitching A.R., Hickey M.J. Immune cell behaviour and dynamics in the kidney – insights from *in vivo* imaging. *Nat. Rev. Nephrol.*, 2022, Vol. 18, no. 1, pp. 22-37.
69. Kitching A.R., Holdsworth S.R., Hickey M.J. Targeting leukocytes in immune glomerular diseases. *Curr. Med. Chem.*, 2008, Vol. 15, no. 5, pp. 448-458.
70. Kitching A.R., Hutton H.L. The players: Cells involved in glomerular disease. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.*, 2016, Vol. 11, no. 9, pp. 1664-1674.

71. Kornerup K.N., Salmon G.P., Pitchford S.C., Liu W.L., Page C.P. Circulating platelet-neutrophil complexes are important for subsequent neutrophil activation and migration. *J. Appl. Physiol.*, 1985, 2010, Vol. 109, no. 3, pp. 758-767.
72. Kral J.B., Schrottmaier W.C., Salzmann M., Assinger A. Platelet interaction with innate immune cells. *Transfus. Med. Hemother.*, 2016, Vol. 43, no. 2, pp. 78-88.
73. Kuligowski M.P., Kitching A.R., Hickey M.J. Leukocyte recruitment to the inflamed glomerulus: a critical role for platelet-derived P-selectin in the absence of rolling. *J. Immunol.*, 2006, Vol. 176, no. 11, pp. 6991-6999.
74. Kullaya V., van der Ven A., Mpagama S., Mmbaga B.T., de Groot P., Kibiki G., de Mast Q. Platelet-monocyte interaction in Mycobacterium tuberculosis infection. *Tuberculosis*, 2018, Vol. 111, pp. 86-93.
75. Lam F.W., Burns A.R., Smith C.W., Rumbaut R.E. Platelets enhance neutrophil transendothelial migration via P-selectin glycoprotein ligand-1. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 2011, Vol. 300, no. 2, pp. H468-H475.
76. Langer H.F., Daub K., Braun G., Schonberger T., May A.E., Schaller M., Stein G.M., Stellos K., Bueltmann A., Siegel-Axel D., Wendel H.P., Aebert H., Roecken M., Seizer P., Santoso S., Wesselborg S., Brossart P., Gawaz M. Platelets recruit human dendritic cells via Mac-1/JAM-C interaction and modulate dendritic cell function *in vitro*. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 2007, Vol. 27, no. 6, pp. 1463-1470.
77. Larsen E., Palabrica T., Sajer S., Gilbert G.E., Wagner D.D., Furie B.C., Furie B. PADGEM-dependent adhesion of platelets to monocytes and neutrophils is mediated by a lineage-specific carbohydrate, LNF III (CD15). *Cell*, 1990, Vol. 63, no. 3, pp. 467-474.
78. Leon-Ponte M., Ahern G.P., O'Connell P.J. Serotonin provides an accessory signal to enhance T-cell activation by signaling through the 5-HT₇ receptor. *Blood*, 2007, Vol. 109, no. 8, pp. 3139-3146.
79. Li J.L., Zarbock A., Hidalgo A. Platelets as autonomous drones for hemostatic and immune surveillance. *J. Exp. Med.*, 2017, Vol. 214, no. 8, pp. 2193-2204.
80. Li N. Platelet-lymphocyte cross-talk. *J. Leukoc. Biol.*, 2008, Vol. 83, no. 5, pp. 1069-1078.
81. Li N., Ji Q., Hjerdahl P. Platelet-lymphocyte conjugation differs between lymphocyte subpopulations. *J. Thromb. Haemost.*, 2006, Vol. 4, no. 4, pp. 874-881.
82. Liang H., Duan Z., Li D., Li D., Wang Z., Ren L., Shen T., Shao Y. Higher levels of circulating monocyte-platelet aggregates are correlated with viremia and increased sCD163 levels in HIV-1 infection. *Cell. Mol. Immunol.*, 2015, Vol. 12, no. 4, pp. 435-443.
83. Lindemann S., Tolley N.D., Dixon D.A., McIntyre T.M., Prescott S.M., Zimmerman G.A., Weyrich A.S. Activated platelets mediate inflammatory signaling by regulated interleukin 1 β synthesis. *J. Cell Biol.*, 2001, Vol. 154, no. 3, pp. 485-490.
84. Liu C.Y., Battaglia M., Lee S.H., Sun Q.H., Aster R.H., Visentin G.P. Platelet factor 4 differentially modulates CD4⁺CD25⁺ (regulatory) versus CD4⁺CD25⁻ (nonregulatory) T cells. *J. Immunol.*, 2005, Vol. 174, no. 5, pp. 2680-2686.
85. Loguinova M., Pinegina N., Kogan V., Vagida M., Arakelyan A., Shpektor A., Margolis L., Vasilieva E. Monocytes of different subsets in complexes with platelets in patients with myocardial infarction. *Thromb. Haemost.*, 2018, Vol. 118, no. 11, pp. 1969-1981.
86. Losche W., Scholz T., Temmler U., Oberle V., Claus R.A. Platelet-derived microvesicles transfer tissue factor to monocytes but not to neutrophils. *Platelets*, 2004, Vol. 15, no. 2, pp. 109-115.
87. Lukanov T.H., Velea G.L., Konova E.I., Ivanov P.D., Kovacheva K.S., Stoykov D.J. Levels of platelet-leukocyte aggregates in women with both thrombophilia and recurrent pregnancy loss. *Clin. Appl. Thromb. Hemost.*, 2011, Vol. 17, no. 2, pp. 181-187.
88. Lukasik M., Dworacki G., Kufel-Grabowska J., Watala C., Kozubski W. Upregulation of CD40 ligand and enhanced monocyte-platelet aggregate formation are associated with worse clinical outcome after ischaemic stroke. *Thromb. Haemost.*, 2012, Vol. 107, no. 2, pp. 346-355.
89. Macey M.G., Bevan S., Alam S., Verghese L., Agrawal S., Beski S., Thuraishingham R., MacCallum P.K. Platelet activation and endogenous thrombin potential in pre-eclampsia. *Thromb. Res.*, 2010, Vol. 125, no. 3, pp. e76-e81.
90. Maclay J.D., McAllister D.A., Johnston S., Raftis J., McGuinness C., Deans A., Newby D.E., Mills N.L., MacNee W. Increased platelet activation in patients with stable and acute exacerbation of COPD. *Thorax*, 2011, Vol. 66, no. 9, pp. 769-774.
91. Major H.D., Campbell R.A., Silver R.M., Branch D.W., Weyrich A.S. Synthesis of sFlt-1 by platelet-monocyte aggregates contributes to the pathogenesis of preeclampsia. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 2014, Vol. 210, no. 6, pp. 547.e1-547.e7.
92. Marquardt L., Anders C., Buggle F., Palm F., Hellstern P., Grau A.J. Leukocyte-platelet aggregates in acute and subacute ischemic stroke. *Cerebrovasc. Dis.*, 2009, Vol. 28, no. 3, pp. 276-282.
93. Maugeri N., Campana L., Gavina M., Covino C., De Metrio M., Panciroli C., Maiuri L., Maseri A., d'Angelo A., Bianchi M.E., Rovere-Querini P., Manfredi A.A. Activated platelets present high mobility group box 1 to neutrophils, inducing autophagy and promoting the extrusion of neutrophil extracellular traps. *J. Thromb. Haemost.*, 2014, Vol. 12, no. 12, pp. 2074-2088.
94. McGregor L., Martin J., McGregor J.L. Platelet-leukocyte aggregates and derived microparticles in inflammation, vascular remodelling and thrombosis. *Front. Biosci.*, 2006, Vol. 11, pp. 830-837.
95. McMorran B.J., Marshall V.M., de Graaf C., Drysdale K.E., Shabbar M., Smyth G.K., Corbin J.E., Alexander W.S., Foote S.J. Platelets kill intraerythrocytic malarial parasites and mediate survival to infection. *Science*, 2009, Vol. 323, no. 5915, pp. 797-800.

96. McMorran B.J., Wiczorski L., Drysdale K.E., Chan J.A., Huang H.M., Smith C., Mitiku C., Beeson J.G., Burgio G., Foote S.J. Platelet factor 4 and Duffy antigen required for platelet killing of *Plasmodium falciparum*. *Science*, 2012, Vol. 338, no. 6112, pp. 1348-1351.
97. Nieswandt B., Kleinschnitz C., Stoll G. Ischaemic stroke: a thrombo-inflammatory disease? *J. Physiol. (Lond.)*, 2011, Vol. 589, no. 17, pp. 4115-4123.
98. Nkambule B.B., Davison G., Ipp H. Platelet leukocyte aggregates and markers of platelet aggregation, immune activation and disease progression in HIV infected treatment naive asymptomatic individuals. *J. Thromb. Thrombolysis*, 2015, Vol. 40, no. 4, pp. 458-467.
99. Nurden A.T. Platelets, inflammation and tissue regeneration. *Thromb. Haemost.*, 2011, Vol. 105, Suppl. 1, pp. S13-S33.
100. Othman M., Labelle A., Mazzetti I., Elbatarny H.S., Lillicrap D. Adenovirus-induced thrombocytopenia: the role of von Willebrand factor and P-selectin in mediating accelerated platelet clearance. *Blood*, 2007, Vol. 109, no. 7, pp. 2832-2839.
101. Patko Z., Csaszar A., Acsady G., Ory I., Takacs E., Furesz J. Elevation of monocyte-platelet aggregates is an early marker of type 2 diabetes. *Interv. Med. Appl. Sci.*, 2012, Vol. 4, no. 4, pp. 181-185.
102. Pervushina O., Scheuerer B., Reiling N., Behnke L., Schroder J.M., Kasper B., Brandt E., Bulfone-Paus S., Petersen F. Platelet factor 4/CXCL4 induces phagocytosis and the generation of reactive oxygen metabolites in mononuclear phagocytes independently of Gi protein activation or intracellular calcium transients. *J. Immunol.*, 2004, Vol. 173, no. 3, pp. 2060-2067.
103. Peters M.J., Dixon G., Kotowicz K.T., Hatch D.J., Heyderman R.S., Klein N.J. Circulating platelet-neutrophil complexes represent a subpopulation of activated neutrophils primed for adhesion, phagocytosis and intracellular killing. *Br. J. Haematol.*, 1999, Vol. 106, no. 2, pp. 391-399.
104. Phillips J.H., Chang C.W., Lanier L.L. Platelet-induced expression of Fc gamma RIII (CD16) on human monocytes. *Eur. J. Immunol.*, 1991, Vol. 21, no. 4, pp. 895-899.
105. Rahman M., Roller J., Zhang S., Syk I., Menger M.D., Jeppsson B., Thorlacius H. Metalloproteinases regulate CD40L shedding from platelets and pulmonary recruitment of neutrophils in abdominal sepsis. *Inflamm. Res.*, 2012, Vol. 61, no. 6, pp. 571-579.
106. Rayes J., Bourne J.H., Brill A., Watson S.P. The dual role of platelet-innate immune cell interactions in thrombo-inflammation. *Res. Pract. Thromb. Haemost.*, 2020, Vol. 4, no. 1, pp. 23-35.
107. Rendu F., Brohard-Bohn B. The platelet release reaction: granules' constituents, secretion and functions. *Platelets*, 2001, Vol. 12, no. 5, pp. 261-273.
108. Rondina M.T., Brewster B., Grissom C.K., Zimmerman G.A., Kastendieck D.H., Harris E.S., Weyrich A.S. *In vivo* platelet activation in critically ill patients with primary 2009 influenza A(H1N1). *Chest*, 2012, Vol. 141, no. 6, pp. 1490-1495.
109. Rondina M.T., Carlisle M., Fraughton T., Brown S.M., Miller R.R., Harris E.S., Weyrich A.S., Zimmerman G.A., Supiano M.A., Grissom C.K. Platelet-monocyte aggregate formation and mortality risk in older patients with severe sepsis and septic shock. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.*, 2015, Vol. 70, no. 2, pp. 225-231.
110. Rong M.Y., Wang C.H., Wu Z.B., Zeng W., Zheng Z.H., Han Q., Jia J.F., Li X.Y., Zhu P. Platelets induce a proinflammatory phenotype in monocytes via the CD147 pathway in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res. Ther.*, 2014, Vol. 16, no. 6, 478. doi: 10.1186/s13075-014-0478-0.
111. Santoso S., Sachs U.J., Kroll H., Linder M., Ruf A., Preissner K.T., Chavakis T. The junctional adhesion molecule 3 (JAM-3) on human platelets is a counterreceptor for the leukocyte integrin Mac-1. *J. Exp. Med.*, 2002, Vol. 196, no. 5, pp. 679-691.
112. Sayed D., Amin N.F., Galal G.M. Monocyte-platelet aggregates and platelet micro-particles in patients with post-hepatic liver cirrhosis. *Thromb. Res.*, 2010, Vol. 125, no. 5, pp. e228-e233.
113. Scheuerer B., Ernst M., Durrbaum-Landmann I., Fleischer J., Grage-Griebenow E., Brandt E., Flad H.D., Petersen F. The CXCL4-chemokine platelet factor 4 promotes monocyte survival and induces monocyte differentiation into macrophages. *Blood*, 2000, Vol. 95, no. 4, pp. 1158-1166.
114. Schrottmaier W.C., Kral J.B., Badrnya S., Assinger A. Aspirin and P2Y12 Inhibitors in platelet-mediated activation of neutrophils and monocytes. *Thromb. Haemost.*, 2015, Vol. 114, no. 3, pp. 478-489.
115. Schrottmaier W.C., Mussbacher M., Salzmann M., Assinger A. Platelet-leukocyte interplay during vascular disease. *Atherosclerosis*, 2020, Vol. 307, pp. 109-120.
116. Schulz C., von Bruhl M.L., Barocke V., Cullen P., Mayer K., Okrojek R., Steinhart A., Ahmad Z., Kremmer E., Nieswandt B., Frampton J., Massberg S., Schmidt R. EMMPRIN (CD147/basigin) mediates platelet-monocyte interactions *in vivo* and augments monocyte recruitment to the vascular wall. *J. Thromb. Haemost.*, 2011, Vol. 9, no. 5, pp. 1007-1019.
117. Silverstein R.L., Asch A.S., Nachman R.L. Glycoprotein IV mediates thrombospondin-dependent platelet-monocyte and platelet-U937 cell adhesion. *J. Clin. Invest.*, 1989, Vol. 84, no. 2, pp. 546-552.
118. Simon D.I., Chen Z., Xu H., Li C.Q., Dong J., McIntire L.V., Ballantyne C.M., Zhang L., Furman M.I., Berndt M.C., Lopez J.A. Platelet glycoprotein Ib α is a counterreceptor for the leukocyte integrin Mac-1 (CD11b/CD18). *J. Exp. Med.*, 2000, Vol. 192, no. 2, pp. 193-204.
119. Singbartl K., Forlow S.B., Ley K. Platelet, but not endothelial, P-selectin is critical for neutrophil-mediated acute postischemic renal failure. *FASEB J.*, 2001, Vol. 15, no. 13, pp. 2337-2344.

120. Singh M.V., Davidson D.C., Jackson J.W., Singh V.B., Silva J., Ramirez S.H., Maggirwar S.B. Characterization of platelet-monocyte complexes in HIV-1-infected individuals: possible role in HIV-associated neuroinflammation. *J. Immunol.*, 2014, Vol. 192, no. 10, pp. 4674-4684.
121. Sitia G., Aiolfi R., Di Lucia P., Mainetti M., Fiocchi A., Mingozi F., Esposito A., Ruggeri Z.M., Chisari F.V., Iannacone M., Guidotti L.G. Antiplatelet therapy prevents hepatocellular carcinoma and improves survival in a mouse model of chronic hepatitis B. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2012, Vol. 109, no. 32, pp. E2165-E2172.
122. Slaba I., Wang J., Kolaczowska E., McDonald B., Lee W.Y., Kubes P. Imaging the dynamic platelet-neutrophil response in sterile liver injury and repair in mice. *Hepatology*, 2015, Vol. 62, no. 5, pp. 1593-1605.
123. Smout J., Dyker A., Cleanthis M., Ford G., Kesteven P., Stansby G. Platelet function following acute cerebral ischemia. *Angiology*, 2009, Vol. 60, no. 3, pp. 362-369.
124. Sreeramkumar V., Adrover J.M., Ballesteros I., Cuartero M.I., Rossaint J., Bilbao I., Nacher M., Pitaval C., Radovanovic I., Fukui Y., McEver R.P., Filippi M.D., Lizasoain I., Ruiz-Cabello J., Zarbock A., Moro M.A., Hidalgo A. Neutrophils scan for activated platelets to initiate inflammation. *Science*, 2014, Vol. 346, no. 6214, pp. 1234-1238.
125. Starlinger P., Assinger A., Haegeler S., Wanek D., Zikeli S., Schauer D., Birner P., Fleischmann E., Gruenberger B., Brostjan C., Gruenberger T. Evidence for serotonin as a relevant inducer of liver regeneration after liver resection in humans. *Hepatology*, 2014, Vol. 60, no. 1, pp. 257-266.
126. Strussmann T., Tillmann S., Wirtz T., Bucala R., von Hundelshausen P., Bernhagen J. Platelets are a previously unrecognised source of MIF. *Thromb. Haemost.*, 2013, Vol. 110, no. 5, pp. 1004-1013.
127. Suzuki J., Hamada E., Shodai T., Kamoshida G., Kudo S., Itoh S., Koike J., Nagata K., Irimura T., Tsuji T. Cytokine secretion from human monocytes potentiated by P-selectin-mediated cell adhesion. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, 2013, Vol. 160, no. 2, pp. 152-160.
128. Tao L., Changfu W., Linyun L., Bing M., Xiaohui H. Correlations of platelet-leukocyte aggregates with P-selectin S290N and P-selectin glycoprotein ligand-1 M62I genetic polymorphisms in patients with acute ischemic stroke. *J. Neurol. Sci.*, 2016, Vol. 367, pp. 95-100.
129. Tao S.C., Guo S.C., Zhang C.Q. Platelet-derived extracellular vesicles: an emerging therapeutic approach. *Int. J. Biol. Sci.*, 2017, Vol. 13, no. 7, pp. 828-834.
130. Taus F., Salvagno G., Cane S., Fava C., Mazzaferri F., Carrara E., Petrova V., Barouni R.M., Dima F., Dalbeni A., Romano S., Poli G., Benati M., de Nitto S., Mansueto G., Iezzi M., Tacconelli E., Lippi G., Bronte V., Minuz P. Platelets promote thromboinflammation in SARS-CoV-2 pneumonia. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 2020, Vol. 40, no. 12, pp. 2975-2989.
131. Thomas M.R., Storey R.F. The role of platelets in inflammation. *Thromb. Haemost.*, 2015, Vol. 114, no. 3, pp. 449-458.
132. Tsai J.J., Jen Y.H., Chang J.S., Hsiao H.M., Noisakran S., Perng G.C. Frequency alterations in key innate immune cell components in the peripheral blood of dengue patients detected by FACS analysis. *J. Innate Immun.*, 2011, Vol. 3, no. 5, pp. 530-540.
133. van Gils J.M., Zwaginga J.J., Hordijk P.L. Molecular and functional interactions among monocytes, platelets, and endothelial cells and their relevance for cardiovascular diseases. *J. Leukoc. Biol.*, 2009, Vol. 85, no. 2, pp. 195-204.
134. Vanichakarn P., Blair P., Wu C., Freedman J.E., Chakrabarti S. Neutrophil CD40 enhances platelet-mediated inflammation. *Thromb. Res.*, 2008, Vol. 122, no. 3, pp. 346-358.
135. Vasina E.M., Cauwenberghs S., Staudt M., Feijge M.A., Weber C., Koenen R.R., Heemskerk J.W. Aging- and activation-induced platelet microparticles suppress apoptosis in monocytic cells and differentially signal to proinflammatory mediator release. *Am. J. Blood Res.*, 2013, Vol. 3, no. 2, pp. 107-123.
136. von Hundelshausen P., Koenen R.R., Sack M., Mause S.F., Adriaens W., Proudfoot A.E., Hackeng T.M., Weber C. Heterophilic interactions of platelet factor 4 and RANTES promote monocyte arrest on endothelium. *Blood*, 2005, Vol. 105, no. 3, pp. 924-930.
137. Wang B., Yee Aw T., Stokes K.Y. N-acetylcysteine attenuates systemic platelet activation and cerebral vessel thrombosis in diabetes. *Redox Biol.*, 2018, Vol. 14, pp. 218-228.
138. Weiss R., Groger M., Rauscher S., Fendl B., Eichhorn T., Fischer M.B., Spittler A., Weber V. Differential interaction of platelet-derived extracellular vesicles with leukocyte subsets in human whole blood. *Sci. Rep.*, 2018, Vol. 8, no. 1, 6598. doi: 10.1038/s41598-018-25047-x.
139. Willeit P., Zampetaki A., Dudek K., Kaudewitz D., King A., Kirkby N.S., Crosby-Nwaobi R., Prokopi M., Drozdov I., Langley S.R., Sivaprasad S., Markus H.S., Mitchell J.A., Warner T.D., Kiechl S., Mayr M. Circulating microRNAs as novel biomarkers for platelet activation. *Circ. Res.*, 2013, Vol. 112, no. 4, pp. 595-600.
140. Wirtz T.H., Tillmann S., Strussmann T., Kraemer S., Heemskerk J.W., Grotke O., Gawaz M., von Hundelshausen P., Bernhagen J. Platelet-derived MIF: a novel platelet chemokine with distinct recruitment properties. *Atherosclerosis*, 2015, Vol. 239, no. 1, pp. 1-10.
141. Wong C.H., Jenne C.N., Petri B., Chrobok N.L., Kubes P. Nucleation of platelets with blood-borne pathogens on Kupffer cells precedes other innate immunity and contributes to bacterial clearance. *Nat. Immunol.*, 2013, Vol. 14, no. 8, pp. 785-792.
142. Wu Q., Ren J., Hu D., Wu X., Li G., Wang G., Gu G., Chen J., Li R., Li Y., Hong Z., Ren H., Zhao Y., Li J. Monocyte subsets and monocyte-platelet aggregates: implications in predicting septic mortality among surgical critical illness patients. *Biomarkers*, 2016, Vol. 21, no. 6, pp. 509-516.

143. Xiang B., Zhang G., Guo L., Li X.A., Morris A.J., Daugherty A., Whiteheart S.W., Smyth S.S., Li Z. Platelets protect from septic shock by inhibiting macrophage-dependent inflammation via the cyclooxygenase 1 signalling pathway. *Nat. Commun.*, 2013, Vol. 4, 2657. doi: 10.1038/ncomms3657.
144. Yang S., Huang X., Liao J., Li Q., Chen S., Liu C., Ling L., Zhou J. Platelet-leukocyte aggregates – a predictor for acute kidney injury after cardiac surgery. *Ren. Fail.*, 2021, Vol. 43, no. 1, pp. 1155-1162.
145. Yip C., Ignjatovic V., Attard C., Monagle P., Linden M.D. First report of elevated monocyte-platelet aggregates in healthy children. *PLoS One*, 2013, Vol. 8, no. 6, e67416. doi: 10.1371/journal.pone.0067416.
146. Youssefian T., Drouin A., Masse J.M., Guichard J., Cramer E.M. Host defense role of platelets: engulfment of HIV and *Staphylococcus aureus* occurs in a specific subcellular compartment and is enhanced by platelet activation. *Blood*, 2002, Vol. 99, no. 11, pp. 4021-4029.
147. Zachem C.R., Alpers C.E., Way W., Shankland S.J., Couser W.G., Johnson R.J. A role for P-selectin in neutrophil and platelet infiltration in immune complex glomerulonephritis. *J. Am. Soc. Nephrol.*, 1997, Vol. 8, no. 12, pp. 1838-1844.
148. Zahran A.M., El-Badawy O., Mohamad I.L., Tamer D.M., Abdel-Aziz S.M., Elsayh K.I. Platelet activation and platelet-leukocyte aggregates in type I diabetes mellitus. *Clin. Appl. Thromb. Hemost.*, 2018, Vol. 24, no. 9 (Suppl.), pp. 230S-239S.
149. Zaldivar M.M., Pauels K., von Hundelshausen P., Berres M.L., Schmitz P., Bornemann J., Kowalska M.A., Gassler N., Streetz K.L., Weiskirchen R., Trautwein C., Weber C., Wasmuth H.E. CXC chemokine ligand 4 (Cxcl4) is a platelet-derived mediator of experimental liver fibrosis. *Hepatology*, 2010, Vol. 51, no. 4, pp. 1345-1353.
150. Zarbock A., Muller H., Kuwano Y., Ley K. PSGL-1-dependent myeloid leukocyte activation. *J. Leukoc. Biol.*, 2009, Vol. 86, no. 5, pp. 1119-1124.
151. Zarbock A., Polanowska-Grabowska R.K., Ley K. Platelet-neutrophil-interactions: linking hemostasis and inflammation. *Blood Rev.*, 2007, Vol. 21, no. 2, pp. 99-111.
152. Zarbock A., Singbartl K., Ley K. Complete reversal of acid-induced acute lung injury by blocking of platelet-neutrophil aggregation. *J. Clin. Invest.*, 2006, Vol. 116, no. 12, pp. 3211-3219.
153. Zhang S.Z., Jin Y.P., Qin G.M., Wang J.H. Association of platelet-monocyte aggregates with platelet activation, systemic inflammation, and myocardial injury in patients with non-ST elevation acute coronary syndromes. *Clin. Cardiol.*, 2007, Vol. 30, no. 1, pp. 26-31.
154. Zhou X., Liu X.L., Ji W.J., Liu J.X., Guo Z.Z., Ren D., Ma Y.Q., Zeng S., Xu Z.W., Li H.X., Wang P.P., Zhang Z., Li Y.M., Benefield B.C., Zawada A.M., Thorp E.B., Lee D.C., Heine G.H. The kinetics of circulating monocyte subsets and monocyte-platelet aggregates in the acute phase of ST-elevation myocardial infarction: associations with 2-Year cardiovascular events. *Medicine (Baltimore)*, 2016, Vol. 95, no. 18, e3466. doi: 10.1097/MD.0000000000003466.

Авторы:

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

Чепанов С.В. — к.м.н., старший научный сотрудник отдела иммунологии и межклеточных взаимодействий ФГБНУ «Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии имени Д.О. Отта», Санкт-Петербург, Россия

Селютин А.В. — к.б.н., старший научный сотрудник отдела иммунологии и межклеточных взаимодействий ФГБНУ «Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии имени Д.О. Отта», Санкт-Петербург, Россия

Сельков С.А. — д.м.н., профессор, заслуженный деятель науки РФ, заведующий отделом иммунологии и межклеточных взаимодействий ФГБНУ «Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии имени Д.О. Отта»; профессор кафедры иммунологии ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Authors:

Pavlov O.V., PhD, MD (Biology), Leading Research Associate, Department of Immunology and Cell Interaction, D. Ott Institute of Obstetrics, Gynecology, and Reproductive Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

Chepanov S.V., PhD (Medicine), Senior Research Associate, Department of Immunology and Cell Interaction, D. Ott Institute of Obstetrics, Gynecology, and Reproductive Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

Selutin A.V., PhD (Biology), Senior Research Associate, Department of Immunology and Cell Interaction, D. Ott Institute of Obstetrics, Gynecology, and Reproductive Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

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

РОЛЬ ЦИТОКИНОВ ПРИ ГЕПАТОЦЕЛЛЮЛЯРНОЙ КАРЦИНОМЕ

Агаев Т., Титерина Е.К., Хорева М.В., Ганковская Л.В.

ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова»
Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Резюме. Рак печени занимает пятое место в мире среди всех видов рака и третье место среди смертей, связанных с раковыми заболеваниями. Гепатоцеллюлярная карцинома (ГЦК) является первичной, не включающей метастазы в печень из других участков и самой распространенной формой рака печени и одной из ведущих причин смерти от рака во всем мире. ГЦК включает генетически и морфологически гетерогенную группу злокачественных опухолей. ГЦК характеризуется гендерной предрасположенностью: она встречается у мужчин в 1,5 чаще, чем у женщин. Вирусные инфекции, такие как гепатит В и С, являются основными факторами риска развития ГЦК, но также в развитых странах неалкогольный стеатогепатит (НАСГ), связанный с метаболическим синдромом и сахарным диабетом второго типа, становится все более часто встречаемым фактором риска развития заболевания. Механизмы, лежащие в основе развития ГЦК, основываются на генетических изменениях опухолевых клеток и их микроокружения. В последнее время роль изменений в микроокружении опухоли привлекает большее внимание и становится ключевой характеристикой в патогенезе ГЦК на всех стадиях злокачественного процесса. Гепатоциты имеют тесную связь с иммунными клетками, так как в печени помимо гепатоцитов присутствуют клетки Купфера, клетки миелоидного ряда (дендритные клетки, моноциты и нейтрофилы) и другие типы клеток (Т- и В-лимфоциты, NK и NKT и т. д.). Выделяемые различными иммунными клетками печени цитокины оказывают влияние на процессы в печени, такие как развитие воспаления и рака. Хроническое воспаление возникает в результате постоянных стимулов или недостатков в механизмах разрешения воспаления. Его ключевые особенности включают инфильтрацию иммунных клеток, наличие медиаторов воспаления и дисбаланс про- и противовоспалительных цитокинов, приводящих к возникновению агрессивного ангиогенеза и ремоделирования тканей, что в свою очередь приводит к озлокачествлению процесса. На данный момент существуют несколько подходов в лечении ГЦК в зависимости от стадии заболевания. Иммуноterapia и ее комбинации показали положительную динамику, и дальнейшие исследования в этой области помогут в борьбе на терминальных стадиях ГЦК. Разнообразные цитокины и их функции в развитии ГЦК являются предметом настоящего обзора.

Ключевые слова: рак печени, гепатоцеллюлярная карцинома, цитокины, интерлейкины

Адрес для переписки:

Агаев Туран Ага Ровшан оглы
ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский
медицинский университет имени Н.И. Пирогова»
Министерства здравоохранения РФ
117997, Россия, Москва, ул. Островитянова, 1.
Тел.: 8 (977) 488-93-94.
E-mail: turan_aghayev@yahoo.com

Address for correspondence:

Aghayev Turan
N. Pirogov Russian National Research Medical University
117997, Russian Federation, Moscow, Ostrovitianov str., 1.
Phone: 7 (977) 488-93-94.
E-mail: turan_aghayev@yahoo.com

Образец цитирования:

Т. Агаев, Е.К. Титерина, М.В. Хорева,
Л.В. Ганковская «Роль цитокинов при
гепатоцеллюлярной карциноме» // Медицинская
иммунология, 2022. Т. 24, № 5. С. 889-902.
doi: 10.15789/1563-0625-ROC-2512
© Агаев Т. и соавт., 2022

For citation:

T. Aghayev, E.K. Titerina, M.V. Khoreva, L.V. Gankovskaya
“Role of cytokines in hepatocellular carcinoma”, *Medical
Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2022,
Vol. 24, no. 5, pp. 889-902.
doi: 10.15789/1563-0625-ROC-2512
DOI: 10.15789/1563-0625-ROC-2512

ROLE OF CYTOKINES IN HEPATOCELLULAR CARCINOMA

Aghayev T., Titerina E.K., Khoreva M.V., Gankovskaya L.V.

N. Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russian Federation

Abstract. Liver cancer ranks No. 5 in the world among all types of cancer and takes 3rd position among cancer-related deaths. Hepatocellular carcinoma (HCC) is a primary malignancy which does not include liver metastases from other sites. It is the most common form of liver cancers, and one of the leading causes of cancer-related deaths worldwide. HCC includes genetically and morphologically heterogeneous group of malignant tumors. HCC is characterized by a gender predisposition, namely, it occurs in men 1.5-fold more often, than in women. Viral infections such as hepatitis B and C are major risk factors for HCC. Moreover, non-alcoholic steatohepatitis (NASH) associated with metabolic syndrome and type 2 diabetes also becomes an increasingly common risk factor in developed countries. The mechanisms underlying the development of HCC are based on genetic changes in tumor cells and their microenvironment. Recently, the role of changes in the tumor microenvironment has drawn more attention, thus becoming the key characteristic in the HCC pathogenesis at all stages of the malignant process. Hepatocytes have a close relationship with immune cells, since in the liver, in addition to hepatocytes, there are Kupffer cells, myeloid cells (dendritic cells, monocytes and neutrophils) and other types of immune cells (T and B lymphocytes, NK and NKT, etc.). Cytokines released by various immune cells in the liver may influence liver processes, e.g., inflammation and carcinogenesis. Chronic inflammation results from persistent stimulation, or deficiencies of anti-inflammatory mechanisms. Its key features include immune cell infiltration, presence of inflammatory mediators, and imbalance of pro- and anti-inflammatory cytokines leading to aggressive angiogenesis and tissue remodeling which, in turn, promotes the malignant process. Currently, there are several approaches to the HCC treatment which depend on the stage of the disease. Immunotherapy and its combinations have shown positive advances, and further research in this area will provide therapeutic options at the terminal stages of HCC. A variety of cytokines and their functions in HCC development are discussed in the present review article.

Keywords: liver cancer, hepatocellular carcinoma, cytokines, interleukins

Введение

Первичный рак печени включает гетерогенную группу злокачественных опухолей, которые не включают метастазы в печень из других участков. Гепатоцеллюлярная карцинома печени (ГЦК), или рак печени, представляет собой первичную опухоль печени. В настоящее время ГЦК является пятой по распространенности причиной рака в мире и занимает третье место по причинам смерти от всех видов рака [83]. В Российской Федерации на 2018 год 3,5% от общего количества смертей от злокачественных новообразований пришлось на ГЦК, и у мужчин рак печени встречается в 1,5 раза чаще, чем у женщин [1, 2]. Пятилетняя выживаемость при ГЦК составляет около 18% [28]. В западных странах заболеваемость ГЦК у взрослого населения увеличивается, в то время как в азиатском регионе тенденции медленно снижаются [18]. Средний возраст больных ГЦК в РФ составляет 60–65 лет [2].

Гепатоцеллюлярная карцинома гораздо чаще встречается у мужчин, чем у женщин. В РФ уровень смертности от рака печени увеличился на

36% у мужчин (с 5,5 до 7,5 смертей на 100 тыс. человек) и на 27% у женщин (с 3,7 до 4,7 смертей на 100 тыс. человек) в период с 2010 по 2018 год [1]. Во многом это, вероятно, связано с нарастающим количеством факторов риска. К основным факторам риска ГЦК относятся хроническое употребление алкоголя, инфицирование вирусом гепатита В или С (ВГВ и ВГС), неалкогольный стеатогепатит (НАСГ), связанный с диабетом второго типа и ожирением, а также воздействие афлатоксина В1. Более того, ГЦК встречается примерно у 85% пациентов с диагнозом «цирроз печени» [20].

Единого мнения по поводу клетки, от которой происходит ГЦК, нет, она может быть стволовой клеткой печени, зрелым гепатоцитом, обладающим значительной пластичностью, или временной популяцией [67, 71]. Потеря TP53 может привести к дедифференцировке, что позволяет клеткам бесконтрольно размножаться и приобретать онкогенные изменения, например, в сигнальном пути Wnt-β-катенин. Также сигнальный путь mTOR, участвующий в клеточном метаболизме и пролиферации, активируется при

ГЦК, способствуя развитию, прогрессированию и распространению опухоли [21]. Активация теломеразы через мутации теломеразной обратной транскриптазы (TERT) и вирусные вставки являются наиболее распространенными соматическими генетическими трансформациями гепатоцитов как в нормальной, так и циррозной печени, которые наблюдаются при ГЦК [66].

Системное потребление алкоголя, хронические вирусные гепатиты и НАСГ приводят к прогрессированию заболеванию печени вплоть до цирроза, на фоне которого у 90% развивается ГЦК [75]. Ожирение является причиной развития рака во многих органах [82]. Данные показывают, что жировая болезнь и ее терминальная стадия — НАСГ печени — становится ведущей причиной ГЦК на Западе [19]. НАСГ — это некровоспалительная реакция, возникающая при повреждении гепатоцитов липидами, при которой накопление жира сопровождается воспалением и повреждением, что связано с повышенным риском развития цирроза печени и ГЦК [46]. НАСГ способствует ГЦК посредством различных механизмов: метаболического и окислительного стресса, патологических хронических воспалительных реакций и измененной иммунной функции клеток [5]. Нарушение в процессе метаболизма жирных кислот в гепатоцитах может вызвать повреждение ДНК, вследствие увеличения количества активных форм кислорода, которые образуются в результате митохондриальной дисфункции, также изменение в метаболизме холестерина может способствовать продукции проонкогенных лигандов ядерных рецепторов [54]. НАСГ, диетическое и/или генетическое ожирение являются мощными стимуляторами возникновения и прогрессирования ГЦК у мышей [55]. ГЦК, индуцированная НАСГ или ожирением, зависит от усиленной продукции опухолью цитокинов IL-6 и TNF, которые вызывают воспаление печени и активацию онкогенного транскрипционного фактора STAT3 [26].

Традиционно диагноз «ГЦК» устанавливается на основании цитологического или гистологического анализа. Биопсия печени обычно не проводится при ГЦК, поскольку процедура связана с риском разрыва опухоли и кровотечения, а также с ложноотрицательным результатом при невозможности получить ткань из соответствующего участка. У пациентов с циррозом печени диагноз «ГЦК» может быть поставлен благодаря специфическим для ГЦК рентгенологическим особенностям во время сосудистой перфузии контрастом и визуализации поперечного сечения с помощью КТ и МРТ [47]. Также одной из рекомендуемых стратегий наблюдения является

полугодовое ультразвуковое исследование и анализ крови на α -фетопроtein или его отсутствие. α -фетопроtein представляет собой сывороточный гликопротеин, его повышенный уровень в сыворотке крови типичен для распространенной ГЦК [76].

Одной из тактик лечения является резекция, которая проводится пациентам с солитарной опухолью на ранней стадии, независимо от опухоли, при сохранной функции печени и отсутствии клинически значимой портальной гипертензии [90]. У таких пациентов резекция связана с выживаемостью более 60% в течение 5 лет, однако до 70% пациентов имеют рецидив опухоли через 5 лет [47]. У пациентов с ограниченной опухолевой массой, которые не являются кандидатами на резекцию, может быть выполнена трансплантация печени [49]. Пациенты с опухолью на ранней стадии, не соответствующие критериям хирургической резекции, подходят для микроволновой абляции опухоли, криоабляции или абляции с помощью инъекции этанола [20]. Когда опухоль не может быть удалена хирургически или пациент с ГЦК ожидает трансплантацию печени, может быть проведена трансартериальная химиоэмболизация (ТАХЭ), при которой блокируется печеночная артерия для замедления притока крови к опухоли [58].

У пациентов на поздних стадиях ГЦК с сохраненной функцией печени в качестве терапии применяют системную химиотерапию, препаратом первой линии является сорафениб или лениватиниб [42, 85]. На основании положительных данных исследования фазы III, препараты (регорafenиб и рамуцирумаб) одобрены для лечения ГЦК в качестве препаратов второй линии после прогрессирования на фоне сорафениба [23, 77].

Хроническое воспаление может активировать факторы транскрипции (например, NF- κ B, STAT3), которые являются ключевыми регуляторами воспалительной реакции, такой как продукция цитокинов, и, как следствие, развитие ГЦК. Активация воспалительных сигналов вследствие хронического повреждения печени приводит к некровоспалению (активации иммунных клеток, изменению иммунологических сигналов, сигналов выживания и пролиферации и стимулированию фиброза печени) и, впоследствии, к индукции онкогенеза. В настоящее время роль потери иммуноtolерантности, субпопуляции иммунных клеток и выделяемые ими цитокины, участвующие в хроническом повреждении печени, активно изучаются и исследуются как потенциальная мишень для лечения ГЦК.

Для достижения снижения случаев заболеваемости ГЦК необходимо работать в различных на-

правлениях: проводить профилактику инфекции ВГВ и ВГС, лечение хронических воспалительных процессов в печени и вирусных гепатитов, снижение воздействия диетических и метаболических факторов риска и улучшение диагностики и терапии.

Цитокины и гепатоцеллюлярная карцинома

Известно, что хроническое воспаление, вызванное микроокружением опухоли, вызывает инициацию, пролиферацию, прогрессирование, метастазирование и терапевтическую резистентность рака. Микроокружение опухоли способствует секреции различных цитокинов при различных типах и стадиях рака. Эти цитокины могут ингибировать развитие опухоли или, наоборот, могут способствовать хроническому воспалению, которое поддерживает рост опухоли как аутокринным, так и паракринным образом, что связано с неблагоприятными исходами рака. Цитокины принято разделять на две большие группы: провоспалительные и противовоспалительные. Таким образом, у цитокинов в контексте раковых заболеваний двойственная роль. Врожденная и адаптивная иммунные системы, несомненно, важны для обнаружения и элиминации трансформированных клеток. Однако этот процесс нарушается при некровоспалении, и противовоспалительные цитокины (например, IL-10 и TGF- β) подавляют надлежащие противоопухолевые иммунные ответы.

В норме здоровая взрослая печень имеет активную и сложную цитокиновую среду. Нарушения в регуляции контроля иммунологической сети печени приводят к хроническому воспалительному процессу, которое в свою очередь тесно связано с развитием рака. ГЦК является типичным раком, связанным с воспалением. При ГЦК цитокины играют роль в различных аспектах образования и обнаружения опухолей. Молекулы интерлейкинов могут играть ключевую роль в прогрессировании ГЦК, но понимание системных взаимосвязей между интерлейкинами и ГЦК остается сложной задачей. Ключевые элементы хронического воспаления при канцерогенезе способствуют компенсаторной пролиферации трансформированных гепатоцитов, инфильтрации иммунных клеток (опухоль-ассоциированные макрофаги, незрелые миелоидные клетки, Т-клетки), наличию медиаторов воспаления, дисбалансу про- и противовоспалительных цитокинов, а также возникновению ангиогенеза и ремоделирования ткани. Острые и хронические заболевания печени являются заболеваниями, обусловленными цитокинами, поскольку несколько провоспалительных цитокинов (IL-1 α ,

IL-1 β , TNF и IL-6) играют решающую роль в воспалении, стеатозе, фиброзе и развитии рака [55].

После образования ГЦК цитокины, высвобождаемые опухолью, соседними неопухолевыми клетками или иммунными клетками, могут воздействовать на злокачественное поражение, способствуя выживанию опухоли с помощью множества механизмов [22]. Большинство провоспалительных цитокинов (например, IL-1, IL-6, TNF), продуцируемых либо иммунными клетками хозяина, либо самими опухолевыми клетками, способствуют развитию опухоли. Однако проапоптотические и противовоспалительные (IL-10 и TGF- β) цитокины обычно препятствуют развитию и росту опухоли [40]. Кроме того, эти цитокины могут воздействовать на микроокружение опухоли, вызывая ускользание от иммунного ответа и метастазирование [15].

Одним из основных компонентов иммуносупрессивной среды при ГЦК является цитокиновый хаос. Несколько методов лечения направлены на изменение среды цитокинов для лечения ГЦК. Кроме того, было проведено несколько клинических испытаний с использованием цитокин-индуцированных клеток-киллеров (CIK) [38]. CIK представляют собой аутологичные периферические моноклеарные клетки, созданные *ex vivo* путем инкубации с цитокинами, включая IFN γ , IL-1, IL-2 и антитела против CD3. Эти клетки обходят иммунный прайминг и активацию Т-клеток и способны непосредственно нацеливаться на злокачественные клетки. Ученые проанализировали ранее опубликованные данные о терапии CIK и продемонстрировали, что терапия CIK улучшает общую выживаемость, выживаемость без прогрессирования, общую частоту ответа и качество жизни [44]. Однако исследование фазы III с участием 200 пациентов, рандомизированных в группе адъювантной терапии CIK или плацебо, продемонстрировало увеличение времени до рецидива без улучшения выживаемости и признаков заболевания или общей выживаемости [84]. Ожидаются клинические испытания других системных иммуномодуляторов и CIK [41].

TGF- β является одним из основных цитокинов, связанных с фиброгенезом и ангиогенезом при ГЦК. Однако данные свидетельствуют о том, что его роль заключается в первую очередь в качестве иммуносупрессора за счет модуляции клеток Treg [70]. Одно исследование предоставило многообещающие данные об ингибиторе TGF- β 1 у пациентов с терминальными стадиями ГЦК [29]. Продолжаются клинические испытания, в том числе галунисертиб, ингибитор TGF- β 1, в комбинации с сорафенибом или рамучирумабом,

ниволумаб или стереотаксическая лучевая терапия тела.

Все вышеописанные клинические исследования подчеркивают важность роли цитокинов при лечении ГЦК.

Интерлейкин-1 β

Регуляторный провоспалительный цитокин интерлейкин-1 β (IL-1 β) продуцируется иммунными клетками (клетки-супрессоры миелоидного происхождения), а также опухолевыми клетками при различных типах рака (рак груди, легких, шейки матки, желудка и ГЦК [59]. IL-1 β связывается с рецептором IL-1R и IL-1ra, и после структурного изменения связывается с IL-1R3 [13]. Полученный трехмерный комплекс сближается с TIR-доменами каждой из цепей, далее MyD88 связывается с этими доменами. Данная связь запускает киназный каскад, который дает сильный провоспалительный сигнал с последующей активацией NF- κ B.

Роль IL-1 β в карциногенезе была показана в исследовании на мышинной модели с использованием нокаутированных IL-1 β и мышей дикого типа [33]. Было продемонстрировано, что у мышей дикого типа развитие и рост опухолей, инвазия и метастазирование химически-индуцированных опухолей развивались быстрее, чем у мышей с дефицитом IL-1 β .

Другой группой было продемонстрировано, что гиперэкспрессия/патологическое повышение уровня IL-1 β у животных также обеспечивает прямую связь IL-1 β , клеток-супрессоров миелоидного происхождения и канцерогенеза [75]. Помимо этого, IL-1 β вызывает экспрессию цитидиндезаминазы (член семейства ДНК и РНК цитозиндезаминаз), которая вводит мутации в связанные с раком гены, такие как *TP53* и *MYC*, и тем самым способствует гепатоканцерогенезу [87]. Из этих исследований можно заключить, что IL-1 β является непосредственным участником процесса онкогенеза.

IL-1 β оказывает сильное биологическое воздействие на печень, включая отложение жира в гепатоцитах, сенсibilизацию к гибели гепатоцитов и, что очень важно, усиление воспалительного каскада [73]. Одним из описанных выше факторов риска развития ГЦК является метаболический синдром, которому свойственно хроническое воспаление, изменения окислительно-восстановительных реакций и накопление свободного холестерина в организме. Нарушение метаболического гомеостаза при ожирении приводит к перегрузке липидами гепатоцитов и адипоцитов, провоцируя нарушение в эндоплазматическом ретикулуме и выработку сигнальных молекул воспаления [27]. Накопление клетками

холестерина связано с воспалением и фиброзом печени, что приводит к активации инфламмосомы NLRP3 и дальнейшей выработке IL-1 β , данный процесс запускает воспалительный каскад, включая выработку IL-6, который оказывает митогенное действие на гепатоциты и способствует развитию ГЦК [50].

В исследовании сыворотки крови у пациентов с ГЦК было показано значительное повышение уровня IL-1 β в сравнении с контрольной группой [88]. Также в генетическом исследовании пациентов с ГЦК была обнаружена связь между IL-1 β и патогенеза ГЦК и сделано предположение, что IL-1 β является не только фактором плохого прогноза у пациентов, но и потенциально может быть использован как маркер прогнозирования течения заболевания [74].

Интерлейкин-6

Интерлейкин-6 (IL-6) представляет собой цитокин с разнообразным спектром биологической активности в иммунной регуляции, воспалении и онкогенезе [30]. IL-6 продуцируется и секретируется различными типами клеток (активированными макрофагами, Т-клетками), а также и опухолевыми клетками [34]. Сигналинг IL-6 происходит через гетеродимерный комплекс IL-6R/gp130, и это взаимодействие вызывает активацию JAK-киназ и нижестоящих эффекторов STAT3, SHP-2/Pas и PI3K/AKT. IL-6 связан с агрессивным ростом опухоли и вырабатывается в ответ на терапию при многих типах рака, усугубляя процесс канцерогенеза [63]. IL-6 участвует в пролиферации и дифференцировке опухолевых клеток и, как было установлено, содержится в сыворотке и опухолевых тканях при ГЦК [10]. В исследованиях было показано, что высокая концентрация циркулирующего IL-6, выявленная у пациентов, связана с высоким риском развития ГЦК и прогрессированием заболевания [3]. Во время хронического воспаления печени IL-6 вносит геномную нестабильность и повреждение ДНК, приводящее к усилению мутагенеза и ускорение канцерогенеза в печени [35].

Экспрессия IL-6, активирующих STAT3, повышается при заболеваниях печени и ГЦК. На животных моделях было показано, что полученный из миелоидных клеток IL-6 является непосредственным участником механизма гепатоканцерогенеза, индуцированным клетками-предшественниками, и гепатоканцерогенеза, связанного с ожирением [55]. Эксперименты *in vivo*, проведенные на мышинной модели ГЦК с диэтилнитрозамином (DEN) с гепатоцит-специфическим нокаутом IL-6R/gp130, продемонстрировали снижение количества опухолевых очагов и макрофагов печени по сравнению с контрольной

ной группой, что подтверждает роль IL-6 в образовании ГЦК [24]. Исследования на мышинных моделях ГЦК продемонстрировали, что изолированные клетки-предшественники ГЦК могут вызывать рак с продолжающимся повреждением печени и что эти клетки способствуют собственному росту и прогрессированию в сторону злокачественных новообразований посредством аутокринной выработки и передачи сигналов IL-6 [25].

Пациенты с высоким уровнем циркулирующего IL-6 обычно имеют плохой прогноз и малую выживаемость, в то время как более низкий уровень IL-6 связан с лучшим ответом на терапию. Оверэкспрессия IL-6 увеличивает метастатический потенциал опухолевых клеток с преимущественными метастазами в брюшную полость [60]. Таким образом, экспериментальные данные, полученные на животных моделях и анализе ГЦК у человека, доказывают канцерогенное действие IL-6 в патогенезе ГЦК.

Фактор некроза опухоли-альфа

Впервые изолированный в 1984 году фактор некроза опухоли альфа (TNF α) представляет собой провоспалительный цитокин, продуцируемый макрофагами и моноцитами, контролирует популяции воспалительных клеток, опосредует многие аспекты воспалительного процесса и отвечает за широкий спектр сигнальных событий в клетках, ведущих к некрозу или апоптозу, важен для устойчивости к инфекциям и раку [65]. Связывание лиганда TNF α с рецептором TNF (TNFR1) инициирует провоспалительные и проапоптотические сигнальные каскады [7]. Провоспалительные сигнальные пути стимулируются активацией либо NF- κ B, либо MAPK. Несмотря на название, TNF α играет важную роль на ранних этапах образования опухоли, регулируя каскад цитокинов, хемокинов и проангиогенную активность. Таким образом, TNF α может быть одним из способов, с помощью которых воспаление действует как промотор опухоли. Высокий уровень провоспалительного TNF α был связан с канцерогенезом. Таким образом, блокирующие антитела, которые обладают значительной терапевтической эффективностью при других воспалительных заболеваниях, могут найти применение в терапии рака [69].

Канцерогенная активность TNF α опосредуется его способностью активировать провоспалительный фактор транскрипции NF- κ B, который регулирует экспрессию генов, связанных с выживанием, пролиферацией, инвазией, ангиогенезом и метастазированием опухолевых клеток [8]. Несколько типов опухолевых клеток конститутивно экспрессируют TNF α , включая

рак яичников, рак груди, рак печени и другие, что приводит к эндогенной стимуляции опухолевого роста. Провоспалительный TNF α продуцируется в ответ на повреждение ткани и связан с увеличением клеточного цикла и окислительным стрессом за счет образования 8-оксодезоксигуанозина, установленного маркера повреждения ДНК, связанного с хроническим гепатитом в организме человека [81].

Гепатоциты несут множество рецепторов цитокинов, таких как IL-1, TNF α и IL-6. Было обнаружено, что уровень TNF α выше у пациентов с циррозом, острым или хроническим гепатитом по сравнению со здоровыми пациентами [16]. В исследовании на мышинной модели химически индуцированного карциногенеза мыши, получавшие диету с высоким содержанием жиров (HFD), демонстрировали более высокие уровни IL-6 и TNF α и у них развивалось больше ГЦК в модели DEN, чем у мышей, получавших обычную диету [55]. Соответственно, мыши с дефицитом IL-6 или рецептора TNF демонстрировали пониженный гепатоканцерогенез после в модели DEN и HFD, что также сопровождалось пониженной экспрессией STAT3. Кроме того, нарушение передачи сигналов IL-6 снижает уровни TNF α , вызванные ожирением, и наоборот, подтверждая важную роль IL-6 и TNF α в стимулировании индуцированного HFD воспаления печени и канцерогенеза. Исследования пациентов с ГЦК до и после гепатэктомии продемонстрировали увеличение уровня TNF α , особенно у пациентов с рецидивом [52]. В другом исследовании более высокие уровни TNF α у пациентов были обнаружены в тканях, окружающих опухоль и метастазах в печени, чем в самой опухоли [14].

Роль TNF α в иммунологических, онкологических и метаболических заболеваниях становится все более очевидной, поэтому он становится активной мишенью для разработки лекарств с противоопухолевым терапевтическим потенциалом, на что указывает недавнее одобрение и расширение рынка блокаторов TNF α .

Интерлейкин-10

Противовоспалительный цитокин интерлейкин-10 (IL-10), представляющий собой димер, связывающийся с рецептором IL-10R, активирует STAT3, необходимый для иммуносупрессивного действия, уменьшая выработку медиаторов воспаления и ингибируя презентацию антигена [61]. IL-10 продуцируется активированными моноцитами, макрофагами, дендритными клетками и лимфоцитами [62].

Роль IL-10 в патогенезе и развитии опухолей на данный момент крайне противоречива и обладает двойственным действием, либо стимулируя

иммунный ответ, либо приводя к его подавлению при раке. В самом начале формирования опухоли IL-10 преимущественно стимулирует уничтожение раковых клеток посредством NK и цитотоксических Т-клеток. Однако, если раковые клетки выживают, они начинают самостоятельно экспрессировать IL-10R, продукция IL-10 в микроокружении опухоли в основном действует как мощный промотор рака. Многочисленные исследования на различных формах рака (например, меланома и рак легких) показали положительную корреляцию между уровнями IL-10 (как в сыворотке, так и внутри опухоли) и плохим прогнозом для пациента. Также в исследованиях было показано, что IL-10 продуцируется самими опухолевыми клетками, таким образом, связь рака и экспрессия IL-10 является механизмом ухода от иммунного надзора [64].

В исследовании была показана высокая экспрессия IL-10 в опухолях у пациентов с ГЦК в сравнении со здоровыми тканями вокруг опухолей и здоровыми индивидами [9]. Помимо этого, было показано, что повышение IL-10 и, возможно, других цитокинов коррелирует с прогрессированием заболевания. IL-10 являются важными модуляторами в развитии и прогрессировании ГЦК [88].

В метаанализе были показаны повышенные уровни IL-10 у пациентов с ГЦК по сравнению с пациентами с циррозом и здоровыми людьми из контрольной группы, которые могут указывать на значительную роль этого цитокина в повышенном риске ГЦК, но отсутствие значительной разницы в уровнях между ГЦК и гепатитом делает это ненадежный онкомаркер в последнем [68].

Была исследована клиническая значимость послеоперационного противовоспалительного уровня IL-10 у пациентов с резекцией ГЦК. Уровни IL-10 были значительно выше при ГЦК, чем у здоровых людей. Пациенты с высоким уровнем IL-10 имели худшую выживаемость без признаков заболевания, и многомерный анализ показал, что IL-10 может быть маркером исхода пострезекции у пациентов с ГЦК [17].

Интерлейкин-12

Семейство цитокинов интерлейкин-12 (IL-12) включает IL-12, IL-23, IL-27 и IL-35 [77]. IL-12 связывается с рецептором IL-12 (IL-12R), состоящий из цепей рецептора IL-12 β -1 (IL-12R β 1) и рецептора IL-12 β -2 (IL-12R β 2), обе они также имеют гомологию с gp130, передача сигналов осуществляется через JAK/STAT. IL-12 продуцируется естественными киллерами (NK), Т-клетками, дендритными клетками (ДК) и макрофагами. IL-12 обладает важными регуляторными функциями, которыми связывает врожденный и адап-

тивный иммунитет, и, кроме того, описывается в качестве иммунного адьюванта для иммунотерапии инфекционных и злокачественных заболеваний. Основная функция IL-12 заключается в стимуляции дифференцировки Th1-клеток, увеличивает активацию и цитотоксичность NK-клеток, CD8⁺ и CD4⁺Т-клеток, ингибирует или перепрограммирует иммуносупрессивные клетки, такие как опухолеассоциированные макрофаги и супрессорные клетки миелоидного происхождения [80].

Исследования показали, что IL-12 может играть жизненно важную роль в лечении многих заболеваний, таких как вирусные и бактериальные инфекции, а также рак. Высокий уровень IL-12 связаны с хроническими заболеваниями печени, преимущественно встречаются у пациентов с циррозом печени, хроническим гепатитом и положительной реакцией на вирус гепатита В [72].

Несмотря на то, что IL-12 является противоопухолевым цитокином, считается, что он не способен непосредственно ингибировать рост опухолей. Противоопухолевое действие IL-12 проявляется при его непосредственном присутствии в месте расположения опухоли, под действием которого опосредуется Th1-тип иммунного ответа. В последнее время IL-12 стал одним из самых изучаемых цитокинов, опосредующих противоопухолевую активность. Среди различных иммунотерапевтических подходов IL-12 особенно привлекателен из-за его превосходных противоопухолевых эффектов, которые были продемонстрированы как в доклинических, так и в клинических исследованиях.

Важную роль в канцерогенезе и основным компонентом солидных опухолей являются рекрутируемые из циркулирующих моноцитов макрофаги. В исследовании было показано, что моноциты с избыточной экспрессией IL-12 могут направленно дифференцироваться в уничтожающие опухолевые клетки макрофагов M1 и ингибировать рост ГЦК в микроокружении опухоли путем снижения регуляции STAT3 [78]. Также было продемонстрировано, что при внутрипеченочной доставке IL-12 с помощью генетически модифицированных *in vitro* для экспрессии IL-12 клеток у BALB/с мышей позволяло макрофагам и лимфоцитам быстро инфильтрировать, что приводило к подавлению опухолевого роста [56]. Местные лимфоциты и антиангиогенез оказывают важное влияние на противоопухолевую активность IL-12, что делает его важным кандидатом для лечения ГЦК [43].

В исследовании противоопухолевый ответ IL-12 был продемонстрирован на мышинной мо-

дели ГЦК с использованием аденовирусного вектора, несущего IL-12 (Adv-IL-12). Adv-IL-12 вызывал регрессию опухоли и был связан с иммунным инфильтратом, потенциально участвующим в ингибировании ангиогенеза [4]. Такой же эффект показан в исследовании с первичной ГЦК, вызванной вирусом гепатита у сурков. Терапия с Adv-IL-12 вызвала регрессию опухоли и повышение уровней CD4 и CD8T-клеток и IFN γ [57].

Терапия с помощью IL-12 часто сопровождается побочными эффектами особенно из-за высокой индукции IFN γ [36]. Для снижения нежелательных эффектов и оптимизации терапевтической эффективности на мышинной модели ГЦК было показано, что комбинированная терапия IL-12 и гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (GM-CSF) оказывает более сильное противоопухолевое действие и снижает выраженность побочных эффектов [79]. ГЦК на ранних стадиях и при неоперабельных опухолях при локализованном введении IL-12 в сочетании с резекцией может помочь усилить эффект терапии и контроль над опухолью [53].

Всплеск иммунотерапии на основе IL-12, а также разные комбинированные подходы могут сыграть важную роль в иммунотерапии ГЦК в ближайшем будущем.

Трансформирующий ростовой фактор- β

Трансформирующий ростовой фактор- β (TGF- β) — цитокин, обладающий плеiotропной активностью, секретируется иммунными и опухолевыми клетками и при этом обладает двойственным действием при раке как опухолевый супрессор и промотор. Семейство цитокинов TGF- β существует в нескольких формах (например, TGF- β 1, TGF- β 2 и TGF- β 3). Сигналинг TGF- β происходит посредством его связывания с рецептором T β RII, затем TGF- β активирует киназу T β RI, что приводит к фосфорилированию SMAD2 и SMAD3. Впоследствии активированные SMAD2 и SMAD3 образуют олигомерные комплексы с SMAD4 и далее транслоцируются в ядро, где напрямую связываются с SMAD-связывающим элементом (SBE) и рекрутируют котранскрипционные факторы для транскрипции или подавления генов-мишеней [48]. Практически все типы клеток человека реагируют на TGF- β . Несмотря на то, что сигнальный путь TGF- β играет важную роль во многих биологических процессах таких как рост, дифференцировка, апоптоз и миграция клеток и их микроокружение, его регуляция способна привести к иницированию и прогрессированию рака [89]. Но, будучи генетически нестабильными, раковые

клетки обладают способностью избегать или, что еще хуже, искажать подавляющее влияние пути TGF- β .

Во время канцерогенеза в опухоль инфильтрируют различными типами клеток (лейкоциты, макрофаги, клетки-предшественники эндотелиальных, мезенхимальных и миелоидных клеток), которые становятся источником TGF- β , который ведет к прогрессированию опухолевого роста и способствует метастазированию [86]. Способность злокачественных опухолей пролиферировать в присутствии биологически активного TGF- β была показана в *in vivo* исследовании. Кроме того, наличие TGF- β способствует росту злокачественных клеток-клонов, устойчивых к TGF- β -опосредованной остановке клеточного цикла.

Хроническое воспаление печени, которое, например, вызывается при хроническом вирусном гепатите, играет важную роль в развитии рака печени, так как происходят изменения в сигнальном пути TGF- β , приводящие к увеличению риска развития ГЦК [45]. Активация TGF- β при ГЦК была продемонстрирована *in vivo*, на ГЦК в модели DEN, которую можно заблокировать с использованием ингибитора киназы рецептора I TGF- β , что привело к снижению неогенеза и росту опухоли, как было показано в *in vitro* исследовании на клетка ГЦК человека [70]. Исследования сыворотки крови у пациентов с циррозом печени и ГЦК показали увеличение уровня TGF- β в сравнении с контрольной группой, таким образом авторы предположили, что такое увеличение TGF- β у пациентов может быть использовано как маркер для прогнозирования риска развития ГЦК на ранних стадиях [31].

Клиническое значение роли TGF- β в развитии ГЦК становится все более ясными, что дает понимание сложного процесса онкогенеза и терапевтического потенциала.

Интерферон- γ

Интерферон- γ (IFN γ) — это воспалительный цитокин, который играет важную роль в индукции и модуляции ряда иммунных ответов. Связывание IFN γ с его родственными рецепторами вызывает изменение конформации рецептора, позволяя рекрутировать JAK1 и JAK2 в рецепторный комплекс [12]. Связывание IFN γ вызывает фосфорилирование JAK2, которое дополнительно трансфосфорилирует JAK1. Это, в свою очередь, вызывает изменение конформации рецептора, создающего стыковочный сайт для STAT1. Кроме того, JAK2 фосфорилирует фактор транскрипции STAT1. IFN γ в основном секретируется активированными Т-клетками и естественными клетками-киллерами (NK) и может способство-

вать активации макрофагов, опосредовать противовирусный и антибактериальный иммунитет, усиливать презентацию антигена, управлять активацией врожденной иммунной системы и координировать процесс клеточной пролиферации и апоптоза [11].

IFN γ представляет собой плейотропный цитокин, который долгое время считался важной эффекторной молекулой противоопухолевого иммунитета, способной подавлять рост опухоли с помощью различных механизмов. Однако IFN γ не только контролирует начало и прогрессирование опухоли, но также формирует иммуногенность опухоли и способствует росту опухолевых клеток с иммунными ускользающими свойствами. Повышенные уровни IFN γ связывают с прогрессированием заболевания и дисфункцией печени. Исследования пациентов с фиброзом и циррозом печени, ГЦК и здоровых индивидов показали увеличение уровня IFN γ и корреляцию между его уровнями и тяжестью заболевания печени [6]. Было показано, что большинство пациентов с ГЦК продуцировало меньшее количество IFN γ , чем у здоровых людей, и никакой разницы в продукции IFN γ не наблюдалось у пациентов с низким и высоким уровнями репликации HBV [51].

IFN γ при ГЦК оказывает прямое токсическое действие на раковые клетки, так и антиангиогенную активность [76]. IFN γ был идентифицирован как опухолевый супрессор НСС через регуляцию апоптоза и прогрессирования клеточного цикла. Исследования пациентов с циррозом печени и ГЦК показали меньшую концентрацию IFN γ без существенной разницы между группами с циррозом и контрольной группой, а также более высокий риск рецидива опухоли после лечения, таким образом, IFN γ может отражать противоопухолевый иммунитет хозяина и может быть потенциальным маркером рецидива ГЦК после лечебного лечения [37]. При ГЦК пациенты с более низким уровнем IFN γ в сыворотке или наименьшей экспрессией рецептора IFN γ в раковых тканях обычно имеют больший размер опухоли, более высокие метастазы и повышенный риск рецидива опухоли после лечения. Было показано, что функция IFN γ в качестве опухолевого супрессора при ГЦК связана как с ингибированием прогрессирования клеточного цикла, так

и с инициацией апоптоза *in vitro* и *in vivo* [32]. В *in vitro* исследовании было продемонстрировано, что обработка клеток IFN γ повышает апоптоз клеточных линий HepG2 и Huh7 [39].

Учитывая положительные противоопухолевые эффекты наряду с ограничением проопухолевого действия, IFN γ может способствовать созданию многообещающей иммунотерапии ГЦК и дополнительно снизить риски приобретения опухолями устойчивости к противоопухолевому иммунитету и/или развития прогрессирующего характера.

Заключение

ГЦК является распространенной патологией печени. Борьба с факторами риска (вирусные гепатиты, алфатоксины), приводящими к развитию ГЦК, показывает свою эффективность, но высококалорийная диета, употребление алкоголя и малоподвижный образ жизни, распространенный в западных странах, вызывает быстрый рост ожирения, метаболического синдрома и диабета, что в свою очередь приводит к хроническим воспалительным процессам в печени. Комплексное иммунорегуляторное взаимодействие в печени необходимо для поддержания органного и системного гомеостаза, а также для мобилизации воспалительных механизмов для защиты от инфекции, метастазирования и повреждения тканей.

Общеизвестно, что хроническое воспаление, опосредованное большим разнообразием популяций иммунных клеток и цитокинов в печени вместе с нетрансформированными печеночными клетками, является ключевым фактором прогрессирования ГЦК. Иммунное микроокружение опухоли, различные типы клеток и вырабатываемые ими цитокины поддерживают развитие рака, метастазирование и лекарственную устойчивость.

Провоспалительные цитокины (IL-1, IL-6 и TNF α) продуцируются как иммунными, так и самими опухолевыми клетками, способствуя развитию ГЦК. С другой стороны, противовоспалительные цитокины (IL-10, IL-12 и TGF- β) препятствуют развитию и росту опухоли печени. Идентификация цитокинов и изучение их влияния при ГЦК играет важную роль в предупреждении и поиске иммунотерапевтических средств.

Список литературы / References

1. Агеева Л.И., Александрова Г.А., Зайченко Н.М., Кириллова Г.Н., Леонов С.А., Огрызко Е.В., Титова И.А., Харьковская Т.Л., Чумарина В.Ж., Пак Ден Нам. Здравоохранение в России. 2019: Стат.сб. / Росстат. М., 2019. 170 с. [Ageeva L.I., Aleksandrova G.A., Zaychenko N.M., Kirillova G.N., Leonov S.A., Ogrizko E.V., Titova I.A., Kharkovskaya T.L., Chumarina V.Zh., Pak Den Nam. Healthcare in Russia. 2019: Stat. sb. / Rosstat. M., 2019. 170 p.]

Titova I.A., Kharkova T.L., Chumarina V.Zh., Pak Den Nam. Health care in Russia. 2019. Statistical collection / Rosstat]. Moscow, 2019. 170 p.

2. Карин А.Д., Старинский В.В., Петрова Г.В. Злокачественные новообразования в России в 2018 году (заболеваемость и смертность). М.: МНИОИ им. П.А. Герцена – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, 2019. 250 с. [Karin A.D., Starinskiy V.V., Petrova G.V. Malignant neoplasms in Russia in 2018 (morbidity and mortality)]. Moscow: P. Herzen Moscow Cancer Research Institute, Branch of National Medical Research Radiological Centre, 2019. 250 p.

3. Aleksandrova K., Boeing H., Nöthlings U., Jenab M., Fedirko V., Kaaks R., Lukanova A., Trichopoulou A., Trichopoulos D., Boffetta P., Treppe E., Westphal S., Duarte-Salles T., Stepien M., Overvad K., Tjønneland A., Halkjaer J., Boutron-Ruault M.-C., Dossus L., Racine A., Lagiou P., Bamia C., Benetou V., Agnoli C., Palli D., Panico S., Tumino R., Vineis P., Bueno-de-Mesquita B., Peeters P.H., Gram I.T., Lund E., Weiderpass E., Quirós J.R., Agudo A., Sánchez M.-J., Gavrila D., Barricarte A., Dorransoro M., Ohlsson B., Lindkvist B., Johansson A., Sund M., Khaw K.-T., Wareham N., Travis R.C., Riboli E., Pischon T. Inflammatory and metabolic biomarkers and risk of liver and biliary tract cancer. *Hepatology*, 2014, Vol. 60, no. 3, pp. 858-871.

4. Andrews K.J., Ribas A., Butterfield L.H., Vollmer C.M., Eilber F.C., Disette V.B., Nelson S.D., Shintaku P., Mekhoubad S., Nakayama T., Taniguchi M., Glaspy J.A., McBride W.H., Economou J.S. Adenovirus-interleukin-12-mediated tumor regression in a murine hepatocellular carcinoma model is not dependent on CD1-restricted natural killer T cells. *Cancer Res.*, 2000, Vol. 60, no. 22, pp. 6457-6464.

5. Anstee Q.M., Reeves H.L., Kotsiliti E., Govaere O., Heikenwalder M. From NASH to HCC: current concepts and future challenges. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.*, 2019, Vol. 16, no. 7, pp. 411-428.

6. Attallah A.M., El-Far M., Zahran F., Shiha G.E., Farid K., Omran M.M., Abdelrazek M.A., Attallah A.A., el-Beh A.A., El-Hosiny R.M., El-Waseef A.M. Interferon-gamma is associated with hepatic dysfunction in fibrosis, cirrhosis, and hepatocellular carcinoma. *J. Immunoassay Immunochem.*, 2016, Vol. 37, no. 6, pp. 597-610.

7. Balkwill F. Tumor necrosis factor or tumor promoting factor? *Cytokine Growth Factor Rev.*, 2002, Vol. 13, no. 2, pp. 135-141.

8. Balkwill F. Tumour necrosis factor and cancer. *Nat. Rev. Cancer.*, 2009, Vol. 9, no. 5, pp. 361-371.

9. Beckebaum S., Zhang X., Chen X., Yu Z., Frilling A., Dworacki G., Grosse-Wilde H., Broelsch C.E., Gerken G., Cicinnati V.R. Increased levels of interleukin-10 in serum from patients with hepatocellular carcinoma correlate with profound numerical deficiencies and immature phenotype of circulating dendritic cell subsets. *Clin. Cancer Res.*, 2004, Vol. 10, no. 21, pp. 7260-7269.

10. Bergmann J., Müller M., Baumann N., Reichert M., Heneweer C., Bolik J., Lücke K., Gruber S., Carambia A., Boretius S., Leuschner I., Becker T., Rabe B., Herkel J., Wunderlich F.T., Mittrücker H.-W., Rose-John S., Schmidt-Arras D. IL-6 trans-signaling is essential for the development of hepatocellular carcinoma in mice. *Hepatology*, 2017, Vol. 65, no. 1, pp. 89-103.

11. Billiau A. Interferon-gamma: biology and role in pathogenesis. *Adv. Immunol.*, 1996, Vol. 62, pp. 61-130.

12. Blouin C.M., Hamon Y., Gonnord P., Boularan C., Kagan J., de Leseqno C.V., Ruez R., Mailfert S., Bertaux N., Loew D., Wunder C., Johannes L., Vogt G., Contreras F.-X., Marguet D., Casanova J.-L., Galès C., He H.-T., Lamaze C. Glycosylation-dependent IFN- γ R partitioning in lipid and actin nanodomains is critical for JAK activation. *Cell*, 2016, Vol. 166, no. 4, pp. 920-934.

13. Boraschi D., Tagliabue A. The interleukin-1 receptor family. *Semin. Immunol.*, 2013, Vol. 25, no. 6, pp. 394-407.

14. Bortolami M., Venturi C., Giacomelli L., Scalerta R., Bacchetti S., Marino F., Floreani A., Lise M., Naccarato R., Farinati F. Cytokine, infiltrating macrophage and T cell-mediated response to development of primary and secondary human liver cancer. *Dig. Liver Dis.*, 2002, Vol. 34, no. 11, pp. 794-801.

15. Cabillic F., Corlu A. Regulation of transdifferentiation and retrodifferentiation by inflammatory cytokines in hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*, 2016, Vol. 151, no. 4, pp. 607-615.

16. Chan S.L., Wong V.W., Qin S., Chan H.L. Infection and cancer: the case of hepatitis B. *J. Clin. Oncol.*, 2016, Vol. 34, no. 1, pp. 83-90.

17. Chau G.Y., Wu C.W., Lui W.Y., Chang T.J., Kao H.L., Wu L.H., King K.L., Loong C.C., Hsia C.Y., Chi C.W. Serum interleukin-10 but not interleukin-6 is related to clinical outcome in patients with resectable hepatocellular carcinoma. *Ann. Surg.*, 2000, Vol. 231, no. 4, pp. 552-558.

18. Dasgupta P., Henshaw C., Youlden D.R., Clark P.J., Aitken J.F., Baade P.D. Global trends in incidence rates of primary adult liver cancers: a systematic review and meta-analysis. *Front. Oncol.*, 2020, Vol. 10, 171. doi: 10.3389/fonc.2020.00171.

19. Estes C., Razavi H., Loomba R., Younossi Z., Sanyal A.J. Modeling the epidemic of nonalcoholic fatty liver disease demonstrates an exponential increase in burden of disease. *Hepatology*, 2018, Vol. 67, no. 1, pp. 123-133.

20. European Association for the Study of the Liver. EASL clinical practice guidelines: management of hepatocellular carcinoma. *J. Hepatol.*, 2018, Vol. 69, no. 1, pp. 182-236.

21. Ferrín G., Guerrero M., Amado V., Rodríguez-Perálvarez M., de la Mata M. Activation of mTOR signaling pathway in hepatocellular carcinoma. *Int. J. Mol. Sci.*, 2020, Vol. 21, no. 4, 1266. doi: 10.3390/ijms21041266.

22. Fu Y., Liu S., Zeng S., Shen H. From bench to bed: the tumor immune microenvironment and current immunotherapeutic strategies for hepatocellular carcinoma. *J. Exp. Clin. Cancer Res.*, 2019, Vol. 38, no. 1, 396. doi: 10.1186/s13046-019-1396-4.
23. Fung A.S., Tam V.C., Meyers D.E., Sim H.-W., Knox J.J., Zaborska V., Davies J., Ko Y.-J., Batuyong E., Samawi H., Cheung W.Y., Lee-Ying R. Second-line treatment of hepatocellular carcinoma after sorafenib: Characterizing treatments used over the past 10 years and real-world eligibility for cabozantinib, regorafenib, and ramucirumab. *Cancer Med.*, 2020, Vol. 9, no. 13, pp. 4640-4647.
24. Hatting M., Spannbauer M., Peng J., Masaoudi M.A., Sellge G., Nevzorova Y.A., Gassler N., Liedtke C., Cubero F.J., Trautwein C. Lack of gp130 expression in hepatocytes attenuates tumor progression in the DEN model. *Cell Death Dis.*, 2015, Vol. 6, no. 3, e1667. doi: 10.1038/cddis.2014.590.
25. He G., Dhar D., Nakagawa H., Font-Burgada J., Ogata H., Jiang Y., Shalapour S., Seki E., Yost S.E., Jepsen K., Frazer K.A., Harismendy O., Hatziaepostolou M., Iliopoulos D., Suetsugu A., Hoffman R.M., Tateishi R., Koike K., Karin M. Identification of liver cancer progenitors whose malignant progression depends on autocrine IL-6 signaling. *Cell*, 2013, Vol. 155, no. 2, pp. 384-396.
26. He G., Yu G.Y., Temkin V., Ogata H., Kuntzen C., Sakurai T., Sieghart W., Peck-Radosavljevic M., Leffert H.L., Karin M. Hepatocyte IKK β /NF- κ B inhibits tumor promotion and progression by preventing oxidative stress-driven STAT3 activation. *Cancer Cell*, 2010, Vol. 17, no. 3, pp. 286-297.
27. Hotamisligil G.S. Endoplasmic reticulum stress and the inflammatory basis of metabolic disease. *Cell*, 2010, Vol. 140, no. 6, pp. 900-917.
28. Jemal A., Ward E.M., Johnson C.J., Cronin K.A., Ma J., Ryerson B., Mariotto A., Lake A.J., Wilson R., Sherman R.L., Anderson R.N., Henley S.J., Kohler B.A., Penberthy L., Feuer E.J., Weir H.K. Annual report to the nation on the status of cancer, 1975-2014, Featuring Survival. *J. Natl Cancer Inst.*, 2017, Vol. 109, no. 9, dx030. doi: 10.1093/jnci/djx030.
29. Kelley R.K., Gane E., Assenat E., Siebler J., Galle P.R., Merle P., Hourmand I.O., Cleverly A., Zhao Y., Gueorguieva I., Lahn M., Faivre S., Benhadji K.A., Giannelli G. A phase 2 study of galunisertib (TGF- β 1 Receptor Type I Inhibitor) and sorafenib in patients with advanced hepatocellular carcinoma. *Clin. Transl. Gastroenterol.*, 2019, Vol. 10, no. 7, e00056. doi: 10.14309/ctg.0000000000000056.
30. Kishimoto T. IL-6: from its discovery to clinical applications. *Int. Immunol.*, 2010, Vol. 22, no. 5, pp. 347-352.
31. Kohla M.A.S., Attia A., Darwesh N., Obada M., Taha H., Youssef M.F. Association of serum levels of transforming growth factor β 1 with disease severity in patients with hepatocellular carcinoma. *Hepatoma Res.*, 2017, Vol. 3, pp. 294-301.
32. Komita H., Homma S., Saotome H., Zeniya M., Ohno T., Toda G. Interferon-gamma produced by interleukin-12-activated tumor infiltrating CD8 $^{+}$ T cells directly induces apoptosis of mouse hepatocellular carcinoma. *J. Hepatol.*, 2006, Vol. 45, no. 5, pp. 662-672.
33. Krelm Y., Voronov E., Dotan S., Elkabets M., Reich E., Fogel M., Huszar M., Iwakura Y., Segal S., Dinarello C.A., Apte R.N. Interleukin-1 β -driven inflammation promotes the development and invasiveness of chemical carcinogen-induced tumors. *Cancer Res.*, 2007, Vol. 67, no. 3, pp. 1062-1071.
34. Kumari N., Dwarakanath B.S., Das A., Bhatt A.N. Role of interleukin-6 in cancer progression and therapeutic resistance. *Tumour Biol.*, 2016, Vol. 37, no. 9, pp. 11553-11572.
35. Lanton T., Shriki A., Nechemia-Arbely Y., Abramovitch R., Levkovitch O., Adar R., Rosenberg N., Paldor M., Goldenberg D., Sonnenblick A., Peled A., Rose-John S., Galun E., Axelrod J.H. Interleukin 6-dependent genomic instability heralds accelerated carcinogenesis following liver regeneration on a background of chronic hepatitis. *Hepatology*, 2017, Vol. 65, no. 5, pp. 1600-1611.
36. Lasek W., Zagozdzon R., Jakobisiak M. Interleukin 12: still a promising candidate for tumor immunotherapy? *Cancer Immunol Immunother.*, 2014, Vol. 63, no. 5, pp. 419-435.
37. Lee I.C., Huang Y.H., Chau G.Y., Huo T.I., Su C.W., Wu J.C., Lin H.C.. Serum interferon gamma level predicts recurrence in hepatocellular carcinoma patients after curative treatments. *Int. J. Cancer.*, 2013, Vol. 133, no. 12, pp. 2895-2902.
38. Lee J.H., Lee J.H., Lim Y.S., Yeon J.E., Song T.-J., Yu S.J., Gwak G.-Y., Kim K.M., Kim Y.J., Lee J.W., Yoon J.-H. Adjuvant immunotherapy with autologous cytokine-induced killer cells for hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*, 2015, Vol. 148, no. 7, pp. 1383-1391.
39. Li J., Zeng M., Yan K., Yang Y., Li H., Xu X.. IL-17 promotes hepatocellular carcinoma through inhibiting apoptosis induced by IFN- γ . *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2020, Vol. 522, no. 2, pp. 525-531.
40. Lin W.W., Karin M. A cytokine-mediated link between innate immunity, inflammation, and cancer. *J. Clin. Invest.*, 2007, Vol. 117, no. 5, pp. 1175-1183.
41. Liu Z., Liu X., Liang J., Liu Y., Hou X., Zhang M., Li Y., Jiang X. Immunotherapy for hepatocellular carcinoma: current status and future prospects. *Front. Immunol.*, 2021, Vol. 12, 765101. doi: 10.3389/fimmu.2021.765101.
42. Llovet J.M., Ricci S., Mazzaferro V., Hilgard P., Gane E., Blanc J.-F., de Oliveira A.C., Santoro A., Raoul J.-L., Forner A., Schwartz M., Porta C., Zeuzem S., Bolondi L., Greten T.F., Galle P.R., Seitz J.-F., Borbath I., Häussinger D., Giannaris T., Shan M., Moscovici M., Voliotis D., Bruix J., SHARP Investigators Study Group Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma. *N. Engl. J. Med.*, 2008, Vol. 359, no. 4, pp. 378-390.

43. Lo C.H., Chang C.M., Tang S.W., Pan W.-Y., Fang C.-C., Chen Y., Wu P.-Y., Chen K.-Y., Ma H.-I., Xiao X., Tao M.-H. Differential antitumor effect of interleukin-12 family cytokines on orthotopic hepatocellular carcinoma. *J. Gene Med.*, 2010, Vol. 12, no. 5, pp. 423-434.
44. Ma Y., Xu Y.C., Tang L., Zhang Z., Wang J., Wang H.X. Cytokine-induced killer (CIK) cell therapy for patients with hepatocellular carcinoma: efficacy and safety. *Exp. Hematol. Oncol.*, 2012, Vol. 1, no. 1, 11. doi: 10.1186/2162-3619-1-11.
45. Macarthur M., Hold G.L., El-Omar E.M. Inflammation and Cancer II. Role of chronic inflammation and cytokine gene polymorphisms in the pathogenesis of gastrointestinal malignancy. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, 2004, Vol. 286, no. 4, G515-20. doi: 10.1152/ajpgi.00475.2003.
46. Machado M.V., Diehl A.M. Pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis. *Gastroenterology*, 2016, Vol. 150, no. 8, pp. 1769-1777.
47. Marrero J.A., Kulik L.M., Sirlin C.B., Zhu A.X., Finn R.S., Abecassis M.M., Roberts L.R., Heimbach J.K. Diagnosis, staging, and management of hepatocellular carcinoma: 2018 practice guidance by the american association for the study of liver diseases. *Hepatology*, 2018, Vol. 68, no. 2, pp. 723-750.
48. Massagué J, Gomis RR. The logic of TGFbeta signaling. *FEBS Lett.*, 2006, Vol. 580, no. 12, pp. 2811-2820.
49. Mazzaferro V., Regalia E., Doci R., Andreola S., Pulvirenti A., Bozzetti F., Montalto F., Ammatuna M., Morabito A., Gennari L. Liver transplantation for the treatment of small hepatocellular carcinomas in patients with cirrhosis. *N. Engl. J. Med.*, 1996, Vol. 334, no. 11, pp. 693-699.
50. Medzhitov R. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature*, 2008, Vol. 454, no. 7203, pp. 428-435.
51. Migita K., Miyazoe S., Maeda Y., Daikoku M., Abiru S., Ueki T., Yano K., Nagaoka S., Matsumoto T., Nakao K., Hamasaki K., Yatsuhashi H., Ishibashi H., Eguchi K. Cytokine gene polymorphisms in Japanese patients with hepatitis B virus infection-association between TGF-beta1 polymorphisms and hepatocellular carcinoma. *J. Hepatol.*, 2005, Vol. 42, no. 4, pp. 505-510.
52. Nakazaki H. Preoperative and postoperative cytokines in patients with cancer. *Cancer*, 1992, Vol. 70, no. 3, pp. 709-713.
53. Nguyen K.G., Vrabel M.R., Mantooth S.M., Hopkins J.J., Wagner E.S., Gabaldon T.A., Zaharoff D.A. Localized Interleukin-12 for cancer immunotherapy. *Front. Immunol.*, 2020, Vol. 11, 575597. doi: 10.3389/fimmu.2020.575597.
54. Nishida N., Yada N., Hagiwara S., Sakurai T., Kitano M., Kudo M. Unique features associated with hepatic oxidative DNA damage and DNA methylation in non-alcoholic fatty liver disease. *J. Gastroenterol. Hepatol.*, 2016, Vol. 31, no. 9, pp. 1646-1653.
55. Park E.J., Lee J.H., Yu G.Y., He G., Ali S.R., Holzer R.G., Osterreicher C.H., Takahashi H., Karin M. Dietary and genetic obesity promote liver inflammation and tumorigenesis by enhancing IL-6 and TNF expression. *Cell*, 2010, Vol. 140, no. 2, pp. 197-208.
56. Peron J.M., Couderc B., Rochaix P., Douin-Echinard V., Asnacios A., Souque A., Voigt J.-J., Buscail L., Vinel J.-P., Favre G. Treatment of murine hepatocellular carcinoma using genetically modified cells to express interleukin-12. *J. Gastroenterol. Hepatol.*, 2004, Vol. 19, no. 4, pp. 388-396.
57. Pützer B.M., Stiewe T., Röddicker F., Schildgen O., Rühm S., Dirsch O., Fiedler M., Damen U., Tennant B., Scherer C., Graham F.L., Roggendorf M. Large nontransplanted hepatocellular carcinoma in woodchucks: treatment with adenovirus-mediated delivery of interleukin 12/B7.1 genes. *J. Natl Cancer Inst.*, 2001, Vol. 93, no. 6, pp. 472-479.
58. Raoul J.L., Forner A., Bolondi L., Cheung T.T., Kloeckner R., de Baere T. Updated use of TACE for hepatocellular carcinoma treatment: How and when to use it based on clinical evidence. *Cancer Treat. Rev.*, 2019, Vol. 72, pp. 28-36.
59. Rébé C., Ghiringhelli F. Interleukin-1β and Cancer. *Cancers (Basel)*, 2020, Vol. 12, no. 7, 1791. doi: 10.3390/cancers12071791.
60. Reichner J.S., Mulligan J.A., Spisni R., Sotomayor E.A., Albina J.E., Bland K.I. Effect of IL-6 overexpression on the metastatic potential of rat hepatocellular carcinoma cells. *Ann. Surg. Oncol.*, 1998, Vol. 5, no. 3, pp. 279-286.
61. Riley J.K., Takeda K., Akira S., Schreiber R.D. Interleukin-10 receptor signaling through the JAK-STAT pathway. Requirement for two distinct receptor-derived signals for anti-inflammatory action. *J. Biol. Chem.*, 1999, Vol. 274, no. 23, pp. 16513-16521.
62. Sabat R., Grütz G., Warszawska K., Kirsch S., Witte E., Wolk K., Geginat J. Biology of interleukin-10. *Cytokine Growth Factor Rev.*, 2010, Vol. 21, no. 5, pp. 31-44.
63. Santer F.R., Malinowska K., Culig Z., Cavarretta I.T. Interleukin-6 trans-signalling differentially regulates proliferation, migration, adhesion and maspin expression in human prostate cancer cells. *Endoc. Relat. Cancer*, 2010, Vol. 17, no. 1, pp. 241-253.
64. Sato T., Terai M., Tamura Y., Alexeev V., Mastrangelo M.J., Selvan S.R. Interleukin 10 in the tumor microenvironment: a target for anticancer immunotherapy. *Immunol. Res.*, 2011, Vol. 51, no. 2-3, pp. 170-182.
65. Schoenfeld H.J., Poeschl B., Frey J.R., Loetscher H., Hunziker W., Lustig A., Zulauf M. Efficient purification of recombinant human tumor necrosis factor beta from Escherichia coli yields biologically active protein with a trimeric structure that binds to both tumor necrosis factor receptors. *J. Biol. Chem.*, 1991, Vol. 266, no. 6, pp. 3863-3869.

66. Schulze K., Imbeaud S., Letouze E., Alexandrov L.B., Calderaro J., Rebouissou S., Couchy G., Meiller C., Shinde J., Soysouvanh F., Calatayud A.-L., Pinyol R., Pelletier L., Balabaud C., Laurent A., Blanc J.-F., Mazzaferro V., Calvo F., Villanueva A., Nault J.-C., Bioulac-Sage P., Stratton M.R., Llovet J.M., Zucman-Rossi J. Exome sequencing of hepatocellular carcinomas identifies new mutational signatures and potential therapeutic targets. *Nat. Genet.*, 2015, Vol. 47, no. 5, pp. 505-511.
67. Seehawer M., Heinzmann F., D'Artista L., Harbig J., Roux P.-F., Hoenicke L., Dang H., Klotz S., Robinson L., Doré G., Rozenblum N., Kang T.-W., Chawla R., Buch T., Vucur M., Roth M., Zuber J., Luedde T., Sipos B., Longerich T., Heikenwälder M., Wang X.W., Bischof O., Zender L. Necroptosis microenvironment directs lineage commitment in liver cancer. *Nature*, 2018, Vol. 564, pp. 69-75.
68. Shakiba E., Ramezani M., Sadeghi M. Evaluation of serum interleukin-10 levels in hepatocellular carcinoma patients: a systematic review and meta-analysis. *Clin. Exp. Hepatol.*, 2018, Vol. 4, no. 1, pp. 35-40.
69. Shanahan J.C., St Clair W. Tumor necrosis factor-alpha blockade: a novel therapy for rheumatic disease. *Clin. Immunol.*, 2002, Vol. 103, pp. 231-242.
70. Shen Y., Wei Y., Wang Z., Jing Y., He H., Yuan J., Li R., Zhao Q., Wei L., Yang T., Lu J. TGF- β regulates hepatocellular carcinoma progression by inducing Treg cell polarization. *Cell. Physiol. Biochem.*, 2015, Vol. 35, no. 4, pp. 1623-1632.
71. Sia D., Villanueva A., Friedman S.L., Llovet J.M. Liver cancer cell of origin, molecular class, and effects on patient prognosis. *Gastroenterology*, 2017, Vol. 152, no. 4, pp. 745-761.
72. Song le H., Binh V.Q., Duy D.N., Kun J.F., Bock T.C., Kremsner P.G., Luty A.J. Serum cytokine profiles associated with clinical presentation in Vietnamese infected with hepatitis B virus. *J. Clin. Virol.*, 2003, Vol. 28, no. 1, pp. 93-103.
73. Szabo G., Petrasek J. Inflammasome activation and function in liver disease. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.*, 2015, Vol. 12, no. 7, pp. 387-400.
74. Tak K.H., Yu G.I., Lee M.Y., Shin D.H. Association between polymorphisms of interleukin 1 family genes and hepatocellular carcinoma. *Med. Sci. Monit.*, 2018, Vol. 24, pp. 3488-3495.
75. Tu S., Bhagat G., Cui G., Takaishi S., Kurt-Jones E.A., Rickman B., Betz K.S., Penz-Oesterreicher M., Bjorkdahl O., Fox J.G., Wang T.C. Overexpression of interleukin-1beta induces gastric inflammation and cancer and mobilizes myeloid-derived suppressor cells in mice. *Cancer Cell*, 2008, Vol. 14, no. 5, pp. 408-419.
76. Tzartzeva K., Obi J., Rich N.E., Parikh N.D., Marrero J.A., Yopp A., Waljee A.K., Singal A.G. Surveillance imaging and alpha fetoprotein for early detection of hepatocellular carcinoma in patients with cirrhosis: a meta-analysis. *Gastroenterology*, 2018, Vol. 154, no. 6, pp. 1706-1718.
77. Vignali D.A., Kuchroo V.K. IL-12 family cytokines: immunological playmakers. *Nat. Immunol.*, 2012, Vol. 13, no. 8, pp. 722-728.
78. Wang Q., Cheng F., Ma T.T., Xiong H.-Y., Li Z.-W., Xie C.-L., Liu C.-Y., Tu Z.-G. Interleukin-12 inhibits the hepatocellular carcinoma growth by inducing macrophage polarization to the M1-like phenotype through downregulation of Stat-3. *Mol. Cell Biochem.*, 2016, Vol. 415, no. 1-2, pp. 157-168.
79. Wang Z., Qiu S.J., Ye S.L., Tang Z.Y., Xiao X. Combined IL-12 and GM-CSF gene therapy for murine hepatocellular carcinoma. *Cancer Gene Ther.*, 2001, Vol. 8, no. 10, pp. 751-758.
80. Watkins S.K., Egilmez N.K., Suttles J., Stout R.D. IL-12 rapidly alters the functional profile of tumor-associated and tumor-infiltrating macrophages *in vitro* and *in vivo*. *J. Immunol.*, 2007, Vol. 178, no. 3, pp. 1357-1362.
81. Wheelhouse N.M., Chan Y.S., Gillies S.E., Caldwell H., Ross J.A., Harrison D.J., Prost S. TNF-alpha induced DNA damage in primary murine hepatocytes. *Int. J. Mol. Med.*, 2003, Vol. 12, no. 6, pp. 889-894.
82. Wolin K.Y., Carson K., Colditz G.A. Obesity and cancer. *Oncologist*, 2010, Vol. 15, no. 6, pp. 556-565.
83. World Health organization, The Global Cancer Observatory, 2020. Available at: <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/cancers/11-Liver-fact-sheet.pdf>.
84. Xu L., Wang J., Kim Y., Shuang Z.-Y., Zhang Y.-J., Lao X.-M., Li Y.-Q., Chen M.-S., Pawlik T.M., Xia J.-C., Li S.-P., Lau W.-Y. A randomized controlled trial on patients with or without adjuvant autologous cytokine-induced killer cells after curative resection for hepatocellular carcinoma. *Oncoimmunology*, 2015, Vol. 5, no. 3, e1083671. doi: 10.1080/2162402X.2015.1083671.
85. Yamashita T., Kudo M., Ikeda K., Izumi N., Tateishi R., Ikeda M., Aikata H., Kawaguchi Y., Wada Y., Numata K., Inaba Y., Kuromatsu R., Kobayashi M., Okusaka T., Tamai T., Kitamura C., Saito K., Haruna K., Okita K., Kumada H. REFLECT-a phase 3 trial comparing efficacy and safety of lenvatinib to sorafenib for the treatment of unresectable hepatocellular carcinoma: an analysis of Japanese subset. *J. Gastroenterol.*, 2020, Vol. 55, no. 1, pp. 113-122.
86. Yang L., Huang J., Ren X., Gorska A.E., Chytil A., Aakre M., Carbone D.P., Matrisian L.M., Richmond A., Lin P.C., Moses H.L. Abrogation of TGF beta signaling in mammary carcinomas recruits Gr-1⁺CD11b⁺ myeloid cells that promote metastasis. *Cancer Cell*, 2008, Vol. 13, no. 1, pp. 23-35.
87. Yu L.X., Ling Y., Wang H.Y. Role of nonresolving inflammation in hepatocellular carcinoma development and progression. *NPJ Precis. Oncol*, 2018, Vol. 2, no. 1, 6. doi: 10.1038/s41698-018-0048-z.

88. Zekri A.-R.N., El Deeb S., Bahnassy A.A., Badr A.M., Abdellateif M.S., Esmat G., Salama H., Mohanad M., el-Dien A.E., Rabah S., Elkader A.A. Role of relevant immune-modulators and cytokines in hepatocellular carcinoma and premalignant hepatic lesions. *World J. Gastroenterol.*, 2018, Vol. 24, no. 11, pp. 1228-1238.
89. Zhao M., Mishra L., Deng C.X. The role of TGF- β /SMAD4 signaling in cancer. *Int. J. Biol. Sci.*, 2018, Vol. 14, no. 2, pp. 111-123.
90. Zhou X.D., Tang Z.Y., Yang B.H., Lin Z.Y., Ma Z.C., Ye S.L., Wu Z.Q., Fan J., Qin L.X., Zheng B.H. Experience of 1000 patients who underwent hepatectomy for small hepatocellular carcinoma. *Cancer*, 2001, Vol. 91, no. 8, pp. 1479-1486.

Авторы:

Агаев Туран Ага Ровшан оглы — соискатель ученой степени кафедры иммунологии МБФ ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Титерина Е.К. — сотрудник научно-исследовательской лаборатории молекулярной фармакологии, Научно-исследовательский институт трансляционной медицины ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Хорева М.В. — д.м.н., доцент, профессор кафедры иммунологии МБФ ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Ганковская Л.В. — д.м.н., профессор кафедры иммунологии МБФ ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Authors:

Aghayev Turan Aga Rovshan Ogly, Postgraduate Student, Department of Immunology, N. Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russian Federation

Titerina E.K., Research Associate, Laboratory of Molecular Pharmacology, Institute for Translational Medicine, N. Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russian Federation

Khoreva M.V., PhD, MD (Medicine), Associate Professor, Professor, Department of Immunology, N. Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russian Federation

Gankovskaya L.V., PhD, MD (Medicine), Professor, Department of Immunology, N. Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russian Federation

Поступила 02.05.2022
Принята к печати 22.05.2022

Received 02.05.2022
Accepted 22.05.2022

РОЛЬ IFN γ В ПАТОГЕНЕЗЕ ИНФЕКЦИИ, ВЫЗВАННОЙ SARS-CoV-2

Артамонов А.А., Никитин Ю.В., Мешкова М.Е., Иванов А.М.

ФГБВОУ ВО «Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова», Санкт-Петербург, Россия

Резюме. На сегодняшний день нет единого мнения, объясняющего взаимосвязь различающихся концентраций IFN γ и тяжести течения инфекции вызванной SARS-CoV-2 у отдельных групп пациентов. Целью данной статьи является изучение и анализ исследований и публикаций, в совокупности формирующих потенциально объективный взгляд на роль IFN γ в патогенезе COVID-19.

В данной статье освещены актуальные данные об иммунологической роли IFN γ . Охарактеризована способность IFN γ оказывать влияние на дифференцировку наивных Т-хелперов выступая в роли поляризующего фактора, активировать главный комплекс гистосовместимости I и II класса за счет увеличения экспрессии субъединицы молекул МНС I/II, ингибировать репликацию вирусных частиц путем инициации экспрессии интерферон-стимулируемых генов с последующим синтезом белков, обладающих противовирусной активностью, а также активировать продукцию цитокинов Т-клетками, усиливая цитотоксическую активность Т-киллеров. IFN γ оказывает иммуностимулирующее и иммуномодулирующее действие через гены STAT1, SOCS1, PIAS, регулируя активацию JAK-STAT сигнального пути. Проанализирован ряд исследований, в которых рассмотрен паттерн изменения концентрации IFN γ в сыворотке при SARS-CoV-2 и других вирусных инфекциях. Выполнен системный анализ результатов исследований, в которых была установлена закономерность между высокими концентрациями IFN γ и тяжелым течением COVID-19. Выявленные статистически достоверные высокие уровни IFN γ у пациентов с COVID-19 в ряде исследований чаще ассоциированы с неблагоприятным исходом заболевания. Приведены данные исследований в которых установлено, что значение медианы концентрации IFN γ у тяжелых пациентов с COVID-19 значительно выше по сравнению с результатами, полученными у пациентов средней тяжести, и возрастает по мере увеличения вирусной нагрузки в носоглотке и ухудшения состояния пациента.

Опираясь на данные о снижении концентрации IFN γ у выздоравливающих пациентов с COVID-19, рассмотрен механизм антагонизма IFN γ и IL-4, в котором снижающиеся сывороточные концентрации IFN γ и возрастающий уровень IL-4 могут являться косвенным критерием становления нормального адаптивного иммунного ответа с последующей выработкой антител к SARS-CoV-2 и постепенной элиминации вируса из организма. Приведены данные исследований в ходе которых обнаружено, что наличие у пациентов паразитарных инфекций вызванных *Toxoplasma gondii*, *Cryptosporidium*, *Blastocystis hominis*, *Giardia duodenalis*, *Entamoeba histolytica* и стойкий повышенный уровень IFN γ снижает риск тяжелого течения COVID-19.

Ключевые слова: COVID-19, IFN γ , SARS-CoV-2, цитокины, биологические маркеры, IL-4, *Toxoplasma gondii*, *Cryptosporidium*, *Blastocystis hominis*

Адрес для переписки:

Никитин Юрий Владимирович
ФГБВОУ ВО «Военно-медицинская академия
имени С.М. Кирова»
194044, Россия, Санкт-Петербург,
ул. Акад. Лебедева, 6, лит. В.
Тел.: 8 (981) 719-04-84.
E-mail: dr.iuriinikitin@gmail.com

Address for correspondence:

Nikitin Yuri V.
S.M. Kirov Military Medical Academy
194044, Russian Federation, St. Petersburg,
Acad. Lebedev str., 6, bldg B.
Phone: 7 (981) 719-04-84.
E-mail: dr.iuriinikitin@gmail.com

Образец цитирования:

А.А. Артамонов, Ю.В. Никитин, М.Е. Мешкова,
А.М. Иванов «Роль IFN γ в патогенезе инфекции,
вызванной SARS-CoV-2» // Медицинская иммунология,
2022. Т. 24, № 5. С. 903-910.
doi: 10.15789/1563-0625-ROI-2519
© Артамонов А.А. и соавт., 2022

For citation:

A.A. Artamonov, Yu.V. Nikitin, M.E. Meshkova, A.M. Ivanov
“Role of IFN γ in pathogenesis of SARS-CoV-2 infection”,
Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya,
2022, Vol. 24, no. 5, pp. 903-910.
doi: 10.15789/1563-0625-ROI-2519
DOI: 10.15789/1563-0625-ROI-2519

ROLE OF IFN γ IN PATHOGENESIS OF SARS-CoV-2 INFECTION

Artamonov A.A., Nikitin Yu.V., Meshkova M.E., Ivanov A.M.

S.M. Kirov Military Medical Academy, St. Petersburg, Russian Federation

Abstract. To date, there is no consensus explaining the relationship between varying concentrations of IFN γ and the severity of infection caused by SARS-CoV-2. The aim of this article was to analyze and formulate conclusions from the selected studies and publications, which, in sum, provide a potentially reasonable view on the role of IFN γ in COVID-19 pathogenesis. This article highlights current data on the immunological role of IFN γ which affects differentiation of naive T helper cells, acting as a polarizing factor. It activates the major histocompatibility complex (MHC) class I and II, by increasing the expression of MHC I/II subunits, inhibiting replication of the viral particles by initiating activation of interferon-stimulated genes followed by subsequent synthesis of antiviral proteins. Moreover, IFN γ activates the production of cytokines by T cells, enhancing cytotoxic activity of the T killers. IFN γ exerts immunostimulatory and immunomodulatory effects *via* STAT1, SOCS1 and PIAS genes, thus regulating activation of the JAK-STAT signaling pathway. A number of studies were considered where the patterns of changes in serum IFN γ concentration were examined in viral infections and SARS-CoV-2. We performed a systemic analysis of the results of studies that showed a relationship between high concentrations of IFN γ and COVID-19 severity. In a number of studies, the significantly high levels of IFN γ in COVID-19 patients were often associated with a poor outcome of the disease. The median values of the IFN γ concentration in severe COVID-19 were found to be significantly higher compared to the results obtained in the cases of moderate severity. It shows an increase, in parallel with viral load in the nasopharyngeal samples upon worsening of the clinical condition. Based on the data on the decreased IFN γ concentrations in convalescent patients, the mechanism of antagonism between IFN γ and IL-4 is considered, where the decreases serum concentrations of IFN γ along with increasing level of IL-4 may be an indirect proof of normal adaptive immune response with subsequent development of antibodies to SARS-CoV-2 and gradual elimination of the virus from the body. Moreover, the evidence is discussed that the patients harboring some parasitic infections (*Toxoplasma gondii*, *Cryptosporidium*, *Blastocystis hominis*, *Giardia duodenalis*, *Entamoeba histolytica*) with persistently elevated level of IFN γ are at reduced risk for severe course of COVID-19.

Keywords: COVID-19, IFN γ , SARS-CoV-2, cytokines, biological markers, IL-4, *Toxoplasma gondii*, *Cryptosporidium*, *Blastocystis hominis*

С начала XXI века человечество уже в третий раз сталкивается с инфекциями, вызванными вирусами семейства *Coronaviridae*. Вспышка SARS-CoV в 2002 году в Китае привела к инфицированию 8422 человек и унесла жизни 916 человек. На момент окончания пандемии в 2004 установлена летальность 11% [10]. В 2003 году были выдвинуты инициативы и предприняты попытки разработки вакцины от SARS, однако непродолжительное время спустя исследования были остановлены вследствие прекращения финансирования [27].

В 2012 году в Саудовской Аравии впервые был зарегистрирован Ближневосточный респираторный синдром (MERS). Из 50 случаев инфицирования половина закончилась летальным исходом. На начало 2020 года в мире зарегистрировано 2506 случаев инфицирования и 912 смертей от MERS. Летальность на сегодняшний день составляет 36% [13, 14].

Вспышка коронавирусной инфекции в Китае 2019 года вызванная SARS-CoV-2 привела к пандемии, результатом которой на февраль 2022 года стало более 5,8 млн умерших человек по всему миру. Несмотря на успешно проводимые программы вакцинации населения в развитых и развивающихся странах, количество инфициро-

ванных продолжает расти и на сегодняшний день достигло более 400 млн человек [11].

Ранее считалось, что MERS, SARS-CoV-1 и SARS-CoV-2 обладают схожим патогенезом и механизмом проникновения в клетку через рецептор к ангиотензин-превращающему ферменту 2 (ACE2), однако позже было обнаружено, что нейтрализация ACE2 рекомбинантными антителами не предотвращает заражение MERS-CoV [24].

Дальнейшие исследования патогенетических механизмов MERS выявили роль дипептидилпептидазы 4 (DPP4; также известной как CD26), служащей функциональным клеточным рецептором для MERS-CoV [26]. CD26/DPP4 представляет собой многофункциональный мембранный гликопротеин, который экспрессируется в большинстве типов клеток, в частности в Т-лимфоцитах, клетках слизистой оболочки бронхов и щеточной кайме проксимальных канальцев нефронов [25].

После обнаружения DPP4 были оставлены попытки экстраполировать известные сведения о патогенезе MERS на SARS-CoV-2, однако данные о молекулярных биологических свойствах SARS-CoV-1 остаются актуальными по сей день в рамках пандемии новой коронавирусной инфекции [21].

В современных исследованиях патогенеза SARS-CoV-2 ключевая роль отводится изучению природы дизрегуляторного иммунного ответа. Известно, что SARS-CoV-2 вызывает патологическое состояние «цитокинового шторма», результатом которого является неконтролируемый выброс более 150 цитокинов и хемокинов вследствие гиперактивации Т-клеток, макрофагов и НК-клеток. В работах многих авторов ряд цитокинов описываются как потенциальные прогностические факторы тяжелого течения. Пристальное внимание вызывают IFN α , IFN γ , TNF α , TNF-SF-10 (TRAIL), IL-18, IL-17A, IL-10, IL-6, IL-4, IL-1 α [22, 23, 28].

Одним из таких цитокинов является IFN γ , который рядом исследователей был изучен в рамках корреляции повышения его содержания с тяжестью течения SARS-CoV-2 [15, 23].

IFN γ представляет собой IFN II типа, он продуцируется натуральными киллерами (NK) и натуральными Т-клетками киллерами (NKT), которые являются эффекторными клетками врожденного иммунного ответа, CD8 и CD4 Th1 – эффекторными Т-клетками адаптивного иммунитета [29]. IFN γ играет значимую роль во врожденном и адаптивном иммунном ответе против вирусных и внутриклеточных бактериальных инфекций. IFN γ также участвует в регуляции опухолевых процессов [16]. Он повышает иммуногенность опухолевых клеток и стимулирует иммунный ответ против трансформированных клеток организма. Однако опухолевые клетки человека способны изменять свой рецепторный фенотип в целях уклонения от подобного регулирования, становясь невосприимчивыми к IFN γ [16]. Имеются данные о том, что у мышей с индуцированными генетическими нарушениями, приводящими к снижению выработки IFN γ , наблюдались снижение резистентности и повышение восприимчивости к инфекциям, вызванным внутриклеточными бактериями, включая микобактерии и сальмонеллы [18], внутриклеточным простейшим (включая *Toxoplasma* и *Leishmania*) и некоторым вирусам [12]. У подобных мышей также наблюдалась повышенная предрасположенность к опухолевым процессам, будь то искусственно индуцированные или возникающие естественным путем опухоли [16].

Значимость IFN γ для иммунной системы частично связана с его способностью напрямую ингибировать репликацию вируса путем инициации экспрессии интерферон-стимулируемых генов (ISG) с последующим синтезом белков обладающих противовирусной активностью, из которых наиболее ярким представителем является протеинкиназа R (PKR) – он ингибирует синтез вирусных белков, фосфорилируя альфа-субъединицу эукариотического фактора инициации трансляции (eIF-2). IFN γ также активирует продукцию цитокинов Т-клетками, усиливая цито-

токсическую активность Т-киллеров, но не менее важным является его иммуностимулирующее и иммуномодулирующее действие [17]. IFN γ прямо или косвенно активирует оба главных комплекса гистосовместимости (МНС) класса I и класса II за счет увеличения экспрессии субъединицы молекул МНС I и II класса [32], TAP1 (транспортер, связанный с антиген-процессорным белковым комплексом) и TAP2, инвариантной цепи (CD74), а также экспрессией и активацией протеасом [8]. IFN γ также способствует активации макрофагов за счет усиления фагоцитоза, стимулирования продукции провоспалительных цитокинов и сильнодействующих антибактериальных компонентов, в том числе супероксидных радикалов, оксида азота и пероксидов [21].

IFN γ выступает в роли поляризующего фактора среди первичного цитокинового окружения наивных CD4Т-клеток, стимулируя процесс дифференцировки Th0 в сторону Th1, опосредующих клеточный иммунитет против вирусных и внутриклеточных бактериальных инфекций [20]. Наивные CD8Т-клетки по умолчанию запрограммированы на дифференцировку в цитотоксические Т-лимфоциты, продуцирующие IFN γ , в то время как CD4Т-клетки могут дифференцироваться в гораздо более широкий ряд эффекторных клеток, из которых только CD4 Th1 продуцируют значимые концентрации IFN γ [19]. Процесс эффекторной дифференцировки зависит от характера инфекционного процесса, возбудителя и цитокинового окружения, которое формируется клетками врожденного иммунитета в ответ на чужеродный антиген [19, 29].

Однако описаны случаи, при которых стойкое повышение уровня IFN γ усугубляет системное воспаление, усиливает повреждение тканей при хронических аутоиммунных заболеваниях, таких как целиакия, рассеянный склероз, сахарный диабет, псориаз, буллезный эпидермолиз и ревматоидный артрит [30, 36]. Резюмирующая схема механизмов, в которых IFN γ играет ключевую роль, представлена на рисунке 1.

С целью получения объективной картины о механизмах и паттерне повышения IFN γ у тяжелых пациентов с COVID-19 и принимая во внимание описанную выше высокоспецифичную роль IFN γ в противовирусном иммунном ответе, проанализированы результаты ряда исследований, в которых содержание IFN γ в сыворотке крови соотносилось с тяжестью состояния пациентов.

В июле 2020 года исследовательская группа из Бразилии Gadotti A. и соавт. провели серию лабораторных исследований содержания IFN γ в образцах крови полученных у 56 пациентов, госпитализированных с диагнозом COVID-19, методом иммуноферментного анализа [15].

Средний возраст пациентов составлял 61 (47-73) год, 69,6% (n = 39) были мужчинами. Диагноз COVID-19 был подтвержден данными клини-

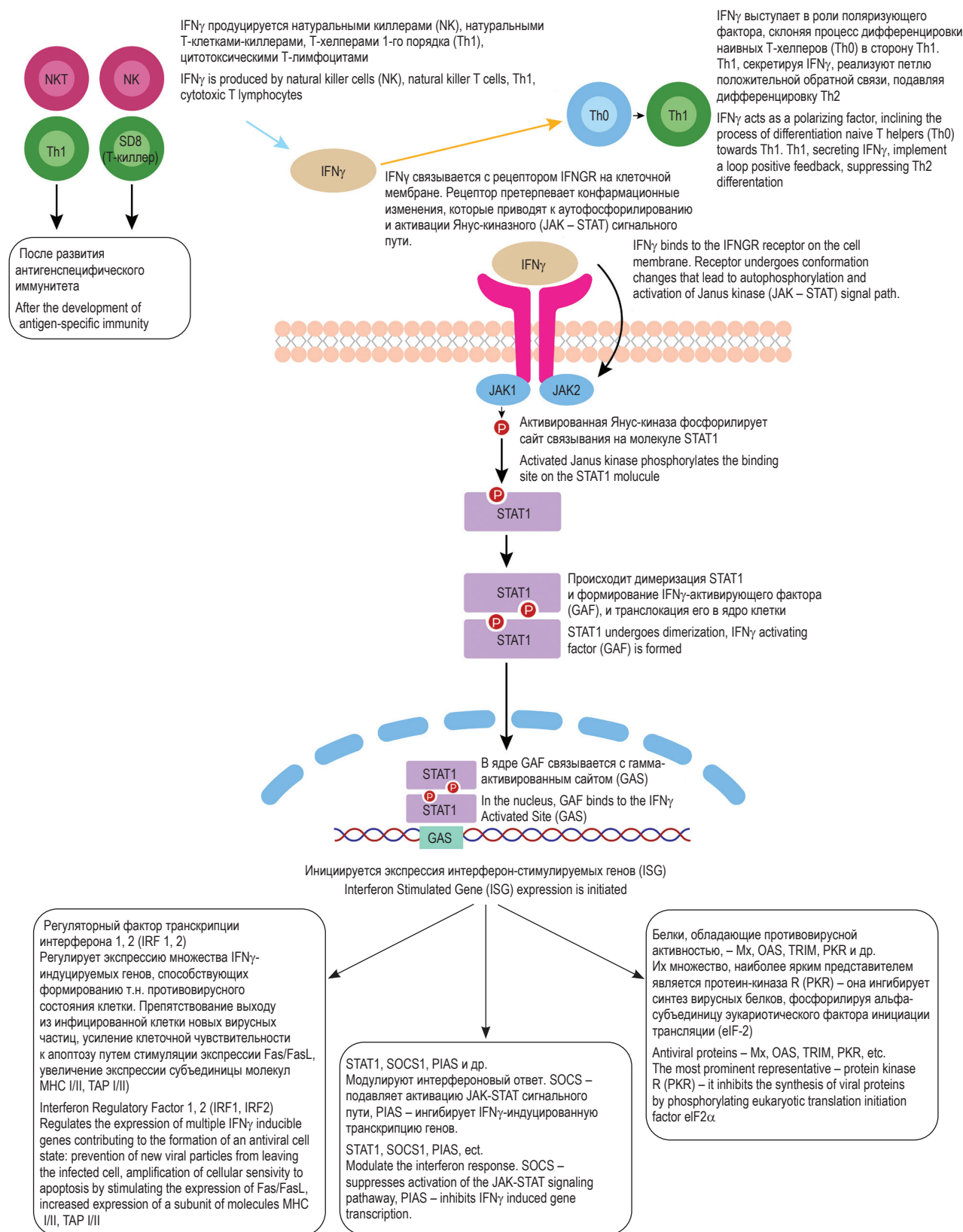


Рисунок 1. Роль IFN γ в противовирусном иммунном ответе

Figure 1. Role of IFN γ in the antiviral immune response

ко-рентгенологической картины и положительным результатом полимеразной цепной реакции (ПЦР) стандартизированного мазка из носоглотки на SARS-CoV-2. Критерием включения пациентов в исследование была госпитализация с подтвержденной инфекцией COVID-19 средней или тяжелой степени течения. Исследовательской группой к средней степени тяжести были отнесены пациенты с клиническими признаками пневмонии (лихорадка, кашель, одышка, учащенное дыхание), но без признаков тяжелого поражения легких и $SpO_2 \geq 90\%$. Тяжелое течение определялось по выраженности клинических признаков пневмонии (лихорадка, кашель, одышка, учащенное дыхание) и одним из следующих дополнительных признаков: частота дыхания > 30 вдохов/мин; дыхательная недостаточность или $SpO_2 < 90\%$. В результате исследования установлено, что значения медианы концентрации $IFN\gamma$ в группах умерших и выживших пациентов составили 323 и 208 пг/мл (межквартильный диапазон — МД 166-570 пг/мл и 155-392 пг/мл соответственно) при $p = 0,017$. Выявленные статистически достоверные высокие уровни $IFN\gamma$ в данной когорте пациентов ассоциированы с неблагоприятным исходом заболевания [15].

Стоит также отметить, что концентрация $IFN\gamma$ в сыворотке была повышена на ранних стадиях заболевания у пациентов с неблагоприятным исходом и составляла 394 пг/мл по медиане (229-575 пг/мл), в то время как у выздоровевших пациентов в последние дни болезни медиана концентрации $IFN\gamma$ была значительно ниже и составляла 162 пг/мл (МД 117-259 пг/мл), $p < 0,001$. Высокая концентрация $IFN\gamma$ стойко сохраняющаяся более 10 дней ассоциировалась с неблагоприятным исходом. Имеющиеся на сегодняшний день сведения о свойствах $IFN\gamma$ оказывать антипролиферативный эффект на Th2 и, как следствие, препятствовать становлению нормального адаптивного иммунного ответа [34] могут быть дополнены данными исследовательской группы из США Carolina Lucas и соавт. Они выявили, что концентрация IL-4 возрастает у тяжелых пациентов с 5-го по 20-й день нахождения в стационаре и достигает максимальных значений на момент смерти пациента [23]. Известные механизмы ингибирующего воздействия IL-4 на дифференцировку Th0 в Th1, и его особенность поляризовать иммунный ответ в сторону Th2 клеток могли бы объяснить причину снижения концентрации $IFN\gamma$ у пациентов с возрастающим уровнем IL-4, однако иммунологический механизм антагонизма этих двух цитокинов при COVID-19 остается неизвестным [19, 33, 35].

Как было сказано ранее, $IFN\gamma$ на этапе дифференцировки наивных Т-хелперов выступает в роли поляризующего фактора и стимулирует образование Th1, которые в свою очередь продуцируют еще больше $IFN\gamma$ по принципу поло-

жительной обратной связи [19]. Снижение концентрации $IFN\gamma$ у выздоравливающих пациентов на 10 день заболевания наиболее вероятно происходит под влиянием возрастающих концентраций IL-4, тем самым способствуя становлению нормального адаптивного иммунного ответа с последующей выработкой антител к SARS-CoV-2 и постепенной элиминации вируса из организма. Однако Gadotti A. и соавт. не исследовали концентрации IL-4, следовательно, данный вопрос требует дальнейшего изучения.

В другой работе, Sun D. и соавт. были изучены образцы крови 8 пациентов педиатрического госпиталя в Китайском городе Ухань в 2020 году [31].

Возраст пациентов варьировал от 2 месяцев до 15 лет. Наиболее частыми симптомами были одышка (8 из 8 пациентов), лихорадка и кашель (у 6 из 8 пациентов). Рентгенограмма грудной клетки показала множественные пятнистые тени у семи пациентов и непрозрачность по типу матового стекла у шести. Лабораторные данные общего анализа крови выходили за пределы референсных значений у 7 из 8 пациентов. Биохимический анализ крови выявил повышенный уровень С-реактивного белка, прокальцитонина, лактатдегидрогеназы у 6 из 8 пациентов, и АСТ/АЛТ у 4 из 8. Подсчет относительного числа (%) лимфоцитов методом проточной цитометрии выявил снижение CD16 и CD56 у 4 из 8 пациентов, а также увеличение CD3 у двух, CD4 у четырех и CD8 у одного из восьми пациентов. Концентрации цитокинов в сыворотке определялись методом ИФА, выявлено повышение IL-6 (2/8), IL-10 (5/8) и $IFN\gamma$ (2/8). Высокие концентрации $IFN\gamma$ всего у двух пациентов не являются статистически значимым, однако у данных пациентов в отличие от остальных 6 исследуемых развились осложнения: септический шок, полиорганная недостаточность, токсическая энцефалопатия и ДВС синдром. Как и в рассмотренном выше исследовании, высокие концентрации $IFN\gamma$ авторы ассоциируют с тяжелым течением COVID-19 [31].

Исследовательская группа Carolina Lucas и соавт. в сентябре 2021 года провели скрининг 151 пациента с тяжелым и среднетяжелым течением COVID19 [23].

В целях обнаружения потенциальных цитокиновых маркеров тяжелого течения, ими были изучены концентрации свыше 25 цитокинов в корреляции с уровнем вирусной нагрузки (ВН) в носоглотке и тяжестью состояния пациента. Было выявлено, что значение медианы концентрации $IFN\gamma$ у тяжелых пациентов было значительно выше по сравнению с результатами, полученными у пациентов средней тяжести, и возрастало по мере увеличения ВН и ухудшения состояния пациента, $p = 0,0019$.

Представляют интерес данные исследовательской группы из Саудовской Аравии, в которой Hindawi S.I. и соавт. были исследованы концен-

трации IFN γ у 375 пациентов с COVID-19, подтвержденным с помощью стандартизированного забора мазка из носоглотки методом реал-тайм ПЦР. Возраст пациентов составлял 18–69 лет, средний возраст 44,72 года, из них 65,6% мужчины и 34,4% женщины. Принципиальным отличием от предыдущих исследований являлся тот факт, что все пациенты проходили скрининг на паразитарные инфекции [6].

Распространенность паразитарных инфекций среди изученных больных COVID-19 составила 68,8%. Наиболее часто встречающимися паразитами были *Toxoplasma gondii* (22,4%), *Cryptosporidium* (19,7%), *Blastocystis hominis* (17,6%), *Giardia* (9,1%) и комбинированная инфекция *Cryptosporidium* + *Blastocystis hominis* + *Entamoeba histolytica* (6,1%). Исследователи обнаружили, что среди носителей паразитарных инфекций наблюдалось снижение заболеваемости и тяжести течения COVID-19, по сравнению с пациентами, у которых не были обнаружены паразитарные инфекции. Hindawi S.I. и соавт. приводят данные, что среди носителей паразитарных инфекций 72,8% пациентов переболели COVID-19 в легкой форме, и лишь у 20,7% наблюдалось тяжелое течение, $p < 0,001$. У пациентов со среднетяжелым течением обнаружили высокие концентрации IFN γ – 50,17 $\pm$ 8,24 пг/мл по значению медианы, в то время как у пациентов с тяжелым течением медиана концентрации составляла 9,17 $\pm$ 1,60 пг/мл, $p < 0,001$ [6].

Подобная информация о том, что люди, инфицированные паразитарными заболеваниями, переносят COVID-19 в легкой форме, встречалась неоднократно. В сентябре 2021 года Anyanwu M.U. сообщил о низкой заболеваемости COVID-19 в эндемичных для малярии регионах [7].

Однако опираться на эти данные затруднительно ввиду того, что вышеописанные паразитарные инфекции и малярия встречаются преимущественно в странах, в которых квалифицированная медицинская помощь и диагностика являются труднодоступными для населения, а сниженная заболеваемость в эндемичных для малярии регионах Африки может являться прямым следствием несовершенства диагностических методов или их отсутствия.

Приведены данные исследований, в ходе которых установлено, что высокие концентрации IFN γ наиболее вероятно ассоциированы с тяжелым течением COVID-19 и развитием осложнений. Однако другими исследовательскими группами обнаружено, что стойкий повышенный уровень IFN γ при наличии у пациентов паразитарных инфекций вызванных *Toxoplasma gondii*, *Cryptosporidium*, *Blastocystis hominis*, *Giardia duodenalis*, *Entamoeba histolytica* снижает риск тяжелого течения COVID-19. Среди носителей паразитарных инфекций 72,8% пациентов переболели COVID-19 в легкой форме и лишь у 20,7% наблюдалось тяжелое течение. В дополнение к

вышесказанному, представлена информация о низкой заболеваемости COVID-19 в эндемичных для малярии регионах.

Заключение

С 1980-х годов в протоколы лечения многих вирусных заболеваний включены препараты интерферона. После серии исследований, проведенных в НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, доказывающих клиническую эффективность в лечении гриппа комбинированной терапией с применением интерферона альфа и гамма [2], Сологуб Т.В., Цветков В.В. и соавт. констатировали, что включение рекомбинантного IFN γ в схему лечения пациентов с гриппом А (H1N1)pdm 09, без применения IFN α , способствует более быстрому купированию катаральных и респираторных симптомов заболевания и способствует сокращению сроков выздоровления и выписки из стационара [5]. Как следствие, у ряда исследователей возник интерес к клинической эффективности IFN γ , и уже в 2021 году появились сообщения о том, что его применение в комплексном лечении COVID-19 предположительно послужило фактором снижения длительности лихорадки и риска прогрессирования дыхательной недостаточности, а также способствовало сокращению сроков госпитализации на 2 суток [3].

При тяжелом течении COVID-19 актуальным является вопрос о природе стимуляции синтеза IFN γ с целью назначения корректной терапии, а также выяснения причин эндогенной стимуляции синтеза IFN γ . Наличие высоких концентраций IFN γ в сыворотке крови в редких случаях ассоциировано с благоприятным течением COVID-19, следовательно возникает вопрос о причине, по которой IFN γ не реализует свои известные на сегодняшний день функции противовирусного действия, заключающиеся во влиянии на дифференцировку наивных Т-хелперов, активации МНС I/II, способности ингибировать репликацию вирусных частиц и активировать продукцию цитокинов Т-клетками, усиливая цитотоксическую активность Т-киллеров, а также оказывать иммуностимулирующее и иммуномодулирующее действие [12, 19, 20, 33].

Предположительно, высокие концентрации эндогенного IFN γ не способны в полной мере реализовать свои функции противовирусного действия вследствие дефицита рецепторов к IFN γ CD119. Однако причина, по которой экзогенный IFN γ (препараты) и индукторы интерферона оказывают благоприятное влияние на течение COVID-19, в то время как эндогенная гиперпродукция IFN γ ассоциируется с тяжелым течением на сегодняшний день, выяснена не окончательно. В связи с этим представляет интерес сравнение клеточной продукции IFN γ и его соотношение с общим содержанием IFN γ в сыворотке, а также анализ степени экспрессии рецепторов к IFN γ CD119.

Список литературы / References

1. 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., Pevtcov 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.
2. Ершов Ф.И. Применение интерферонов 1-го и 2-го типов при вирусных инфекциях // Вопросы вирусологии, 2013. № S1. С. 145-154. [Ershov F.I. The interferons 1 and 2 types in viral infections. *Voprosy virusologii = Problems of Virology*, 2013, no. S1, pp. 145-154. (In Russ.)]
3. Мясников А.Л., Бернс С.А., Талызин П.А., Ершов Ф.И. Интерферон гамма в терапии пациентов с COVID-19 среднетяжелого течения // Вопросы вирусологии, 2021. Т. 66, № 1. С. 47-54. [Myasnikov A.L., Berns S.A., Talyzin P.A., Ershov F.I. Interferon gamma in the treatment of patients with moderate COVID-19. *Voprosy virusologii = Problems of Virology*, 2021. Vol. 66, no. 1, pp. 47-54. (In Russ.)]
4. Симбирцев А.С. Цитокины в патогенезе и лечении заболеваний человека. СПб.: Фолиант, 2018. 512 с. Simbirtsev A.S. Cytokines in the pathogenesis and treatment of human diseases. St. Petersburg: Foliant, 2018. 512 p.
5. Сологуб Т.В., Мидикари А.С., Агафонов В.Н., Суздальцев А.А., Цветков В.В. Эффективность и целесообразность использования рекомбинантного интерферона гамма в комплексной терапии больных гриппом А(Н1N1)pdm09 // Эпидемиология и инфекционные болезни, 2017. Т. 22, № 2. С. 58-63. [Sologub T.V., Midikari A.S., Agafonov V.N., Suzdalcev A.A., Tsvetkov V.V. Efficiency and performance of use of recombinant interferon gamma in complex therapy of patients with influenza A(H1N1)pdm09. *Epidemiologiya i infektsionnye bolezni = Epidemiology and infectious Diseases, Russian Journal*. 2017, Vol. 22, no. 2, pp. 58-63. (In Russ.)].
6. Abdel-Hamed E.F., Ibrahim M.N., Mostafa N.E., Moawad H., Elgammal N.E., Darwiesh E.M., El-Rafey D.S., ElBadawy N.E., Al-Khoufi E.A., Hindawi S.I. Role of interferon gamma in SARS-CoV-2-positive patients with parasitic infections. *Gut Pathog.*, 2021, Vol. 13, 29. doi: 10.1186/s13099-021-00427-3.
7. Anyanwu M. The association between malaria prevalence and COVID-19 mortality. *BMC Infectious Diseases*, 2021, Vol. 21, 975. doi: 10.1186/s12879-021-06701-8.
8. Billiau A. Interferon- γ : biology and role in pathogenesis. *Adv. Immunol.*, 1996, pp. 61-130.
9. Boehm U., Klamp T., Groot M., Howard J. C. Cellular responses to interferon-gamma. *Ann. Rev. Immunol.*, 1997, Vol. 15, no. 1, pp. 749-795.
10. Chan-Yeung M., Xu R.H. SARS: epidemiology. *Respirology*, 2003, Vol. 8, no. s1, pp. S9-S14.
11. Coronavirus Disease (COVID-19) Situation Reports [online]. Who.int. 2022. Available at: <https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/situation-reports> (accessed: March 7, 2022).
12. Dalton D.K., Pitts-Meek S., Keshav S., Figari I.S., Bradley A., Stewart T.A. Multiple defects of immune cell function in mice with disrupted interferon-gamma genes. *Science*, 1993, Vol. 259, no. 5102, pp. 1739-1742.
13. Davidson A., Wysocki J., Batlle D. Interaction of SARS-CoV-2 and other coronavirus with ACE (Angiotensin-Converting Enzyme)-2 as their main receptor. *Hypertension*, 2020, Vol. 76, no. 5, pp. 1339-1349.
14. Distribution of confirmed cases of MERS-CoV by place of infection and month of onset, from March 2012 to 2 December 2019 [online]. European Centre for Disease Prevention and Control. 2019. Available at: <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/distribution-confirmed-cases-mers-cov-place-infection-and-month-onset-march-2012> (accessed: February 7, 2022).
15. Gadotti A.C., de Castro Deus M., Telles J.P., Wind R., Goes M., Garcia Charello Ossoski R., de Padua A.M., de Noronha L., Moreno-Amaral A., Baena C.P., Tuon F.F. IFN- γ is an independent risk factor associated with mortality in patients with moderate and severe COVID-19 infection. *Virus Res.*, 2020, Vol. 289, 198171. doi: 10.1016/j.virusres.2020.198171.
16. Ikeda H., Old L., Schreiber R. The roles of IFN γ in protection against tumor development and cancer immunoediting. *Cytokine Growth Factor Rev.*, 2002, Vol. 13, no. 2, pp. 95-109.
17. Jorgovanovic D., Song M., Wang L., Zhang Y. Roles of IFN- γ in tumor progression and regression: a review. *Biomark. Res.*, 2020, Vol. 8, 49. doi: 10.1186/s40364-020-00228-x.
18. Jouanguy E., Döffinger R., Dupuis S., Pallier A., Altare F., Casanova J.L. IL-12 and IFN- γ in host defense against mycobacteria and salmonella in mice and men. *Curr. Opin. Immunol.*, 1999, Vol. 11, no. 3, pp. 346-351.
19. Kaiko G.E., Horvat J.C., Beagley K.W., Hansbro P.M. Immunological decision-making: how does the immune system decide to mount a helper T-cell response? *Immunology*, 2008, Vol. 123, no. 3, pp. 326-338.
20. Levy D.E., Garcia-Sastre A. The virus battles: IFN induction of the antiviral state and mechanisms of viral evasion. *Cytokine Growth Factor Rev.*, 2001, Vol. 12, no. 2-3, pp. 143-156.
21. Li W., Zhang C., Sui J., Kuhn J.H., Moore M.J., Luo S., Wong S.K., Huang I.C., Xu K., Vasilieva N., Murakami A., He Y., Marasco W.A., Guan Y., Choe H., Farzan M. Receptor and viral determinants of SARS-coronavirus adaptation to human ACE2. *EMBO J.*, 2005, Vol. 24, no. 8, pp. 1634-1643.
22. Liu B.M., Martins T.B., Peterson L.K., Hill H.R. Clinical significance of measuring serum cytokine levels as inflammatory biomarkers in adult and pediatric COVID-19 cases: A review. *Cytokine*, 2021, Vol. 142, 155478. doi: 10.1016/j.cyto.2021.155478.
23. Lucas C., Wong P., Klein J., Castro Tiago B.R., Silva J., Sundaram M., Ellingson M.K., Mao T., Oh J.E., Israelow B., Takahashi T., Tokuyama M., Lu P., Venkataraman A., Park A., Mohanty S., Wang H., Wyllie A.L., Vogels

Chantal B.F., Earnest R., Lapidus S., Ott I.M., Moore A.J., Muenker M.C., Fournier J.B., Campbell M., Odio C.D., Casanovas-Massana A., Yale IMPACT Team, Herbst R., Shaw A.C., Medzhitov R., Schulz W.L., Grubaugh N.D., Dela Cruz C., Farhadian S., Ko A.I., Omer S.B., Iwasaki A. Longitudinal analyses reveal immunological misfiring in severe COVID-19. *Nature*, 2020, Vol. 584, no. 7821, pp. 463-469.

24. Müller M.A., Raj V.S., Muth D., Meyer B., Kallies S., Smits S.L., Wollny R., Bestebroer T.M., Specht S., Suliman T., Zimmermann K., Binger T., Eckerle I., Tschapka M., Zaki A.M., Osterhaus A.D., Fouchier R.A., Haagmans B.L., Drosten C. Human coronavirus EMC does not require the SARS-coronavirus receptor and maintains broad replicative capability in mammalian cell lines. *mBio*, 2012, Vol. 3, no. 6, e00515-12. doi: 10.1128/mbio.00515-12.

25. Ohnuma K., Haagmans B.L., Hatano R., Raj V.S., Mou H., Iwata S., Dang N.H., Bosch B.J., Morimoto C. Inhibition of middle east respiratory syndrome coronavirus infection by Anti-CD26 monoclonal antibody. *J. Virol.*, 2013, Vol. 87, no. 24, pp. 13892-13899.

26. Raj V.S., Mou H., Smits S., Dekkers D., Müller M., Dijkman R., Muth D., Demmers J., Zaki A., Fouchier R., Thiel V., Drosten C., Rottier P., Osterhaus A., Bosch B., Haagmans B. Dipeptidyl peptidase 4 is a functional receptor for the emerging human coronavirus-EMC. *Nature*, 2013, Vol. 495, no. 7440, pp. 251-254.

27. Roberts A., Thomas W.D., Guarner J., Lamirande E.W., Babcock G.J., Greenough T.C., Vogel L., Hayes N., Sullivan J.L., Zaki S., Subbarao K., Ambrosino D.M. Therapy with a severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus-neutralizing human monoclonal antibody reduces disease severity and viral burden in golden syrian hamsters. *J. Infect. Dis.*, 2006, Vol. 193, no. 5, pp. 685-692.

28. Samprathi M., Jayashree M. Biomarkers in COVID-19: An up-to-date review. *Front. Pediatr.*, 2021, Vol. 8, 607647. doi:10.3389/fped.2020.607647.

29. Schoenborn J., Wilson C. Regulation of interferon- γ during innate and adaptive immune responses. *Adv. Immunol.*, 2007, Vol. 96, p. 41-101.

30. Skurkovich B., Skurkovich S. Anti-interferon-gamma antibodies in the treatment of autoimmune diseases. *Curr. Opin. Mol. Ther.*, 2003, Vol. 5, no. 1, pp. 52-57.

31. Sun D., Li H., Lu X., Xiao H., Ren J., Zhang F., Liu Z. Clinical features of severe pediatric patients with coronavirus disease 2019 in Wuhan: a single center's observational study. *World J. Pediatr.*, 2020, Vol. 16, no. 3, pp. 251-259.

32. Thelemann C., Eren R.O., Coutaz M., Brasseit J., Bouzourene H., Rosa M., Duval A., Lavanchy C., Mack V., Mueller C., Reith W., Acha-Orbea H. Interferon- γ induces expression of MHC class II on Intestinal Epithelial Cells and Protects Mice from Colitis. *PLoS One*, 2014, Vol. 9, no. 1, e86844. doi:10.1371/journal.pone.0086844.

33. Torres K., Dutra W., Gollob K. Endogenous IL-4 and IFN- γ are essential for expression of Th2, but not Th1 cytokine message during the early differentiation of human CD4⁺ T helper cells. *Hum. Immunol.*, 2004, Vol. 65, no. 11, pp. 1328-1335.

34. Wensky A., Garibaldi Marcondes M., Lafaille J. The Role of IFN- γ in the Production of Th2 Subpopulations: Implications for Variable Th2-Mediated Pathologies in Autoimmunity. *J. Immunol.*, 2001, Vol. 167, no. 6, pp. 3074-3081.

35. Wurtz O., Bajénoff M., Guerder S. IL-4-mediated inhibition of IFN- γ production by CD4⁺ T cells proceeds by several developmentally regulated mechanisms. *Int. Immunol.*, 2004, Vol. 16, no. 3, pp. 501-508.

36. Yin K., Gribbin E., Wang H. Interferon-gamma inhibition attenuates lethality after cecal ligation and puncture in rats: implication of high mobility group box-1. *Shock*, 2005, Vol. 24, no. 4, pp. 396-401.

Авторы:

Артамонов А.А. — студент ФГБВОУ ВО «Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова», Санкт-Петербург, Россия

Никитин Ю.В. — врач — аллерголог-иммунолог центра клинической лабораторной диагностики, преподаватель кафедры клинической биохимии и лабораторной диагностики ФГБВОУ ВО «Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова», Санкт-Петербург, Россия

Мешкова М.Е. — к.б.н., старший преподаватель кафедры клинической биохимии и лабораторной диагностики ФГБВОУ ВО «Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова», Санкт-Петербург, Россия

Иванов А.М. — д.м.н., профессор, член-корр. РАН, заведующий кафедрой клинической биохимии и лабораторной диагностики ФГБВОУ ВО «Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова», Санкт-Петербург, Россия

Authors:

Artamonov A.A., Student, S.M. Kirov Military Medical Academy, St. Petersburg, Russian Federation

Nikitin Yu.V., Clinical Allergologist-Immunologist, Center of Clinical Laboratory Diagnostics; Lecturer, Department of Clinical Biochemistry and Laboratory Diagnostics, S.M. Kirov Military Medical Academy, St. Petersburg, Russian Federation

Meshkova M.E., PhD (Biology), Senior Lecturer, Department of Clinical Biochemistry and Laboratory Diagnostics, S.M. Kirov Military Medical Academy, St. Petersburg, Russian Federation

Ivanov A.M., PhD, MD (Medicine), Professor, Corresponding Member, Russian Academy of Sciences, Head, Department of Clinical Biochemistry and Laboratory Diagnostics, S.M. Kirov Military Medical Academy, St. Petersburg, Russian Federation

Поступила 17.05.2022

Отправлена на доработку 27.06.2022

Принята к печати 29.07.2022

Received 17.05.2022

Revision received 27.06.2022

Accepted 29.07.2022

ОСТЕОИММУНОЛОГИЯ: МЕЖДИСЦИПЛИНАРНЫЙ ПОДХОД К ИЗУЧЕНИЮ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ КЛЕТОК ИММУННОЙ СИСТЕМЫ И КОСТНОЙ ТКАНИ

Ширинский В.С., Ширинский И.В.

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии»,
г. Новосибирск, Россия

Резюме. В обзоре представлены молекулярные и клеточные механизмы взаимодействия клеток иммунной системы и кости, объединенные понятием «остеоиммунология», при физиологических условиях и некоторых патологических состояниях. Дана краткая характеристика основных клеток костной ткани (остеобласты, остеокласты, остециты), макрофаги костного мозга, остеомаки, описано их влияние на иммунокомпетентные клетки при моделировании и ремоделировании кости. Представлены данные о молекулярных механизмах регуляции клетками кости содержания и активности стволовых кроветворных клеток, Т- и В-лимфоцитов, макрофагов, формирования «эндостальной ниши». Описано ключевое звено гомеостаза костной ткани — лиганд-рецепторная система RANK/RANKL/OPG, непосредственно регулирующее дифференцировку остеокластов и разрушение кости, представлены данные об участии этой системы в созревании и активности различных субпопуляций Т-лимфоцитов и В-клеток. Представлены данные о многостороннем влиянии Т-лимфоцитов, В-лимфоцитов, дендритных клеток, различных субпопуляции макрофагов, Treg, NK-клеток, нейтрофилов на дифференцировку и функциональную активность остеобластов и остеокластов, способствующему накоплению и поддержанию костной массы. Охарактеризованы механизмы этого влияния, связанные с контактным взаимодействием и/или с помощью продукции различных медиаторов, многообразных внутриклеточных сигнальных молекул. Подробно описаны взаимодействие клеток костной ткани и клеток иммунной системы, молекулярные механизмы этого взаимодействия при воспалении. Приводится краткая характеристика некоторых заболеваний, при которых сочетанные нарушения функции клеток иммунной системы и клеток кости играют решающую роль в развитии болезни (переломы кости, ревматоидный артрит и пародонтоз, постменопаузальный остеопороз, множественная миелома). Показано, что у больных РА и пародонтозом деструктивное воспаление кости, которое завершается потерей массы кости, характеризуется сходными патофизиологическими механизмами с участием иммунокомпетентных клеток и клеток костной ткани. Считается, что для этих заболеваний необходимы новые стратегии лечения, направленные не только на ингибирование провоспалительных цитокинов, но и процессы повышенной резорбции костей. Описано участие активированных Т-клеток, их цитокинов в патогенезе постменопаузального остеопороза, что позволило предложить в 2018 году термин «иммунопороз». Дана характеристика взаимодействия опухолевых клеток больных миеломой с клетками микроокружения костного мозга, которое осуществляется в результате контактного взаимодействия или действия растворимых факторов с остеокластами, стро-

Адрес для переписки:

Ширинский Иван Валерьевич
ФГБНУ «Научно-исследовательский институт
фундаментальной и клинической иммунологии»
630047, Россия, г. Новосибирск, ул. Залесского, 6.
Тел.: 8 (913) 018-61-16.
E-mail: ivan.shirinsky@gmail.com

Address for correspondence:

Shirinsky Ivan V.
Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology
630047, Russian Federation, Novosibirsk, Zalesky str., 6.
Phone: 7 (913) 018-61-16.
E-mail: ivan.shirinsky@gmail.com

Образец цитирования:

В.С. Ширинский, И.В. Ширинский «Остеоиммунология: междисциплинарный подход к изучению взаимодействия клеток иммунной системы и костной ткани» // Медицинская иммунология, 2022. Т. 24, № 5. С. 911-930.
doi: 10.15789/1563-0625-OAI-1521
© Ширинский В.С., Ширинский И.В., 2022

For citation:

V.S. Shirinsky, I.V. Shirinsky "Osteoimmunology: an interdisciplinary approach to studying the relationships between immune and bone cells", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2022, Vol. 24, no. 5, pp. 911-930.
doi: 10.15789/1563-0625-OAI-1521
DOI: 10.15789/1563-0625-OAI-1521

мальными клетками и остеобластами. В результате этих взаимодействий происходит развитие остеопороза, потеря костной массы, расширение и прогрессирование миеломы. Заключается, что тесное взаимодействие клеток иммунной системы и костной ткани представляет собой неразрывное целое и это определяет перспективу выявления новых терапевтических мишеней в лечении костных заболеваний и заболеваний иммунной системы.

Ключевые слова: остеоиммунология, остеобласты, остеокласты, остеоциты, лимфоциты, цитокины, дендритные клетки, кость, воспаление, ревматоидный артрит, пародонтит, остеопороз, миелома

OSTEOIMMUNOLOGY: AN INTERDISCIPLINARY APPROACH TO STUDYING THE RELATIONSHIPS BETWEEN IMMUNE AND BONE CELLS

Shirinsky V.S., Shirinsky I.V.

Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

Abstract. In this review, we discuss molecular and cellular mechanisms underlying cross-talk between immune cells and bone cells, both in healthy conditions and in some diseases. We provide short description of the main cell populations of bone tissue, i.e., osteoblasts, osteoclasts, osteocytes, bone marrow macrophages, OsteoMacs, and their effects on immune cells during bone modeling and remodeling. The data are presented on regulatory molecular pathways of bone marrow cell activity, T and B cells, macrophages, and formation of “endosteal niche” by the bone cells. We describe the key system of bone tissue homeostasis: RANK/RANKL/OPG, which regulates differentiation of osteoclasts and bone destruction. In addition, RANK/RANKL/OPG system modulates maturation and activity of various T and B cell subsets. We present the data on pleiotropic effects of T cells, B cells, dendritic cells, macrophage subpopulations, Tregs, NK cells, neutrophils upon differentiation and function of osteoblasts and osteoclasts. These effects promote accumulation and maintenance of the bone mass. We describe mechanisms of these effects based on direct cell-to-cell contacts and various soluble mediators and intracellular signaling pathways. A brief characteristic of some diseases is provided with concomitant dysfunction of immune cells and bone cells which play a decisive pathogenetic role (fractures, rheumatoid arthritis, periodontitis, postmenopausal osteoporosis, multiple myeloma). It was shown that the destructive bone inflammation, both in RA and periodontitis, leads to loss of bone mass, being featured by similar pathophysiological mechanisms involving immune and bone cell populations. Therapy of these diseases requires newer treatment strategies aimed not only at pro-inflammatory cytokines, but for increased bone resorption. We describe involvement of activated T cells, their cytokines into the pathogenesis of postmenopausal osteoporosis, thus providing a rationale for the novel term of “immunoporosis”, coined in 2018. The relationships between multiple myeloma cells and bone marrow microenvironment are provided. This cross-talk is based on contact cell-cell interactions, as well as due to effects of soluble mediators upon osteoclasts, stromal cells, and osteoblasts. These effects result in osteolysis, loss of bone mass, and myeloma progression. In conclusion, the relationships between the immune and bone cell populations suggest that they function as an entire regulatory system. This consideration provides a framework for the development of new therapeutic targets for the treatment of bone and immune system disorders.

Keywords: osteoimmunology, osteoblasts, osteoclasts, osteocytes, lymphocytes, cytokines, dendritic cells, bone, inflammation, rheumatoid arthritis, periodontitis, osteoporosis, myeloma

Введение

В последние годы стало известно, что функция кости, помимо классической роли в движении, защите жизненно важных органов и в регуляции гомеостаза кальция и фосфата, включает в себя несколько «неожиданных» функций. Клетки кости участвуют в регуляции метаболизма глюкозы,

расхода энергии [49, 66, 171], мужской фертильности и когнитивных функций, секреции остеокальцина [164]. Предполагается, что клетки костной ткани могут контролировать функции клеток других тканей и, в свою очередь, находиться под их влиянием.

В начале 70-х гг. прошлого столетия появились первые доказательства наличия тесной свя-

зи между иммунной системой и костной тканью. Horton и соавт. показали, что клетки иммунной системы выделяют медиаторы, которые стимулируют функцию остеокластов и приводят к усилению резорбции кости [63]. В 90-х годах прошлого столетия была установлена роль системы RANKL/RANK/OPG (сигнальные молекулы: receptor activator of nuclear factor (NF)- κ B-ligand (RANKL) / receptor activator of NF- κ B (RANK) / soluble decoy receptor osteoprotegerin (OPG)) в регуляции функции остеокластов и в ремоделировании костной ткани [30]. Эти основополагающие данные позволили в 2000 г. американским ученым Arron J.R. и Choi Y. [9] предложить термин «Остеоиммунология», который выделил новую область научных знаний, изучающую закономерности взаимодействия клеток иммунной системы с клетками кости в норме и патологии. Большинство исследований, связанных с изучением связи между клетками кости и иммунной системой, появились не так давно и сосредоточены на оценке влияния клеток иммунной системы, их медиаторов на физиологию остеокластов. Это не случайно, поскольку остеокласты имеют общее происхождение с иммунокомпетентными клетками. И те, и другие происходят из гемопоэтических стволовых клеток костного мозга [161]. Предшественники остеокластов обнаружены в периферической крови, и их количество существенно увеличивается при воспалении, под влиянием повышенного содержания TNF α [162, 169].

Установлено, что перекрестная связь между иммунной системой и костью является двусторонней, а это означает, что костные клетки также влияют на клетки иммунной системы [124]. Исследования в области остеоиммунологии выявили важную роль факторов иммунитета в патологии костной системы человека и по новому осмыслить патогенез различных заболеваний скелета (ревматоидный артрит, остеопороз, пародонтит и др.) [53, 89, 143]. Стало очевидно, что изучение иммунных реакций в патогенезе костной патологии не менее актуально, чем в патогенезе инфекционных, аутоиммунных, аллергических заболеваний. Более того, остеоиммунология с каждым годом пополняется новыми сведениями о механизмах развития заболеваний скелета и открывает перспективы для их профилактики и лечения. В обзоре будут представлены основные этапы становления остеоиммунологии и данные о последних достижениях с целью получения современной информации о молекулярном взаимодействии клеток иммунной системы и костной ткани. Мы полагаем, что эти сведения будут способствовать привлечению внимания исследователей к этой области знаний и разработки новых

методов лечения большой группы заболеваний с поражением костей и иммунной системы.

Биология клеток костной ткани — основные сведения

До недавнего времени кость рассматривалась как статичная ткань, выполняющая функцию простого «каркаса» для других органов. Напомним, что ткань кости состоит из двух частей: компактной и губчатой. Компактная кость выполняет функцию структурной опоры для устойчивости и движений тела, а также резервуара для кальция и других химических элементов. Компактное вещество формирует корковый слой большинства костей, его первичной структурно-функциональной единицей является остеон [39]. Губчатое вещество — трабекулярная, высокопористая сеть костей, в которой находится красный и белый костный мозг, место кроветворения [39]. Обе области костной ткани зависят от активности трех основных типов клеток: остеокластов (ОК), остеобластов (ОБ) и остеоцитов, причем последние составляют около 95% от общей популяции клеток [91].

Стало известно, что кость чрезвычайно динамична, подвергаясь непрерывным циклам моделирования во время роста организма и ремоделирования в зрелом возрасте, что в итоге гарантирует адекватные механические свойства и правильную форму кости [24]. Моделирование и ремоделирование кости происходит с участием остеокластов, которые резорбируют кость, остеобластов, участвующих в образовании матрикса кости, и остеоцитов, которые являются бывшими остеобластами, располагающимися в костном матриксе и контролирующими физиологию кости. Процесс ремоделирования кости происходит в 4 этапа: 1-й — латентная фаза: клетки выстилки кости активируются остеоцитами, начинается дифференцировка остеокластов и обнажается поверхность кости; 2-й — фаза активации: остеокласты разрушают часть кости, оставшуюся открытой под клетками выстилки кости, формируя лауну. Затем они отделяются от кости и подвергаются апоптозу; 3-й — обратная фаза: макрофагоподобные клетки мигрируют в образовавшуюся в результате резорбции лауну, очищают ее от элементов разрушенного матрикса и секретируют медиаторы, которые способствуют активации остеобластов в лакуне; 4-й — фаза формирования: самая продолжительная фаза ремоделирования кости, продолжающаяся до 6 месяцев. Остеобласты, заполняющие лауну резорбции, начинают нарабатывать органический остеоидный матрикс, который затем минерализуется [24, 125]. В последней фазе остеобласты могут подвергаться апоптозу или встраиваться в костную основу, трансформируясь в остеоциты [25]. Мо-

делирование и ремоделирование костей очень схожи по механизмам и участвующим в них клеткам. Принципиальное отличие состоит в том, что моделирование происходит во время роста организма и заживлении переломов, что обеспечивает накопление костной массы, тогда как ремоделирование происходит у взрослого человека. В последнем случае масса кости не меняется, при этом сохраняются ее механические свойства за счет постоянного обновления костного матрикса. Это довольно упрощенное описание «нормального» моделирования / ремоделирования кости. В последнее время стало известно, что число молекулярных и клеточных факторов, участвующих в наращивании и поддержании костной массы, намного больше, чем было известно ранее. Среди этих факторов основными являются клетки и медиаторы иммунной системы, играющие важную роль в физиологии клеток костной ткани.

Взаимодействие клеток кости и иммунной системы

Остеобласты

Основополагающая работа, демонстрирующая тесную связь между костью и кроветворными тканями, появилась в 2003 году [22]. Авторы показали, что у мышей, генетически модифицированных по уровню конститутивно активного рецептора паратгормона (PTH/PTHrP) в остеобластах, увеличивается число гемопоэтических стволовых клеток (HSC). Это было связано с увеличением экспрессии на остеобластах лиганда Jagged1, который в свою очередь реализовал описанный эффект путем активации рецептора Notch1 (трансмембранный рецепторный белок). По мнению авторов исследования, цепь событий выглядит следующим образом [22]: остеокласты уменьшают самонаведение HSC за счет увеличения секреции катепсина К, который разрушает хемокин, синтезируемый стромальными клетками (Stromal cell-derived factor-1 — SDF1), ростовой фактор стволовых клеток (SCF) и остеопонтин (OPN), уменьшая в костной нише количество HSC-сайтов связывания, которые вызывают иммобилизацию HSC. Остеобласты после стимуляции проостеобластогенными факторами, такими как паратиреоидный гормон (PTH), экспрессируют лиганд Jagged1, который связывает рецептор NOTCH1 на HSC и позволяет им приживаться и выживать в эндостальной нише. В-клетки и клетки кости взаимодействуют несколькими способами. Например, остеобласты продуцируют IL-7 и хемокин CXCL12, которые необходимы для выживания и активности В-клеток [22]. Zhang и соавт. обнаружили прямую корреляцию между содержанием субпопуляций остеобластов, называемых N-кадгерином⁺ CD45⁺ остеобластами (SNO) и количеством HSC. Более

того, было обнаружено, что длительно живущие HSC связаны с SNO по N-кадгерин / β -катенин-зависимому механизму [174]. Эти данные убедительно свидетельствуют о том, что остеобласты играют решающую роль в регуляции HSC, формируя в костном мозге так называемую «эндостальную нишу», помимо хорошо известной сосудистой ниши [177].

Было показано, что остеобласты вносят весомый вклад в выделение и дифференцировку В-лимфоцитов из гемопоэтических стволовых клеток [178]. В частности, у мышей, подвергнутых условной абляции остеобластов, дифференцировка В-лимфоцитов была нарушена из-за отсутствия перехода от Rag2 (recombination activation genes) к Rag2 коммитированным лимфоидным предшественникам. Этот эффект был связан с секрецией остеобластами IL-7 и хемокинового лиганда SDF 1. Предполагается, что эти два цитокина играют важную роль в дифференцировке В-лимфоцитов [43, 103]. Что касается влияния клеток иммунной системы на дифференцировку и функцию ОБ, то мы отсылаем заинтересованного читателя к обзору [124], в котором подробно анализируются данные литературы по этому вопросу. Следует однако указать, что провоспалительные цитокины (IL-6, IL-17, IFN γ) уменьшают дифференцировку и активность ОБ, тогда как IL-11 способствует увеличению активности ОБ [124].

Остеоциты

Остеоциты (ОЦ) — основные продуценты RANKL в костной ткани и предполагается, что они могут влиять на клетки иммунной системы. Было установлено, что синтезируемый остеоцитами RANKL способствует усиленному остеокластогенезу и потере костной массы, наблюдаемым в условиях дефицита эстрогена. Помимо этого, делеция гена RANKL в остеоцитах предотвращала увеличение образования В-клеток, вызванное уменьшением содержания эстрогенов [50]. В подтверждение взаимосвязи между остеоцитами и клетками иммунной системы Sato и соавт. обнаружили, что *in vivo* удаление остеоцитов приводит к лимфопении, вызванной потерей стромы, поддерживающей лимфоидный росток в тимусе и костном мозге. Восстановление клеток стромы ассоциируется с увеличением популяции остеоцитов [134].

Остеокласты

Было показано, что остеокласты регулируют формирование и функционирование ниши HSC как прямо, так и опосредованно через остеобласты. Остеокласты могут увеличивать мобилизацию HSC, секретируя катепсин К, который расщепляет SDF1, остеопонтин (OPN) и фактор стволовых клеток (SCF), лишая костную нишу

сайтов связывания HSC. Вследствие этого HSC больше не находятся в состоянии покоя и перераспределяются в кровоток [80]. Было показано, что у мышей линии *oc/oc* (модель остеосклероза), которые имеют инактивирующую мутацию в Т-клетках и лишены активности остеокластов [139], регистрируется увеличение фракции мезенхимальных стволовых клеток (МСК). Однако, несмотря на большее количество предшественников, МСК меньше дифференцируются в остеобласты, что нарушает опосредованную остеобластами миграцию HSC в костные ниши [97]. Кроме того, у мышей линии *oc/oc* наблюдается измененный В-лимфопоэз, который блокируется на стадии про-В-клеток. Это приводит к уменьшению числа зрелых В-лимфоцитов, снижению активации Т-лимфоцитов и может вызывать формирование В-Т-лимфоцитарного иммунодефицита [13].

Известно, что дифференцировка остеокластов строго зависит от кооперации RANKL/RANK [86, 141]. RANKL, взаимодействуя со своим рецептором RANK, экспрессируемым предшественниками остеокластов, рекрутирует ряд TNFR-ассоциированных факторов (TRAF), которые, в свою очередь, инициируют дифференцировку остеокластов и стимулируют ядерную транслокацию NF- κ B, транскрипционный фактор AP1 (activating protein-1) и кальциневрин-зависимый 1 ядерный фактор активированных Т-клеток (NFATc1) [48]. Эти факторы стимулируют транскрипцию нескольких генов, специфичных для остеокластов, таких как тартрат-резистентная кислотная фосфатаза (TRACP), рецептор кальцитонина, катепсин К, OSTeoclast Associated Receptor (OSCAR), интегрин альфа V β 3, матриксная металлопротеиназа (MMP) 9, специфический трансмембранный белок (DC-STAMP), который участвует в слиянии остеокластов [24]. Следует отметить, что RANKL также синтезируется активированными Т-лимфоцитами в виде растворимой формы и экспрессируется в лимфатических узлах и тимусе. Его значение в реакциях иммунитета было установлено в исследованиях на мышах, лишенных RANKL. У животных был выявлен остеопетроз вследствие отсутствия остеокластов, а также иммунологические дефекты, связанные с нарушением развития лимфоцитов и отсутствием полноценного формирования лимфатических узлов [170]. RANK также необходим для развития остеокластов и лимфатических узлов, поскольку у мышей с нокаутом RANK развивался остеопетроз, отсутствовали периферические лимфатические узлы и снижалось содержание В- и Т-лимфоцитов в периферической крови [41]. OPG представляет собой рецептор-«ловушку» для RANKL. Он принадлежит к суперсемейству ре-

цепторов TNF и предотвращает взаимодействие RANKL с его рецептором RANK, что в конечном итоге приводит к ингибированию образования остеокластов [141]. Примечательно, что не только остеобласты, но и В-лимфоциты продуцируют OPG, регулируя остеокластогенез [17].

Тесная взаимосвязь между костью и иммунной системой была показана в работе Takayanagi H. в 2007 году [149]. Авторы выявили, что мыши с дефицитом иммунорецепторного тирозинового мотива активации (ITAM), Fc γ R рецептора и ДНК-активирующего белка (DAP) 12 характеризуются остеопетрозом, вызванным уменьшением дифференцировки остеокластов. Они установили, что путь RANKL/RANK требует ITAM-зависимые костимулирующие сигналы для активации дифференцировки остеокластов [78]. Остеокласты также экспрессируют тирозинкиназы семейства Тес, в частности протеинкиназу Брутона (Btk) и Тес, которые играют важную роль в физиологии В-лимфоцитов [46]. Мыши с двойным нокаутом этих киназ характеризуются остеопетрозом с низким содержанием остеокластов, вероятно, из-за подавления индуцированного RANKL фосфорилирования PLC γ (фосфолипаза C γ) [140].

Регуляция образования остеокластов с помощью регуляторов иммунитета — очень сложный механизм, включающий различные молекулярные пути, число которых постоянно увеличивается. Так, последние работы касаются исследования роли транскрипционного фактора ядерного рецептора NR4A — NR4A1, который принадлежит к семейству орфанных ядерных рецепторов, известных как важные регуляторы миелоидной и лимфоидной дифференцировки и функции [59, 147]. Недавно была установлена контролирующая роль этого ядерного орфанного рецептора в подавлении дифференцировки остеокластов [88], рекрутировании и миграции преостеокластов [136]. Установлено, что миелоид-специфичная, но не остеобласт-специфичная делеция NR4A1 приводит к остеопении из-за увеличения количества остеокластов [136]. Следует отметить, что связанных с иммунитетом факторов, влияющих на образование и биологию остеокластов достаточно велико и их характеристика ограничена объемом настоящего обзора. Эти сведения можно почерпнуть в сообщении [124].

Клетки иммунной системы и физиология кости

Итак, клетки кости могут влиять на функцию клеток иммунной системы и использовать некоторые медиаторы иммунной системы для своих физиологических функций. В то же время клетки иммунной системы разными способами способствуют нормальному функционированию клеток кости. Кратко охарактеризуем эти механизмы.

Т-лимфоциты

Т-лимфоциты — основные клетки адаптивного иммунитета. Они выполняют важнейшую роль не только в инициации и развитии иммунного ответа, но и в процессах взаимодействия с клетками костной ткани. Связи между Т-лимфоцитами и клетками кости многочисленны: практически все субпопуляции Т-клеток способны влиять на активность клеток костной ткани, в основном остеокласты. Внимание исследователей в последнее время привлекают субпопуляции Th17 и Treg — важнейших регуляторов клеток кости. Предполагается, что Th17-лимфоциты в большей степени, чем субпопуляции других Т-лимфоцитов, способны индуцировать остеокластогенез. Эта возможность обеспечивается благодаря уникальным особенностям этих клеток экспрессировать цитокины IL-17A, IL-17F, IL-22, IL-26 и IFN γ [1]. Помимо этого, они могут индуцировать экспрессию колониестимулирующего фактора макрофагов (M-CSF) и RANKL в остеобластах и стромальных клетках [133], продуцировать RANKL и TNF α , одновременно увеличивая экспрессию RANK в предшественниках остеокластов [2]. Эти свойства Th17-лимфоцитов делают их мощными индукторами остеокластогенеза, которые описаны как ведущие факторы патогенеза при ревматоидном артрите (РА) [94] и множественной миеломе (ММ) [116]. Что касается Treg-клеток, их функция антиостеокластогенная и реализуется через механизм, опосредованный растворимыми факторами, а также путем контактного межклеточного взаимодействия [109]. Результаты экспериментов по совместному культивированию мононуклеарных клеток периферической крови (МКПК) и Treg показали, что Treg ингибируют дифференцировку остеокластов из МКПК и статистически значимо уменьшают площади резорбции в культурах клеток кости [75]. Подавление дифференцировки остеокластов было цитокин-зависимым, поскольку она блокировалась антителами против TGF- β или IL-4, а не в результате прямых межклеточных контактов. В другом исследовании регуляторные CD4⁺, CD25⁺, FoxP3⁺Т-клетки выделяли и очищали из селезенки мышей и совместно культивировали с CD11b⁺ клетками-предшественниками остеокластов, выделенными из костного мозга [172]. Установлено, что CD4⁺, CD25⁺, FoxP3⁺Т-клетки, но не Т-клетки CD4⁺, CD25⁻, дозозависимо ингибировали содержание макрофагального колониестимулирующего фактора и RANKL-зависимое образование остеокластов. Снижение образования остеокластов не связано с изменением баланса RANKL/остеопротегерина и существенно зависела от прямого межклеточного контакта с CTLA-4 (cytotoxic T-lymphocyte-associated

protein 4; CD152) [172]. В двух последних работах показано, что резорбция клеток кости под действием Treg снижается на 80%. Эти данные дают основания считать, что Treg выполняют важную патогенетическую роль при аутоиммунных заболеваниях, связанных с развитием остеолита, таких как РА. Действительно, костный мозг мышей, трансгенных по FoxP3 (FoxP3tg), полностью защищал мышей, трансгенных по TNF человека (hTNFtg), от деструкции кости, индуцированной TNF α , тогда как клетки костного мозга с дефицитом FoxP3 усиливали локальную и системную потерю костной массы [173]. Такой же защитный эффект был выявлен при лечении мышей hTNFtg моноклональными антителами-суперагонистами CD28 (CD28 SA — soluble CD28-superagonist), которые увеличивали количество Treg. В обеих моделях защита костной ткани Treg была связана со снижением числа остеокластов, что приводит к уменьшению резорбции кости. Уменьшение количества остеокластов не было вызвано внутренним дефектом дифференцировки клеток, поскольку предшественники остеокластов из химер hTNFtg/FoxP3tg нормально реагировали на M-CSF и активатор рецептора лиганда NF-kappaB. Снижение клинических признаков артрита наблюдалось у мышей hTNFtg с трансплантированным костным мозгом FoxP3tg и получавших антитела CD28 SA. Защитный эффект Treg на кость не зависел от подавления воспаления, о чем свидетельствует наблюдаемое увеличение системной плотности костной ткани у мышей дикого типа, получавших CD28 SA [173]. Эта работа свидетельствует о том, что увеличение числа Treg уменьшает клинические проявления экспериментального артрита, подавляет местное и системное разрушение костей. Следовательно, усиление активности Treg-клеток может быть полезным в лечении индуцированной воспалением потери костной массы, наблюдаемой при РА, однако результаты исследований на больных пока отсутствуют.

В-лимфоциты

Развитие В-лимфоцитов зависит от продукции нескольких факторов, включая RANKL, остеопротегерин, IL-7 и CXCL12, которые вырабатываются стромальными клетками костного мозга, в том числе, остеобластами [113]. У мышей с нокаутом RANK наблюдалось снижение количества зрелых B220⁺IgM⁺ и B220⁺IgG⁺В-клеток в лимфатических узлах [41, 82]. Было показано, что не только RANKL, возникающий из клеток костного мозга, имеет значение для развития В-лимфоцитов, но и сами В-клетки продуцируют RANKL, который затем действует как аутокринный фактор [119]. Доказательства того, что В-клетки синтезируют RANKL, позволили пред-

положить, что они могут влиять на остеокласты. Это подтвердилось в исследовании Onal и соавт., в котором установлено, что мыши, лишенные RANKL в В-лимфоцитах, частично защищены от опосредованной овариэктомией потери костной массы с помощью механизма, ограничивающего увеличение числа остеокластов, что является отличительной чертой этой модели мышей. Условный нокаут RANKL в Т-лимфоцитах не влиял на потерю массы кости, вызванную овариэктомией [119]. Примечательно, что у трансгенных мышей IL-7 обнаружен очаговый остеолит, который ассоциировался с увеличением содержания про-В и пре-В-клеток, в то время как у мышей, лишенных рецептора IL-7, выявлено подавление развития В-лимфоцитов, связанное с увеличением костной массы [104].

В ряде исследований *in vitro* показано, что очищенные В-клетки при обработке RANKL могут дифференцироваться в остеокласты, выполняя функцию предшественников остеокластов [95, 126]. Однако в исследованиях *in vivo* такая возможность не подтвердилась [50], и авторы последней работы делают вывод о том, что В-лимфоциты выполняют функцию клеток посредников, поддерживающих образование остеокластов [50].

Дендритные клетки

Дендритные клетки (ДК) — антигенпрезентирующие клетки, которые выполняют важнейшую роль в регуляции клеточного иммунитета и контроле аутоиммунитета [145]. Участие ДК в биологии костной ткани ранее считалось опосредованной различными субпопуляциями Т-лимфоцитов [153], которые под действием цитокинов, продуцируемых ДК, взаимодействуют с клетками костной ткани [132, 145]. Однако в последние годы появились данные о прямом действии ДК на функцию кости. Оказалось, что незрелые ДК могут трансдифференцироваться в остеокласты при стимуляции М-CSF и RANKL, выполняя функцию предшественников остеокластов [51, 130]. Tsukasaki M. и соавт. обнаружили транзитную экспрессию CD11c (маркер ДК) в процессе остеокластогенеза. Причем делеция RANK в CD11c⁺ клетках приводила к ингибированию образования остеокластов, что убедительно свидетельствует о способности ДК-предшественников дифференцироваться в остеокласты [156]. Поскольку число ДК внутри и вокруг воспаленной синовиальной оболочки при РА достаточно велико, они могут быть еще одним звеном патогенеза разрушения кости при этом заболевании [130].

Нейтрофилы

Нейтрофилы также играют важную роль в биологии костей, в потере костной массы, вызванной воспалением [58], хотя работ, посвященных этой проблеме, не много. Известно, что нейтрофилы,

являясь первыми клетками, мигрирующими в очаг острого повреждения, включая кости [109]. Они секретируют различные медиаторы воспаления, хемокины которые способны действовать как иммуномодулирующие факторы. Например, за счет секреции CCL2 и CCL20 нейтрофилы способны привлекать в очаг воспаления Th17-клетки [58], которые в свою очередь вызывают потерю костной массы, как обсуждалось выше. Однако избыточное снижение числа нейтрофилов может нанести больший вред костной ткани, поскольку приводит к деструкции кости, вызванной IL-17 [111]. Примечательно, что активированные нейтрофилы экспрессируют RANKL в очаге воспаления, и если воспаление локализуется в синовиальной оболочке больных РА, они могут активно участвовать в остеокластогенезе, что значительно усиливает остеолит [125]. Пока роль нейтрофилов в остеоиммунологии не является очевидной, однако имеющиеся данные позволяют предполагать, что активированные нейтрофилы являются индукторами остеокластогенеза, как прямо, так и опосредованно.

Естественные клетки-киллеры (НК-клетки)

Предполагается, что НК-клетки, как и другие лимфоциты, участвуют в регуляции гомеостаза костей. Однако немногочисленные данные, посвященные этой проблеме, противоречивы. В ряде работ показано, что они с помощью различных механизмов, в том числе цитолизом остеобластов, способствуют разрушению костей у больных РА [47, 142, 150]. По мнению авторов исследований, это делает НК-клетки потенциальной терапевтической мишенью для лечения разрушения костей при РА. Однако в другом сообщении НК-клетки были описаны как клетки, которые могут способствовать замедлению прогрессии РА [4]. Поскольку НК-клетки по своим характеристикам находятся между врожденным и адаптивным иммунитетом, их роль в реализации воспаления и иммунной регуляции заслуживает более тщательного изучения, что является необходимым условием для возможного использования этих полифункциональных клеток как новой терапевтической мишени.

Остеомаки и макрофаги костного мозга

Клеточный состав костной ткани и костного мозга включает несколько различных популяций макрофагов: макрофаги костного мозга (макрофаги эритроидных островков), остеокласты и костные макрофаги (остеомаки), резидентные макрофаги периостальной и эндостальной костной ткани [102]. Остеомаки представляют собой отдельную популяцию F4/80-позитивных (F4/80 — специфичный для макрофагов мыши гликопротеин, определяемый с помощью моноклональных антител F4/80) и TRAP (тартрат —

кислая фосфатаза — маркер остеокластов) негативных костных макрофагов, расположенных в непосредственной близости от поверхности кости. Остеомаки часто обнаруживаются рядом с активными костеобразующими остеобластами. Большинство остеобластов на внутренней поверхности кортикальной кости покрыты макрофагами F4/80⁺, CD68⁺, Mac-3⁺, TRAP⁺. Недавно было показано, что в кости свода черепа мышей 2-дневного возраста определяется небольшое количество CD45⁺F4/80⁺ остеомаков [31], которые взаимодействуют с остеобластами и мегакариоцитами, обеспечивая функцию микроокружения для гематопоетических предшественников и стволовых клеток [31, 105]. Эти же авторы установили, что высокоочищенные CD45⁺F4/80⁺ остеомаки из кости свода черепа новорожденных могут дифференцироваться в TRAP-положительные остеокласты, способные резорбировать кость [105]. Примечательно, что в исследованиях *in vitro* и *in vivo* установлена роль остеомаков в дифференцировке остеобластов, опосредованная продукцией костных морфогенетических белков (BMP) [26] и онкостатина М [57]. Было также показано, что экспериментальное уменьшение костных макрофагов у молодых мышей ингибирует дифференцировку остеобластов, но не остеокластов, что приводит к снижению костеобразования, уменьшению роста кости и остеопорозу [27, 32, 159]. Таким образом, остеомаки представляют собой универсальные клетки, способные регулировать костную массу, становиться остеокластами и активно участвовать в реакциях иммунитета.

Взаимодействие клеток иммунной системы и кости при воспалении

Многие клетки иммунной системы (Т- и В-лимфоциты, NK-клетки, моноциты/макрофаги, дендритные клетки) продуцируют IFN γ , который играет важную роль во врожденном и адаптивном иммунитете, регуляции воспаления [137, 151]. В частности, IFN γ в кости влияет как на остеобласты, так и на остеокласты. IFN γ увеличивает дифференцировку остеобластов путем активации транскрипционных молекул: фактора транскрипции 2, связанного с Runx2 — Osteoblast-specific transcription factor, Osterix — Sp7 — транскрипционный фактор [56, 100]. У мышей, нокаутированных по рецептору IFN γ , выявляется снижение дифференцировки остеобластов [42]. Существует достаточно большое число исследований, обобщенных в обзоре [151] и посвященных ингибирующему эффекту IFN γ на дифференцировку остеокластов. Известно, что этот цитокин противодействует влиянию М — CSF на предшественников остеокластов за счет снижения экспрессии его рецептора c-fms, что

в итоге приводит к уменьшению числа RANK-положительных преостеокластов [70]. Кроме того, IFN γ способствует деградации TRAF6 (фактор 6, ассоциированный с рецептором фактора некроза опухолей; TNF receptor-associated factor 6), тем самым ингибируя внутриклеточные сигнальные пути к JNK (c-Jun N-terminal kinase) и NF- κ B [7, 167]. В то же время он индуцирует апоптоз остеокластов, активируя опосредованную Fas-FasL передачу сигналов смерти [79]. Имеются данные о проостеокластогенном эффекте IFN γ на поздних этапах дифференцировки остеокластов [74, 85].

Помимо IFN γ , другие воспалительные цитокины способны модулировать активность остеокластов. Более подробные сведения по этому вопросу можно почерпнуть в обзоре [7], здесь мы ограничимся лишь основополагающими данными. Так, TNF α напрямую усиливает остеокластогенез по механизму, независимому от RANKL [11] и опосредованно, стимулируя экспрессию RANK на преостеокластах [81], увеличивая продукцию RANKL и М-CSF остеобластами и активированными Т-клетками [76, 113].

К семейству IL-6 принадлежат три проостеокластогенных цитокина: IL-6, IL-11 и IL-23. IL-6 стимулирует остеокластогенез по механизму, не зависящему от RANKL, поскольку присутствие «ловушки» OPG не ослабляет этот эффект [84]. Что касается остеобластов, IL-6 снижает их дифференцировку как *in vivo* [38], так и *in vitro*, воздействуя на сигнальные пути MEK2 и Akt2 [71].

IL-11 обладает проостеокластогенным действием [54], его влияние на остеобласты, по-видимому, является проостеогенным [101, 146].

IL-23 продуцируется в основном дендритными клетками и макрофагами, способен опосредованно, путем увеличения экспрессии RANK и RANKL-предшественниками остеобластов и остеокластов соответственно усиливать остеокластогенез [29]. Другими факторами, способствующими остеокластогенезу при воспалении, являются простагландины группы E [127], IL-1 α , IL-1 β , IL-7, IL-8 и IL-34 [7]. Более подробную информацию о влиянии провоспалительных и противовоспалительных цитокинов на клетки костной ткани можно получить в обзорах [7, 175].

Следует особо подчеркнуть, что в физиологических условиях иммунокомпетентные клетки выполняют скромную посредническую функцию в активации остеокластогенеза и стимуляции резорбции кости [175]. Однако при патологических состояниях, обусловленных рядом аутоиммунных и воспалительных заболеваний, эндокринными нарушениями, в том числе дефицитом эстрогенов в постменопаузе и т. д., и сопровождающихся активацией иммунной реактивности, как пра-

вило, происходит выраженное увеличение продукции молекул RANKL иммунокомпетентными клетками. Вследствие этого потенцируется остеокластогенез, повышается активность ОК и усиливается резорбция кости. Число исследований, посвященных изучению взаимодействия клеток иммунной системы и костной ткани при различных заболеваниях все увеличивается, и здесь мы рассмотрим лишь некоторые.

Взаимодействие клеток иммунной системы и кости при некоторых заболеваниях

Вполне обоснованно предполагать, что связь между костью и иммунной системой в физиологических условиях сохраняется и при патологических состояниях. Многие заболевания, поражающие кости, имеют иммунологическое происхождение, в то время как заболевания иммунной системы, такие как острый миелоидный лейкоз, множественная миелома, развиваются с участием клеток костной ткани, их медиаторов и разнообразных сигнальных путей. Мы кратко охарактеризуем эти механизмы на примерах заживления кости при переломах и некоторых заболеваниях.

Заживление переломов кости

Процесс заживления кости после перелома происходит не только с участием клеток кости, но и с вовлечением клеток иммунной системы, нарушение активности которых может замедлить регенерацию костной ткани [45, 128]. Показано, что в условиях дефицита В- и Т-лимфоцитов наблюдается снижение восстановления кости после перелома, вследствие уменьшения дифференцировки остеобластов и минерализации костей [10, 115].

Самая ранняя фаза заживления костей при переломах характеризуется острым воспалением, с участием таких цитокинов, как IL-1, IL-6 и TNF α , которые привлекают в участок повреждения кости В- и Т-лимфоциты, выполняющие проостеогенную функцию, синтезируя IL-17F [115]. В отличие от IL-17A, известного своей проостеокластогенной функцией, провоспалительный цитокин IL-17F экспрессируется в процессе заживления костей и способствует увеличению коллагена, остеокальцина и сиалопротеинов в остеобластах [115]. Различные субпопуляции Т-клеток влияют на регенерацию кости не одинаково, поскольку Th1- и Th17-лимфоциты относят к провоспалительным субпопуляциям, а Th2- и Treg-лимфоциты — к противовоспалительным [154]. Эта парадигма в настоящее время обновилась, однако общепризнано, что нарушение функции указанных субпопуляций Т-лимфоцитов, их баланса может приводить к длительной воспалительной реакции и затяжному восстановлению кости после перелома [135].

Об этом свидетельствуют и клинические наблюдения за пациентами с ВИЧ ослабленным иммунитетом, которые часто обращаются к специалистам по поводу задержки заживления переломов [128].

Нейтрофильные гранулоциты, присутствующие на ранней стадии острого воспаления, очищают очаг от остатков поврежденных клеток [155]. Позже в место повреждения привлекаются мезенхимальные стволовые клетки (МСК), которые также вовлекают в процесс заживления клетки иммунной системы (макрофаги, НК-клетки и др.) [6, 67]. Макрофаги способствуют дифференцировке МСК преимущественно в остеобласты, путем продукции ряда цитокинов [114, 118]. В позднюю стадию воспаления при переломе МСК выполняют иммуносупрессивную функцию, стимулируя дифференцировку Treg, индуцируя апоптоз провоспалительных лимфоцитов Th1 и Th17 и подавляя миграцию В-лимфоцитов в место повреждения [5, 34, 77, 93].

В последние годы все большее внимания уделяется роли макрофагов в ремоделировании кости при ее повреждении. [40]. Макрофаги рекрутируют в место дефекта кости МСК и фибробласты, секретируя ключевые цитокины и хемокины, ускоряющие процесс регенерации кости вокруг костного дефекта. Напомним, что классически и альтернативно активированные макрофаги представляют собой две основных субпопуляции известные как M1 и M2, которые маркируются CD86 и CD206/CD163 соответственно [55, 99, 110]. Стимулируемые ЛПС и IFN γ , макрофаги M1 секретируют провоспалительные цитокины, такие как TNF α , IL-1 β , IL-6, IL-8, индуцибельную синтазу оксида азота (iNOS), усиливая воспаление в месте повреждения. M2-субпопуляция макрофагов синтезирует IL-4 и IL-13, участвующие в лимитировании воспаления, стимулировании ангиогенеза, ремоделировании тканей путем секреции ряда противовоспалительных цитокинов, таких как IL-10 и YM-1, а также медиаторов восстановления тканей: трансформирующий фактор роста- β (TGF- β), BMP-2, тромбоцитарный фактор роста-BB (PDGF-BB) и фактор роста эндотелия сосудов (VEGF) [176]. Открыты и другие субпопуляции макрофагов [28, 99, 112], однако концепция классической дихотомии M1/M2 по-прежнему признана и лежит в основе последних работ [163, 166]. Другая стратегия изучения репарации костей, опосредованной участием моноцитов/макрофагов, заключается в оценке роли определенных субпопуляций макрофагов. Так, Gao и соавт. в 2019 году показали, что TRAP макрофаги секретируют PDGF-BB который усиливает рекрутирование клеток, происходящих

из надкостницы, экспрессию периостина, способствуя периостальному остеогенезу [52]. Кроме того, Vi L. и соавт. идентифицировали белки, продуцируемые молодыми и старыми макрофагами, среди которых белок 1, связанный с рецептором липопротеинов низкой плотности (Lrp1), синтезируется молодыми макрофагами и играет позитивную роль в координации заживления переломов кости [160].

Ревматоидный артрит

Ревматоидный артрит (РА) считается Т-хелпер 1 (Th1) зависимым воспалительным заболеванием, с генетической предрасположенностью, который характеризуется рецидивирующими синовитами, стойким воспалением и выработкой антител против ряда эндогенных белков, в частности ревматодных факторов [138]. Рассмотрим некоторые механизмы остеолитического при РА, обусловленные влиянием Th17-лимфоцитов изменением оси RANKL-RANK-OPG.

Японские исследователи в 2012 году показали тесную связь между воспалением у больных РА и нарушением регуляции остеокластов [133]. Несмотря на высокие уровни ингибитора остеокластогенеза $IFN\gamma$, активация различных субпопуляций Т-клеток, которая характерна для больных РА приводит к увеличению активности остеокластов. В первую очередь это происходит из-за действия активированных Th17-лимфоцитов, поскольку они продуцируют несколько провоспалительных цитокинов, в том числе IL-17. Важно отметить, что в экспериментальной модели РА у мышей удаление IL-17 уменьшало деструкцию кости [90]. В свою очередь IL-17 стимулирует экспрессию большего количества проостеокластогенных цитокинов, включая IL-6, IL-8 и $TNF\alpha$, причем в отсутствие RANKL [65, 68]. Примечательно, что в синовиальной оболочке пациентов с РА IL-17 индуцирует выработку IL-32, который, по механизму обратной связи, стимулирует синтез IL-17 [107]. Эти данные свидетельствуют о том, что IL-17 при РА обладает плеiotропным действием, поскольку участвует не только в развитии хронического воспаления, но и в деструкции костей, характерной для РА [133]. Кроме того, продукция IL-6 увеличивает экспрессию RANKL в синовиальных клетках, что приводит к еще большему увеличению остеокластического разрушения кости [61].

Было выявлено, что в синовиальной жидкости пациентов с РА, по сравнению с пациентами с остеоартритом (ОА) [83], уровень растворимого RANKL выше, чем OPG, что указывает на важную роль первого в повышенной резорбции кости. Это подтверждается исследованием, в котором изучалось соотношение RANKL: OPG и маркеров деградации костей и хряща (концевой коллаген 1 (CTX-1)), которые позволяют прогно-

зировать рентгенологическое прогрессирование повреждения кости при РА [157].

В синовиальной ткани пациентов с активным РА клетки, экспрессирующие RANKL, преимущественно локализованы в участках остеокластической эрозии кости, на границе паннуса и костной ткани [122]. Напротив, OPG у больных РА обнаруживается в областях синовиальной оболочки на некотором расстоянии от мест эрозии кости [122]. Показано, что OPG в синовиальной ткани у больных ОА и здоровых людей связан с эндотелиальными клетками и макрофагами, но эта связь отсутствует у пациентов с активным РА [62]. Важно отметить, что фибробластоподобные синовиоциты и инфильтрирующие синовию мононуклеарные клетки больных РА экспрессировали RANKL [83]. Помимо этого, культуры активированных синовиоцитов из ревматоидной синовиоциты экспрессируют RANKL, в культурах регистрируется снижение уровня OPG, и эти изменения способствуют поддержанию остеокластогенеза *in vitro* [149]. Клетки, экспрессирующие RANKL, выявляются в участках инфильтрации лимфоцитами синовиоцитов и RANKL-положительные клетки определяются среди различных субпопуляций $CD3^+$ и $CD4^+$ лимфоцитов [35, 62, 83]. Показано, что активированные Т-лимфоциты пациентов с РА экспрессируют RANKL и способны индуцировать образование остеокластов *in vitro* [83]. Эти же авторы сообщают о более высоком содержании растворимого RANKL по сравнению с OPG, что указывает на то, что Т-лимфоциты являются источником растворимого RANKL при РА [83].

Пародонтит и его связь с РА

Другим заболеванием, при котором нарушение регуляции клеток иммунной системы вызывает потерю костной массы, является воспаление пародонта. Показано, что у больных пародонтитом активированные В- и Т-лимфоциты стимулируют резорбцию кости, одновременно продуцируя RANKL и повышая активность остеокластов [19, 72, 73]. В 2009 году Rifas L., Weitzmann M. описали новый, секретируемый Т-клетками цитокин, названный секретируемым остеокластогенным фактором активированных Т-клеток (SOFAT — secreted osteoclastogenic factor of activated T cells), который способствует остеокластогенезу независимо от RANKL [129]. Было установлено, что повышенная экспрессия мРНК SOFAT выявляется в образцах ткани пародонта больных, страдающих пародонтозом, а инъекции SOFAT способствовали образованию остеокластов у мышей с экспериментальным пародонтозом [69].

Изменение соотношения RANKL и OPG является информативным показателем потери костной массы, связанной с заболеваниями пародонта [36, 72]. Содержание RANKL значительно выше в десневой щелевой жидкости па-

циентов с пародонитом, чему здоровых людей, различий в уровне OPG не обнаружено [72]. У больных пародонитом большинство В- и Т-лимфоцитов, инфильтрирующих ткани десен, экспрессируют RANKL [36, 72], подобно лимфоцитам синовиальной ткани больных РА. Показано, что выделенные из тканей десен пациентов пародонитом Т- и В-лимфоциты, индуцировали *in vitro* дифференцировку остеокластов RANKL-зависимым путем [72]. Результаты цитируемых работ свидетельствуют о том, что активированные Т- и В-лимфоциты являются источником RANKL и индуктором резорбции костной ткани при пародонтозе. Уместно отметить, что у больных РА и пародонитом деструктивное воспаление кости, которое завершается потерей массы кости, характеризуется сходными патофизиологическими механизмами. Предполагается, что цитруллинирование белков *P. gingivalis* и последующее образование аутоантигенов, инициирующих развитие аутоиммунитета при РА — это тот механизм, который связывает эти два заболевания [60]. Иммуный ответ при РА и пародоните может развиваться к цитруллинированной енолазе как специфическому антигену, а также перекрестно к доминантному эпитопу цитруллинированной альфа-енолазы человека и консервативному участку цитруллинированной енолазы *P. gingivalis* [92]. Не случайно выявлены прямые взаимосвязи между степенью и тяжестью хронического пародонита и прогрессией РА [60, 92]. Считается, что у больных РА за время болезни высока вероятность частых эпизодов пародонита и его хронического течения. Это предположение подтверждается результатами исследований на мышах с комбинированной моделью артрита и пародонита [23]. Было установлено более тяжелое течение артрита в группе животных с пародонитом. Оба заболевания характеризуются дисбалансом содержания провоспалительных и противовоспалительных цитокинов, высоким уровнем резорбции костной ткани. Это позволило Cantley и соавт. предположить, что оба заболевания связаны общей дисфункцией механизмов воспаления [23]. Автор считает, что для этих заболеваний необходимы новые стратегии лечения, направленные не только на ингибирование провоспалительных цитокинов, но и механизмы повышенной резорбции костей [23]. По мнению некоторых исследователей, в программах профилактики обострений РА должны быть учтены методы скрининга, выявляющего состояние пародонта [12].

Постменопаузальный остеопороз

Дефицит эстрогена — основная причина остеопороза у женщин в постменопаузе. Еще в 1991 году Pacifici и соавт. выявили, что постменопаузальный остеопороз (ПО) ассоциируется с уве-

личением выработки различными клетками воспалительных цитокинов [120] и результаты этой работы позволили считать постменопаузальный остеопороз воспалительным заболеванием. Защитный эффект эстрогенов на кости хорошо изучен и обусловлен прямым действием гормонов как на остеокласты, так и на остеобласты. В первом случае эстрогены увеличивают апоптоз клеток [64, 123] и снижают RANKL-зависимое образование остеокластов [144]. Действие эстрогенов на остеобласты, напротив, приводит к анаболическому эффекту, за счет увеличения числа клеток и продукции ими коллагена I [96]. Эстрогены влияют на костный метаболизм и опосредовано, стимулируя иммунокомпетентные клетки. Было установлено, что эстрогены подавляют продукцию RANKL не только в остеобластах, но и в Т- и В-лимфоцитах [44], а дефицит эстрогенов увеличивает высвобождение проостеокластогенных цитокинов (TNF α и RANKL) за счет активации Т-лимфоцитов [3, 18, 37, 165]. Таким образом, активированные Т-клетки, их цитокины являются еще одним звеном патогенеза постменопаузального остеопороза, что позволило Srivastava и соавт. предложить в 2018 году термин «иммунопороз» [143].

Нарушение взаимодействия клеток иммунной системы и кости при множественной миеломе

Множественная миелома (ММ) является гематологическим злокачественным новообразованием, которое до сегодняшнего времени остается неизлечимым [158]. В основе патогенеза болезни лежит клональная экспансия аномальных плазматических клеток в костном мозге. Клоны опухолевых клеток находятся в реципрокных отношениях с микроокружением клеток костного мозга, путем контактного взаимодействия или посредством растворимых факторов с остеокластами, стромальными клетками и остеобластами [152]. В результате этих взаимодействий происходит развитие остеолита, потеря костной массы, расширение и прогрессирование ММ [121, 152]. ММ характеризуется продукцией моноклональных иммуноглобулинов или их легких цепей, что приводит к почечной недостаточности, анемии, иммуносупрессии и остеолитическому заболеванию костей, которое встречается у большинства пациентов [121]. Остеолиз выявляется у 70% больных при первоначальном диагнозе ММ, сохраняется при отсутствии активности болезни и является основной причиной неблагоприятных исходов [98]. Несмотря на некоторые успехи в лечении ММ у 80-90% больных в течение болезни сохраняются боли в костях, спонтанные переломы, гиперкальциемия и компрессия спинного мозга [98]. Развитие литических поражений кости связано с изменением динамического баланса между резорбцией и образова-

ем кости, обусловленным повышенным образованием и активностью остеокластов, снижением функции остеобластов [131, 168]. В микроокружении костного мозга при ММ происходит увеличение содержания проостеокластогенных факторов, продуцируемых различными типами клеток: стромальные клетки, субпопуляции Т- и В-лимфоцитов и др., которые способствуют усилению образования ОК, привлекая их различные предшественники, включая дендритные клетки и CD14⁺CD16⁺ моноциты [14, 21]. Активированные ОК также могут увеличивать миграцию миеломных клеток [87], что приводит к расширению зоны поражения кости и прогрессированию ММ. Кроме того, ОК поддерживают иммуносупрессивную среду для миеломных клеток [8], а иммунные клетки усиливают дифференцировку ОК [20, 33]. Показано, что остеокластогенез индуцируется CD14-моноцитами, CD8T-клетками и нейтрофилами у пациентов с ММ путем повышенной продукции белка надсемейства TNF-LIGHT/TNFSF14. LIGHT/TNFSF14 (tumor necrosis factor (ligand) superfamily member14) — растворимый провоспалительный цитокин-лиганд для TNFRSF14 [20]. Установлено, что LIGHT взаимодействует с RANKL, усиливая образование ОК при ММ [20]. Уместно напомнить, что RANKL является наиболее изученным проостеокластогенным цитокином, являясь мишенью для новых методов лечения. Было разработано полностью человеческое антитело к RANKL (деносумаб) для уменьшения резорбции кости, его эффективность и безопасность доказаны [16], препарат зарегистрирован во многих странах, в том числе РФ. Считается, что при ММ анти-RANKL терапия является инновационным подходом по сравнению с используемыми бисфосфонатами [15]. Кроме того, обсуждается возможность разработки новых препаратов для лечения ММ на основе ингибиторов протеасом и иммуномодуляции, способных влиять на клетки кости [15, 98, 106].

Таким образом, перечисленные клинические примеры в очередной раз иллюстрируют перспективность междисциплинарного подхода в изучении патогенеза заболеваний человека, в данном случае связанного с взаимодействием клеток иммунной системы и кости. Перспектива исследований в этом направлении определяется, в первую очередь, с возможностью идентификации новых терапевтических мишеней. Ограниченный объем обзора не позволил проанализировать проблемы остеоиммунологии при других заболеваниях, таких как рак, заболевания нервной системы, сахарный диабет и др. Число исследований, посвященных проблеме интегрального участия клеток иммунной системы и кости в патогенезе хронических заболеваний человека

все более увеличивается, основополагающие сведения можно получить из ряда обзоров [117, 124, 148, 175].

Заключение

Междисциплинарный подход к изучению фундаментальных проблем жизнедеятельности организма человека в условиях здоровья и болезни всегда отличался глубиной познания и большим набором практических разработок, многие из которых стали надежными методами диагностики и лечения для врачей различных специальностей. Более 20 лет назад получила право на жизнь еще одна междисциплинарная область биологических и медицинских знаний — остеоиммунология. С точки зрения эволюции биологии и медицины это не такой большой срок, однако даже за это время удалось получить новые данные об удивительных механизмах сотрудничества клеток иммунной системы и кости у здоровых и больных людей. Именно интегральный подход к проблеме позволил расширить наши представления о том, как они действуют и взаимодействуют. Изучение роли провоспалительных цитокинов в стимулировании остеокластогенеза и многочисленные точки взаимодействия между иммунокомпетентными клетками и остеокластами, многообразие сигнальных путей реализации эффектов оказались решающими для понимания биологии клеток разрушающих костную ткань. Оказалось, что механизмы взаимодействия между клетками кости и иммунной системы необычайно сложны, тесно взаимосвязаны и включают множество клеток-посредников и медиаторов. Из-за сложности предмета, исследователям пока трудно получить результаты, которые могли бы привести к широкому клиническому использованию. Тем не менее сегодня в клинической практике некоторых заболеваний уже используется ингибитор RANKL деносумаб [124]. Объединенные усилия ученых разных специальностей в области остеоиммунологии позволили ответить на многие вопросы, однако новых вопросов появилось еще больше. Нет сомнений в том, что тесное взаимодействие клеток иммунной системы и костной ткани выглядит как единое, неразрывное целое. Поэтому заключая, уместно напомнить слова древнегреческого философа Платона: «Но целого как раз и не замечают греческие врачи, и только поэтому от них скрыто столько болезней, они никогда не видят целого. Целому они должны были бы посвящать свои заботы, ибо там, где страдает все целое, не могут быть здоровы части».

Список литературы/References

1. Adamopoulos I.E., Bowman E.P. Immune regulation of bone loss by Th17 cells. *Arthritis Res. Ther.*, 2008, Vol. 10, no. 5, 225. doi: 10.1186/ar2502.
2. Adamopoulos I.E., Chao C.C., Geissler R., Laface D., Blumenschein W., Iwakura Y. Interleukin-17A upregulates receptor activator of NF-kappaB on osteoclast precursors. *Arthritis. Res. Ther.*, 2010, Vol. 12, R29. doi: 10.1186/ar2936.
3. Adeel S., Singh K., Vydareny K.H., Kumari M., Shah E., Weitzmann M.N., Tangpricha V. Bone loss in surgically ovariectomized premenopausal women is associated with T Lymphocyte activation and thymic hypertrophy. *J. Investig. Med.*, 2013, Vol. 61, pp. 1178-1185.
4. Ahern D.J., Brennan F.M. The role of Natural Killer cells in the pathogenesis of rheumatoid arthritis: major contributors or essential homeostatic modulators? *Immunol. Lett.*, 2011, Vol. 136, pp. 115-121.
5. Akiyama K., Chen C., Wang D., Xu X., Qu C., Yamaza T. Mesenchymal-stem-cell-induced immunoregulation involves FAS-ligand-/FAS-mediated T cell apoptosis. *Cell Stem Cell.*, 2012, Vol. 10, pp. 544-555.
6. Almeida C.R., Caires H.R., Vasconcelos D.P., Barbosa M.A. NAP-2 secreted by human NL cells can stimulate mesenchymal stem/stromal cell recruitment. *Stem Cell Rep.*, 2016, Vol. 6, pp. 466-473.
7. Amarasekara D.S., Yun H., Kim S., Lee N., Kim H., Rho J. Regulation of osteoclast differentiation by cytokine networks. *Immune Netw.*, 2018, Vol. 18, e8. doi: 10.4110/in.2018.18.e8.
8. An G., Acharya C., Feng X., Wen K., Zhong M., Zhang L., Munshi N.C., Qiu L., Tai Y.T., Anderson K.C. Osteoclasts promote immune suppressive microenvironment in multiple myeloma: therapeutic implication. *Blood*, 2016, Vol. 128, pp. 1590-1603.
9. Arron J.R., Choi Y. Bone versus immune system. *Nature*, 2000, Vol. 408, pp. 535-536.
10. Askalonov A.A. Changes in some indices of cellular immunity in patients with uncomplicated and complicated healing of bone fractures. *J. Hyg. Epidemiol. Microbiol. Immunol.*, 1981, Vol. 25, pp. 307-310.
11. Azuma Y., Kaji K., Katogi R., Takeshita S., Kudo A. Tumor necrosis factor-alpha induces differentiation of and bone resorption by osteoclasts. *J. Biol. Chem.*, 2000, Vol. 275, pp. 4858-4864.
12. Bartold P.M., Marshall R.I., Haynes D.R. Periodontitis and rheumatoid arthritis: a review. *J. Periodontol.*, 2005, Vol. 76, no. 11, pp. 2066-2074.
13. Blin-Wakkach C., Wakkach A., Sexton P.M., Rochet N., Carle G.F. Hematological defects in the oc/oc mouse, a model of infantile malignant osteopetrosis. *Leukemia*, 2004, Vol. 18, pp. 1505-1511.
14. Bolzoni M., Ronchetti D., Storti P., Donofrio G., Marchica V., Costa F., Agnelli L., Toscani D., Vescovini R., Todoerti K., Bonomini S., Sammarelli G., Vecchi A., Guasco D., Accardi F., Palma B.D., Gamberi B., Ferrari C., Neri A., Aversa F., Giuliani N. IL21R expressing CD14⁺CD16⁺ monocytes expand in multiple myeloma patients leading to increased osteoclasts. *Haematologica*, 2017, Vol. 102, no. 4, pp. 773-784.
15. Bolzoni M., Storti P., Bonomini S., Todoerti K., Guasco D., Toscani D., Agnelli L., Neri A., Rizzoli V., Giuliani N. Immunomodulatory drugs lenalidomide and pomalidomide inhibit multiple myeloma-induced osteoclast formation and the RANKL/OPG ratio in the myeloma microenvironment targeting the expression of adhesion molecules. *Exp. Hematol.*, 2014, Vol. 41, pp. 387-397.
16. Bolzoni M., Toscani D., Storti P., Marchica V., Costa F., Giuliani N. Possible targets to treat myeloma-related osteoclastogenesis. *Exp. Rev. Hematol.*, 2018, Vol. 11, pp. 325-326.
17. Boyce B.F., Yao Z., Xing L. Osteoclasts have multiple roles in bone in addition to bone resorption. *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.*, 2009, Vol. 19, pp. 171-180.
18. Breuil Y., Ticchioni M., Testa J., Roux C.H., Ferrari P., Breitmayer J.P., Albert-Sabonnadière C., Durant J., de Perreti F., Bernard A., Euler-Ziegler L., Carle G.F. Immune changes in post-menopausal osteoporosis: the immunos study. *Osteoporos Int.*, 2010, Vol. 21, pp. 805-814.
19. Brunetti G., Colucci S., Pignataro P., Coricciati M., Mori G., Cirulli N. T cells support osteoclastogenesis in an *in vitro* model derived from human periodontitis patients. *J. Periodontol.*, 2005, Vol. 76, pp. 1675-1680.
20. Brunetti G., Rizzi R., Oranger A., Gigante I., Mori G., Taurino G., Mongelli T., Colaianni G., di Benedetto A., Tamma R., Ingravallo G., Napoli A., Faienza M.F., Mestice A., Curci P., Specchia G., Colucci S., Grano M. LIGHT/TNFSF14 increases osteoclastogenesis and decreases osteoblastogenesis in multiple myeloma-bone disease. *Oncotarget*, 2014, Vol. 5, no. 24, pp. 12950-12967.
21. Calvani N., Cafforio P., Silvestris F., Dammacco F. Functional osteoclast-like transformation of cultured human myeloma cell lines. *Br. J. Haematol.*, 2005, Vol. 130, pp. 926-938.
22. Calvi L.M., Adams G.B., Weibrecht K.W., Weber J.M., Olson D.P., Knight M.C., Martin R.P., Schipani E., Divieti P., Bringhurst F.R., Milner L.A., Kronenberg H.M., Scadden D.T. Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche. *Nature*, 2003, Vol. 425, pp. 841-846.
23. Cantley M.D., Haynes D.R., Marino V., Bartold P.M. Pre-existing periodontitis exacerbates experimental arthritis in a mouse model. *J. Clin. Periodontol.*, 2011, Vol. 38, no. 6, pp. 532-541.
24. Cappariello A., Maurizi A., Veeriah V., Teti A. The great beauty of osteoclast. *Arch. Biochem. Biophys.*, 2014, Vol. 561, pp. 13-21.
25. Capulli M., Paone R., Rucci N. Osteoblast and osteocyte: games without frontiers. *Arch. Biochem. Biophys.*, 2014, Vol. 561, pp. 3-12.

26. Champagne C.M., Takebe J., Offenbacher S., Cooper L.F. Macrophage cell lines produce osteoinductive signals that include bone morphogenetic protein-2. *Bone*, 2002, Vol. 30, pp. 26-31.
27. Chang M.K., Raggatt I.J., Alexander K.A., Kuliwaba J.S., Fazzalari N.L., Schroder K., Maylin E.R., Ripoll V.M., Hume D.A., Pettit A.R. Osteal tissue macrophages are intercalated throughout human and mouse bone lining tissues and regulate osteoblast function *in vitro* and *in vivo*. *J. Immunol.*, 2008, Vol. 181, pp. 1232-1244.
28. Chávez-Galán L., Olleros M.L., Vesin D., Garcia I. Much more than M1 and M2 macrophages, there are also CD169⁺ and TCR⁺ macrophages. *Front. Immunol.*, 2015, Vol. 6, 263. doi: 10.3389/fimmu.2015.00263.
29. Chen L., Wei X.Q., Evans B., Jiang W., Aeschlimann D. IL-23 promotes osteoclast formation by up-regulation of receptor activator of NF-kappaB (RANK) expression in myeloid precursor cells. *Eur. J. Immunol.*, 2008, Vol. 38, pp. 2845-2854.
30. Chen X., Wang Z., Duan N., Zhu G., Schwarz E.M., Xie C. Osteoblast-osteoclast interactions. *Connect Tissue Res.*, 2018, Vol. 59, no. 2, pp. 99-107.
31. Chitteti B.R., Cheng Y.H., Poteat B., Rodriguez-Rodriguez S., Goebel W.S., Carlesso N., Kacena M.A., Srouf E.F. Impact of interactions of cellular components of the bone marrow microenvironment on hematopoietic stem and progenitor cell function. *Blood*, 2010, Vol. 115, pp. 3239-3248.
32. Cho S.W., Soki F.N., Koh A.J., Eber M.R., Entezami P., Park S., van Rooijen N., McCauley L.K. Osteal macrophages support physiologic skeletal remodeling and anabolic actions of parathyroid hormone in bone. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 2014, Vol. 111, pp. 1545-1550.
33. Ciucci T., Ibáñez L., Boucoiran A., Birgy-Barelli E., Pène J., Abou-Ezzi G., Arab N., Rouleau M., Hébuterne X., Yssel H., Blin-Wakkach C., Wakkach A. Bone marrow Th17 TNF α cells induce osteoclast differentiation, and link bone destruction to IBD. *Gut*, 2015, Vol. 64, pp. 1072-1081.
34. Corcione A., Benvenuto F., Ferretti E., Giunti D., Cappiello V., Cazzanti F., Risso M., Gualandi F., Mancardi G.L., Pistoia V., Uccelli A. Human mesenchymal stem cells modulate B-cell functions. *Blood*, 2006, Vol. 107, pp. 367-372.
35. Crotti T.N., Smith M.D., Weedon H. Receptor activator NF- κ B ligand (RANKL) expression in synovial tissue from patients with rheumatoid arthritis, spondyloarthropathy, osteoarthritis, and from normal patients: semiquantitative and quantitative analysis. *Ann. Rheum. Dis.*, 2002, Vol. 61, no. 12, pp. 1047-1054.
36. Crotti T., Smith M.D., Hirsch R., Receptor activator NF κ B ligand (RANKL) and osteoprotegerin (OPG) protein expression in periodontitis. *J. Periodontal Res.*, 2015, Vol. 38, no. 4, pp. 380-383.
37. D'Amelio P., Grimaldi A., di Bella S., Brianza S.Z.M., Cristofaro M.A., Tamone C. Estrogen deficiency increases osteoclastogenesis up-regulating T cells activity: a key mechanism in osteoporosis. *Bone*, 2008, Vol. 43, pp. 92-100.
38. de Benedetti F., Rucci N., del Fattore A., Peruzzi B., Paro R., Longo M. Impaired skeletal development in interleukin-6-transgenic mice: a model for the impact of chronic inflammation on the growing skeletal system. *Arthritis Rheum.*, 2006, Vol. 54, pp. 3551-3563.
39. Deller T. Histologie. Zytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie : das Lehrbuch. 5th ed München: Elsevier, 2018.
40. Dohle E., Bischoff I., Böse T., Marsano A., Banfi A., Unger R., Kirkpatrick C.J. Macrophage-mediated angiogenic activation of outgrowth endothelial cells in co-culture with primary osteoblasts. *Eur. Cell. Mater.*, 2014, Vol. 27, pp. 149-165.
41. Dougall W.C., Glaccum M., Charrier K., Rohrbach K., Brasel K., de Smedt T. RANK is essential for osteoclast and lymph node development. *Genes Dev.*, 1999, Vol. 13, pp. 2412-2424.
42. Duque G., Huang D.C., Dion N., Macoritto M., Rivas D., Li W., Li W., Yang X.F., Li J., Lian J., Marino F.T., Barralet J., Lascau V., Deschênes C., Ste-Marie L.G., Kremer R. Interferon-gamma plays a role in bone formation *in vivo* and rescues osteoporosis in ovariectomized mice. *J. Bone Miner. Res.*, 2011, Vol. 26, pp. 1472-1483.
43. Egawa T., Kawabata K., Kawamoto H., Amada K., Okamoto R., Fujii N., Fujii N., Kishimoto T., Katsura Y., Nagasawa T. The earliest stages of B cell development require chemokine stromal cell-derived factor/pre-B cell growth-stimulating factor. *Immunity*, 2001, Vol. 15, pp. 323-334.
44. Eghbali-Fatourehchi G., Khosla S., Sanyal A., Boyle W.J., Lacey D.L., Riggs B.L. Role of RANK ligand in mediating increased bone resorption in early postmenopausal women. *J. Clin. Invest.*, 2003, Vol. 111, pp. 1221-1230.
45. El-Jawhari J.J., Jones E., Giannoudis P.V. The role of immune cells in bone healing; what we know, do not know and future perspectives. *Injury*, 2016, Vol. 47, pp. 2399-2406.
46. Ellmeier W., Jung S., Sunshine M.J., Hatam F., Xu Y., Baltimore D., Mano H., Littman D.R. Severe B cell deficiency in mice lacking the tec kinase family members Tec and Btk. *J. Exp. Med.*, 2000, Vol. 192, pp. 1611-1624.
47. Feng S., Madsen S.H., Viller N.N., Neutsky-Wulff A.V., Geisler C., Karlsson L. Interleukin-15-activated natural killer cells kill autologous osteoclasts via LFA-1, DNAM-1 and TRAIL, and inhibit osteoclast-mediated bone erosion *in vitro*. *Immunology*, 2015, Vol. 145, pp. 367-379.
48. Feng X., Teitelbaum S.L. Osteoclasts: new insights. *Bone Res.*, 2013, Vol. 1, pp. 1-26.
49. Fernandez-Real J.M., Izquierdo M., Ortega F., Gorostiaga E., Gomez-Ambrosi J., Moreno-Navarrete J.S., Frühbeck G., Martínez C., Idoate F., Salvador J., Forga L., Ricart W., Ibáñez J. The relationship of serum osteocalcin concentration to insulin secretion, sensitivity and disposal with hypocaloric diet and resistance training. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 2009, Vol. 94, pp. 237-245.

50. Fujiwara Y., Piemontese M., Liu Y., Thostenson J.D., Xiong J., O'Brien C.A. RANKL (Receptor Activator of NF κ B Ligand) produced by osteocytes is required for the increase in B cells and bone loss caused by estrogen deficiency in mice. *J. Biol. Chem.*, 2016, Vol. 291, pp. 24838-24850.
51. Gallois A., Lachuer J., Yvert G., Wierinckx A., Brunet F., Roubourdin-Combe C., Delprat C., Jurdic P., Mazzorana M. Genome-wide expression analyses establish dendritic cells as a new osteoclast precursor able to generate bone-resorbing cells more efficiently than monocytes. *J. Bone Miner. Res.*, 2010, Vol. 25, pp. 661-672.
52. Gao B., Deng R., Chai Y., Chen H., Hu B., Wang X., Zhu S., Cao Y., Ni S., Wan M., Yang L., Luo Z., Cao X. Macrophage-lineage TRAP⁺ cells recruit periosteum-derived cells for periosteal osteogenesis and regeneration. *J. Clin. Invest.*, 2019, Vol. 129, pp. 2578-2594.
53. Ginaldi L., de Martinis M. Osteoimmunology and Beyond. *Curr. Med. Chem.*, 2016, Vol. 23, no. 33, pp. 3754-3774.
54. Girasole G., Passeri G., Jilka R.L., Manolagas S.C. Interleukin 11: a new cytokine critical for osteoclast development. *J. Clin. Invest.*, 1994, Vol. 93, pp. 1516-1524.
55. Goerdts S., Orfanos C.E. Other functions, other genes: alternative activation of antigen-presenting cells. *Immunity*, 1999, Vol. 10, pp. 137-142.
56. Gowen M., MacDonald B.R., Russel R.G. Actions of recombinant human gamma-interferon and tumor necrosis factor alpha on the proliferation and osteoblastic characteristics of human trabecular bone cells *in vitro*. *Arthritis Rheum.*, 1988, Vol. 31, pp. 1500-1507.
57. Guihard P., Boutet M.A., Brounais B., David E., Brion R., Delecros J. Induction of osteogenesis in mesenchymal stem cells by activated monocytes/macrophages depends on oncostatin M signaling. *Stem Cells*, 2012, Vol. 30, pp. 762-772.
58. Hajishengallis G., Moutsopoulos N.M., Hajishengallis E., Chavakis T. Immune and regulatory functions of neutrophils in inflammatory bone loss. *Semin. Immunol.*, 2016, Vol. 28, pp. 146-158.
59. Hanna R.N., Carlin L.M., Hubbelin H.G., Nackiewicz D., Green A.M., Punt J.A. The transcription factor NR4A1 (Nur77) controls bone marrow differentiation and the survival of Ly6C-monocytes. *Nat. Immunol.*, 2011, Vol. 12, pp. 778-785.
60. Harvey G.P., Fitzsimmons T.R., Dhamarpatni A.A.S.S.K., Marchant C., Haynes D.R., Bartold P.M. Expression of peptidylarginine deiminase-2 and -4, citrullinated proteins and anti-citrullinated protein antibodies in human gingiva. *J. Periodontal Res.*, 2013, Vol. 48, no. 2, pp. 252-261.
61. Hashizume M., Hayakawa N., Mihara M. IL-6 trans-signalling directly induces RANKL on fibroblast-like synovial cells and is involved in RANKL induction by TNF-alpha and IL-17. *Rheumatology (Oxford)*, 2008, Vol. 47, pp. 1635-1640.
62. Haynes D.R., Barg E., Crotti T.N., Holding C., Weedon H., Atkins G.J., Zannettino A., Ahern M.J., Coleman M., Roberts-Thomson P.J., Kraan M., Tak P.P., Smith M.D. Osteoprotegerin expression in synovial tissue from patients with rheumatoid arthritis, spondyloarthropathies and osteoarthritis and normal controls. *Rheumatology*, 2003, Vol. 42, no. 1, pp. 123-134.
63. Horton J.E., Raisz L.G., Simmons H.A., Oppenheim J.J., Mergenhagen S.E. Bone resorbing activity in supernatant fluid from cultured human peripheral blood leukocytes. *Science*, 1972, Vol. 177, pp. 793-795.
64. Hughes D.E., Dai A., Tiffée J.C., Li H.H., Mundy G.R., Boyce B.F. Estrogen promotes apoptosis of murine osteoclasts mediated by TGF-beta. *Nat. Med.*, 1996, Vol. 2, pp. 1132-1136.
65. Hwang S.Y., Kim J.Y., Kim K.W., Park M.K., Moon Y., Kim W.U. IL-17 induces production of IL-6 and IL-8 in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts via NF-kappaB- and PI3-kinase/Akt-dependent pathways. *Arthritis Res. Ther.*, 2004, Vol. 6, pp. 120-128.
66. Hwang Y.C., Jeong I.K., Ahn K.J., Chung H.Y. The uncarboxylated form of osteocalcin is associated with improved glucose tolerance and enhanced beta-cell function in middle-age male subjects. *Diabetes Met. Res. Rev.*, 2009, Vol. 25, pp. 768-772.
67. Ito H. Chemokines in mesenchymal stem cell therapy for bone repair: a novel concept of recruiting mesenchymal stem cells and possible cell sources. *Mod. Rheumatol.*, 2011, Vol. 21, pp. 113-121.
68. Ivanovic D.V., di Battista J.A., Martel-Pelletier J., Jolicoeur P.C., He Y., Zhang M. IL-17 stimulates the production and expression of proinflammatory cytokines, IL-beta and TNF-alpha, by human macrophages. *J. Immunol.*, 1998, Vol. 160, pp. 3513-3521.
69. Jarry C.R., Durante P.M., Freitas F.F., de Macedo C.G., Clemente-Napimoga J.T., Saba-Chujfi E. Secreted osteoclastogenic factor of activated T cells (SOFAT), a novel osteoclast activator, in chronic periodontitis. *Hum. Immunol.*, 2013, Vol. 74, pp. 861-866.
70. Ji J.D., Park-Min K.H., Shen Z., Fajardo R.J., Goldring S.R., McHugh K.P., Ivashkiv L.B. Inhibition of RANK expression and osteoclastogenesis by TLRs and IFN-gamma in human osteoclast precursors. *J. Immunol.*, 2009, Vol. 183, pp. 7223-7233.
71. Kaneshiro S., Ebina K., Shi K., Higuchi C., Hirao M., Okamoto M. IL-6 negatively regulates osteoblast differentiation through the SHP2/MEK2 and SHP2/Akt2 pathways *in vitro*. *J. Bone Miner. Metab.*, 2014, Vol. 32, pp. 378-392.
72. Kawai T., Matsuyama T., Hosokawa Y. B and T lymphocytes are the primary sources of RANKL in the bone resorptive lesion of periodontal disease. *Am. J. Pathol.*, 2006, Vol. 169, pp. 987-998.

73. Kawai T., Eisen-Lev R., Seki M., Eastcott W., Wilson M.E., Taubman M.A. Requirement of B7 costimulation for Th1-mediated inflammatory bone resorption in experimental periodontal disease. *J. Immunol.*, 2000, Vol. 164, no. 4, pp. 2102-2109.
74. Kim J.W., Lee M.S., Lee C.H., Kim H.Y., Chae S.U., Kwak H.B. Effect of interferon-gamma on the fusion of mononuclear osteoclasts into bone-resorbing osteoclasts. *BMB Rep.*, 2012, Vol. 45, pp. 281-286.
75. Kim Y.G., Lee C.K., Nah S.S., Mun S.H., Yoo B., Moon H.B. Human CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells inhibit the differentiation of osteoclasts from peripheral blood mononuclear cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2007, Vol. 357, pp. 1046-1052.
76. Kitaura H., Zhou P., Kim H.J., Novack D.V., Ross F.P., Teitelbaum S.L. M-CSF mediates TNF-induced inflammatory osteolysis. *J. Clin. Invest.*, 2005, Vol. 115, pp. 3418-3427.
77. Klyushnenkova E., Mosca J.D., McIntosh K.R. Human mesenchymal stem cells suppress allogeneic T cell response *in vitro*: implications for allogeneic transplantation. *Blood*, 1998, Vol. 92, 642a. doi: 10.1182/blood-2004-04-1559.
78. Koga T., Inui M., Inoue K., Kim S., Suematsu A., Kobayashi E., Iwata T., Ohnishi H., Matozaki T., Kodama T., Taniguchi T., Takayanagi H., Takai T. Costimulatory signals mediated by ITAM motif cooperate with RANKL for bone homeostasis. *Nature*, 2004, Vol. 428, pp. 758-763.
79. Kohara H., Kitaura H., Fujimura Y., Yoshimatsu M., Morita Y., Eguchi T. IFN-gamma directly inhibits TNF-alpha-induced osteoclastogenesis *in vitro* and *in vivo* and induces apoptosis mediated by Fas/Fas ligand interactions. *Immunol. Lett.*, 2011, Vol. 137, pp. 53-61.
80. Kollet O., Dar A., Shviti S., Kalinkovich A., Lapid K., Sztainberg Y. Osteoclasts degrade endosteal components and promote mobilization of hematopoietic progenitor cells. *Nat. Med.*, 2006, Vol. 12, pp. 657-664.
81. Komine M., Kukita A., Kukita T., Ogata Y., Hotokebuchi T., Kohashi O. Tumor necrosis factor-alpha cooperates with receptor activator of nuclear factor kappaB ligand in generation of osteoclasts in stromal cell-depleted rat bone marrow cell culture. *Bone*, 2001, Vol. 28, pp. 474-483.
82. Kong Y.Y., Yoshida H., Sarosi I., Tan H.L., Timms E., Capparelli C., Morony S., Oliveira-dos-Santos A.J., van G., Itie A., Khoo W., Wakeham A., Dunstan C.R., Lacey D.L., Mak T.W., Boyle W.J. OPGL is a key regulator of osteoclastogenesis, lymphocyte development and lymph-node organogenesis. *Nature*, 1999, Vol. 397, pp. 315-323.
83. Kotake S., Udagawa N., Hakoda M., Yano K., Tsuda E., Takahashi K., Furuya T., Ishiyama S., Kim K.J., Saito S., Nishikawa T., Takahashi N., Togari A., Tomatsu T., Suda T., Kamatani N. Activated human T cells directly induce osteoclastogenesis from human monocytes: possible role of T cells in bone destruction in rheumatoid arthritis patients. *Arthritis Rheum.*, 2001, Vol. 44, no. 5, pp. 1003-1012.
84. Kudo O., Sabokbar A., Pocock A., Itonaga I., Fujikawa Y., Athanasou N.A. Interleukin-6 and interleukin-11 support human osteoclast formation by a RANKL-independent mechanism. *Bone*, 2003, Vol. 32, pp. 1-7.
85. Kwak H.B., Ha H., Kim H.N., Lee J.H., Kim H.S., Lee S. Reciprocal cross-talk between RANKL and interferon-gamma-inducible protein 10 is responsible for bone-erosive experimental arthritis. *Arthritis Rheum.*, 2008, Vol. 58, pp. 1332-1342.
86. Lacey D.L., Timms E., Tan H.L., Kelley M.J., Dunstan C.R., Burgess T., Elliott R., Colombero A., Elliott G., Scully S., Hsu H., Sullivan J., Hawkins N., Davy E., Capparelli C., Eli A., Qian Y.X., Kaufman S., Sarosi I., Shalhoub V., Senaldi G., Guo J., Delaney J., Boyle W.J. Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell*, 1998, Vol. 93, pp. 165-176.
87. Lawson M.A., McDonald M.M., Kovacic N., Hua Khoo W., Terry R.L., Down J. Osteoclasts control reactivation of dormant myeloma cells by remodelling the endosteal niche. *Nat. Commun.*, 2015, Vol. 6, 8983. doi: 10.1038/ncomms9983.
88. Li X., Wei W., Huynh H., Zuo H., Wang X., Wang Y. Nur77 prevents excessive osteoclastogenesis by inducing ubiquitin ligase Cbl-b to mediate NFATc1. *Elife*, 2014, Vol. 4, e072. doi: 10.1155/2014/263625.
89. Liu H., Luo T., Tan J., Li M., Guo J. Osteoimmunology' offers new perspectives for the treatment of pathological bone loss. *Curr. Pharm. Des.*, 2017, Vol. 23, no. 41, pp. 6272-6278.
90. Lubberts E., Koenders M.I., van der Berg W.B. The role of T-cell interleukin-17 in conducting destructive arthritis: lessons from animal models. *Arthritis Res. Ther.*, 2005, Vol. 7, pp. 29-37.
91. Lüllmann-Rauch R., Paulsen F. Taschenlehrbuch Histologie. 10 Tabellen. 4th ed Stuttgart: Thieme, 2012.
92. Lundberg K., Wegner N., Yucel-Lindberg T., Venables P.J. Periodontitis in RA-the citrullinated enolase connection. *Nat. Rev. Rheumatol.*, 2010, Vol. 6, no. 12, pp. 727-730.
93. Luz-Crawford P., Kurte M., Bravo-Alegría J., Contreras R., Nova-Lamperti E., Tejedor G., Noël D., Jorgensen C., Figueroa F., Djouad F., Carrión F. Mesenchymal stem cells regenerate a CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T cell population during the differentiation process of Th1 and Th17 cells. *Stem Cell Res. Ther.*, 2013, Vol. 4, 65. doi: 10.1186/scrt216.
94. Maddur M.S., Miossec P., Kaveri S.V., Bayry J. Th17 cells: biology, pathogenesis of autoimmune and inflammatory diseases, and therapeutic strategies. *Am. J. Pathol.*, 2012, Vol. 181, pp. 8-18.
95. Manabe N., Kawaguchi H., Chikuda H., Miyaura C., Inada M., Nagai R. Connection between B lymphocyte and osteoclast differentiation pathways. *J. Immunol.*, 2001, Vol. 167, pp. 2625-2631.
96. Manolagas S.C., O'Brien C.A., Almeida M. The role of estrogen and androgen receptors in bone health and disease. *Nat. Rev. Endocrinol.*, 2013, Vol. 9, pp. 699-712.

97. Mansour A., Abou-Ezzi G., Sitnicka E., Jacobsen S.E., Wakkach A., Blin-Wakkach C. Osteoclasts promote the formation of hematopoietic stem cell niches in the bone marrow. *J. Exp. Med.*, 2012, Vol. 209, pp. 537-549.
98. Mansour A., Wakkach A., Blin-Wakkach C. Emerging roles of osteoclasts in the modulation of bone microenvironment and immune suppression in multiple myeloma. *Front. Immunol.*, 2017, Vol. 8, 954. doi: 10.3389/fimmu.2017.00954.
99. Mantovani A., Sica A., Sozzani S., Allavena P., Vecchi A., Locati M. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol.*, 2004, Vol. 25, pp. 677-686.
100. Maruhashi T., Kaifu T., Yabe R., Seno A., Chung S.H., Fujikado N., Iwakura Y. DCIR maintains bone homeostasis by regulating IFN-gamma production in T cells. *J. Immunol.*, 2015, Vol. 194, pp. 5681-5691.
101. Matsumoto T., Kuriwaka-Kido R., Kondo I., Kido S. Regulation of osteoblast differentiation by interleukin-11 via AP-1 and Smad signaling. *Endocr J.*, 2012, Vol. 59, pp. 91-101.
102. Michalski M.N., McCauley L.K. Macrophages and skeletal health. *Pharmacol Ther.*, 2017, Vol. 174, pp. 43-54.
103. Miller J.P., Izon D., DeMuth W., Gerstein R., Bhandoola A., Allman D. The earliest step in B lineage differentiation from common lymphoid progenitors is critically dependent upon interleukin 7. *J. Exp. Med.*, 2002, Vol. 196, pp. 705-711.
104. Miyaura C., Onoe Y., Inada M., Maki K., Ikuta K., Ito M., Suda T. Increased B-lymphopoiesis by interleukin 7 induces bone loss in mice with intact ovarian functions: similarity to estrogen deficiency. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 1997, Vol. 94, pp. 9360-9065.
105. Mohamad S.F., Xu L., Ghosh J., Childress P.J., Abeysekera I., Himes E.R. Osteomacs interact with megakaryocytes and osteoblasts to regulate murine hematopoietic stem cell function. *Blood Adv.*, 2017, Vol. 1, pp. 2520-2528.
106. Mohty M., Malard F., Mohty B., Savani B., Moreau P., Terpos E. The effects of bortezomib on bone disease in patients with multiple myeloma. *Cancer*, 2014, Vol. 120, pp. 618-623.
107. Moon Y.M., Yoon B.Y., Her Y.M., Oh H.J., Lee J.S., Kim K.W. IL-32 and IL-17 interact and have the potential to aggravate osteoclastogenesis in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res. Ther.*, 2012, Vol. 14, R246. doi: 10.1186/ar4089.
108. Mori G., D'Amelio P., Faccio R., Brunetti G. The Interplay between the bone and the immune system. *Clin. Dev. Immunol.*, 2013, Vol. 2013, 720504. doi: 10.1155/2013/720504.
109. Mortaz E., Alipoor S.D., Adcock I.M., Mumby S., Koenderman L. Update on neutrophil function in severe inflammation. *Front Immunol.*, 2018, Vol. 9, 2171. doi: 10.3389/fimmu.2018.
110. Mosser D.M., Edwards J.P. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat. Rev. Immunol.*, 2008, Vol. 8, pp. 958-969.
111. Moutsopoulos N.M., Konkel J., Sarmadi M., Eskin M.A., Wild T., Dutzan N. Defective neutrophil recruitment in leukocyte adhesion deficiency type I disease causes local IL-17-driven inflammatory bone loss. *Sci. Transl. Med.*, 2014, Vol. 6, 229ra40. doi: 10.1126/scitranslmed.3007696.
112. Murray P.J., Allen J.E., Biswas S.K., Fisher E.A., Gilroy D.W., Goerdt S. Macrophage activation and polarization: nomenclature and experimental guidelines. *Immunity*, 2014, Vol. 41, pp. 14-20.
113. Nagasawa T. Microenvironmental niches in the bone marrow required for B-cell development. *Nat. Rev. Immunol.*, 2006, Vol. 6, pp. 107-116.
114. Nakase T., Yoshikawa H. Potential roles of bone morphogenetic proteins (BMPs) in skeletal repair and regeneration. *J. Bone Miner. Metab.*, 2006, Vol. 24, pp. 425-433.
115. Nam D., Mau E., Wang Y., Wright D., Silkstone D., Whetstone H., Whyne C., Alman B. T-lymphocytes enable osteoblast maturation via IL-17F during early phase of fracture repair. *PLoS One*, 2012, Vol. 7, e40044. doi: 10.1371/journal.pone.0040044.
116. Noonan K., Marchionni L., Anderson J., Pardoll D., Roodman G.D., Borrello I. A novel role of IL-17-producing lymphocytes in mediating lytic bone disease in multiple myeloma. *Blood*, 2010, Vol. 116, pp. 3554-3563.
117. Okamoto K., Nakashima T., Shinohara M., Negishi-Koga T., Komatsu N., Terashima A., Sawa S., Nitta T., Takayanagi H. Osteoimmunology: the conceptual framework unifying the immune and skeletal systems. *Physiol. Rev.*, 2017, Vol. 97, pp. 1295-1349.
118. Omar O.M., Granéli C., Ekström K., Karlsson C., Johansson A., Lausmaa J. The stimulation of an osteogenic response by classical monocyte activation. *Biomaterials*, 2011, Vol. 32, pp. 8190-8204.
119. Onal M., Xiong J., Chen X., Thosten J.D., Almeida J.D., Manolagas S.C., O'Brien C.A. Receptor activator of nuclear factor κ B ligand (RANKL) protein expression by B lymphocytes contributes to ovariectomy-induced bone loss. *J. Biol. Chem.*, 2012, Vol. 287, pp. 29851-29860.
120. Pacifici R., Brown C., Puscheck E., Friedrich E., Slatopolsky E., Maggio D. Effect of surgical menopause and estrogen replacement on cytokine release from human blood mononuclear cells. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 1991, Vol. 88, pp. 5134-5138.
121. Palumbo A., Anderson K. Multiple myeloma. *N. Engl. J. Med.*, 2011, Vol. 364, pp. 1046-1060.
122. Pettit A.R., Walsh N.C., Manning C., Goldring S.R., Gravalles E.M. RANKL protein is expressed at the pannus-bone interface at sites of articular bone erosion in rheumatoid arthritis. *Rheumatology*, 2006, Vol. 45, no. 9, pp. 1068-1076.
123. Piva R., Penolazzi L., Lambertini E., Giordano S., Gambari R. Induction of apoptosis of human primary osteoclasts treated with a transcription factor decoy mimicking a promoter region of estrogen receptor alpha. *Apoptosis*, 2005, Vol. 10, pp. 1079-1094.

124. Ponzetti M., Rucci N. Updates on osteoimmunology: what's new on the cross-talk between bone and immune system. *Front. Endocrinol.*, 2019, Vol. 10, 236. doi: 10.3389/fendo.2019.00236.
125. Poubelle P.E., Chakravarti A., Fernandes M.J., Doiron K., Marceau A.A. Differential expression of RANK, RANK-L, and osteoprotegerin by synovial fluid neutrophils from patients with rheumatoid arthritis and by healthy human blood neutrophils. *Arthritis Res. Ther.*, 2007, Vol. 9, no. 2, R25. doi: 10.1186/ar2137.
126. Pugliese L.S., Gonçalves T.O., Popi A.F., Mariano M., Pesquero J.B., Lopes J.D. B-1 lymphocytes differentiate into functional osteoclast-like cells. *Immunobiology*, 2012, Vol. 217, pp. 336-344.
127. Raisz L.G. Prostaglandins and bone: physiology and pathophysiology. *Osteoarthritis Cartilage*, 1999, Vol. 7, pp. 419-421.
128. Richardson J., Hill A.M., Johnston C.J., McGregor A., Norrish A.R., Eastwood D., Lavy C.B. Fracture healing in HIV-positive populations. *J. Bone Joint Surg. Br.*, 2008, Vol. 90, pp. 988-994.
129. Rifas L., Weitzmann M.N. A novel T cell cytokine, secreted osteoclastogenic factor of activated T cells, induces osteoclast formation in a RANKL-independent manner. *Arthritis Rheumatol.*, 2009, Vol. 60, pp. 3324-3335.
130. Rivollier A., Mazzorana M., Tebib J., Piperno M., Aitsiselmi T., Rabourdin-Combe C., Jurdic P., Servet-Delprat C. Immature dendritic cell transdifferentiation into osteoclasts: a novel pathway sustained by the rheumatoid arthritis microenvironment. *Blood.*, 2004, Vol. 104, pp. 4029-4037.
131. Roodman G.D. Pathogenesis of myeloma bone disease. *Leukemia*, 2009, Vol. 23, pp. 435-441.
132. Santiago-Schwarz F., Anand P., Liu S., Carsons S.E. Dendritic cells (DCs) in rheumatoid arthritis (RA): progenitor cells and soluble factors contained in RA synovial fluid yield a subset of myeloid DCs that preferentially activate Th1 inflammatory-type responses. *J. Immunol.*, 2001, Vol. 167, pp. 1758-1768.
133. Sato K., Suematsu A., Okamoto K., Yamaguchi A., Morishita Y., Kadono Y., Tanaka S., Kodama T., Akira S., Iwakura Y., Cua D.J., Takayanagi H. Th17 functions as an osteoclastogenic helper T cell subset that links T cell activation and bone destruction. *J. Exp. Med.*, 2006, Vol. 203, pp. 2673-2682.
134. Sato M., Asada N., Kawano Y., Wakahashi K., Minagawa K., Kawano H. Osteocytes regulate primary lymphoid organs and fat metabolism. *Cell Metab.*, 2013, Vol. 18, pp. 749-758.
135. Schlundt C., Reinke S., Geissler S., Bucher C. H., Giannini C., Märdian S. Individual Effector/Regulator T cell ratios impact bone regeneration. *Front. Immunol.*, 2019, Vol. 10, 1954. doi: 10.3389/fimmu.2019.01954.
136. Scholtyssek C., Ipseiz N., Böhm C., Krishnacoumar B., Stenzel M., Czerwinski T., Palumbo-Zerr K., Rothe T., Weidner D., Klej A., Stoll C., Distler J., Tuckermann J., Herrmann M., Fabry B., Goldmann W.H., Schett G., Krönke G. NR4A1 regulates motility of osteoclast precursors and serves as target for the modulation of systemic bone turnover. *J. Bone Miner. Res.*, 2018, Vol. 33, pp. 2035-2047.
137. Schroder K., Hertzog P.J., Ravasi T., Hume D.A. Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *J. Leukoc. Biol.*, 2004, Vol. 75, pp. 163-189.
138. Scott D.L., Wolfe F., Hizinga T.W. Rheumatoid arthritis. *Lancet*, 2010, Vol. 376, pp. 1094-108.
139. Seifert M.F., Marks S.C. Jr. Morphological evidence of reduced bone resorption in the osteosclerotic (oc) mouse. *Am. J. Anat.*, 1985, Vol. 172, pp. 141-153.
140. Shinohara M., Koga T., Okamoto K., Sakaguchi S., Arai K., Yasuda H., Takai T., Kodama T., Morio T., Geha R.S., Kitamura D., Kurosaki T., Ellmeier W., Takayanagi H., Takayanagi H. Tyrosine kinases Btk and Tec regulate osteoclast differentiation by linking RANK and ITAM signals. *Cell*, 2008, Vol. 132, pp. 794-806.
141. Simonet W.S., Lacey D.L., Dunstan C.R., Kelley M., Chang M.S., Luthy R., Nguyen H.Q., Wooden S., Bennett L., Boone T., Shimamoto G., DeRose M., Elliott R., Colombero A., Tan H.L., Trail G., Sullivan J., Davy E., Bucay N., Renshaw-Gegg L., Hughes T.M., Hill D., Pattison W., Campbell P., Sander S., Van G., Tarpley J., Derby P., Lee R., Boyle W.J. Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell*, 1997, Vol. 89, pp. 309-319.
142. Söderström K., Stein E., Colmenero P., Purath U., Müller-Ladner U., de Matos C.T., Tarner I.H., Robinson W.H., Engleman E.G. Natural killer cells trigger osteoclastogenesis and bone destruction in arthritis. *Proc. Natl Acad. Sci USA*, 2010, Vol. 107, pp. 13028-13033.
143. Srivastava R.K., Dar H.Y., Mishra P.K. Immunoporosis: immunology of osteoporosis-role of T cells. *Front. Immunol.*, 2018, Vol. 9, 657. doi: 10.3389/fimmu.2018.00657.
144. Srivastava S., Toraldo G., Weitzmann M.N., Cenci S., Ross F.P., Pacifici R. Estrogen decreases osteoclast formation by down-regulating receptor activator of NF-kappa B ligand (RANKL) induced JNK activation. *J. Biol. Chem.*, 2001, Vol. 276, pp. 8836-8840.
145. Steinman R.M., Banchereau J. Taking dendritic cells into medicine. *Nature*, 2007, Vol. 449, pp. 419-426.
146. Suga K., Saitoh M., Fukushima S., Takahashi K., Nara H., Yasuda S., Miyata K. Interleukin-11 induces osteoblast differentiation and acts synergistically with bone morphogenetic protein-2 in C3H10T1/2 cells. *J. Interferon Cytokine Res.*, 2001, Vol. 21, pp. 695-707.
147. Tacke R., Hilgendorf I., Garner H., Waterborg C., Park K., Nowyhed H. The transcription factor NR4A1 is essential for the development of a novel macrophage subset in the thymus. *Sci. Rep.*, 2015, Vol. 5, 10055. doi: 10.1038/srep10055.
148. Takayanagi H. Osteoimmunology: shared mechanisms and crosstalk between the immune and bone systems. *Nat. Rev. Immunol.*, 2007, Vol. 7, pp. 292-304. doi: 10.1038/nri2062.

149. Takayanagi H., Iizuka H., Juji T. Involvement of receptor activator of nuclear factor kappaB ligand/osteoclast differentiation factor in osteoclastogenesis from synovialocytes in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.*, 2000, Vol. 43, no. 2, pp. 259-269.
150. Takeda H., Kikuchi T., Soboku K., Okabe I., Mizutani H., Mitani A., Ishihara Y., Noguchi T. Effect of IL-15 and natural killer cells on osteoclasts and osteoblasts in a mouse coculture. *Inflammation*, 2014, Vol. 37, pp. 657-669.
151. Tang M., Tian L., Luo G., Yu X. Interferon-gamma-mediated osteoimmunology. *Front. Immunol.*, 2018, Vol. 9, pp. 9-13.
152. Terpos E., Ntanasis-Stathopoulos I., Gavriatopoulou M., Dimopoulos M.A. Pathogenesis of bone disease in multiple myeloma: from bench to bedside. *Blood Cancer J.*, 2018, Vol. 8, 7. doi: 10.1038/s41408-017-0037-4.
153. Thomas R., MacDonald K.P., Pettit A.R., Cavanagh L.L., Padmanabha J., Zehntner S. Dendritic cells and the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *J. Leukoc. Biol.*, 1999, Vol. 66, pp. 286-292.
154. Tian B., Wang N., Jiang Q., Tian L., Hu L., Zhang Z. The immunogenic reaction and bone defect repair function of ϵ -poly-L-lysine (EPL)-coated nanoscale PCL/HA scaffold in rabbit calvarial bone defect. *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, 2021, Vol. 7, no. 32 (6), 63. doi: 10.1007/s10856-021-06533-7.
155. Timlin M., Toomey D., Condrón C., Power C., Street J., Murray P., Bouchier-Hayes D. Fracture hematoma is a potent proinflammatory mediator of neutrophil function. *J. Trauma*, 2005, Vol. 58, pp. 1223-1229.
156. Tsukasaki M., Huynh N.C.-N., Okamoto K., Muro R., Muro R., Terashima A., Kurikawa Y., Komatsu N., Pluemsakunthai W., Nitta T., Abe T., Kiyonari H., Okamura T., Sakai M., Matsukawa T., Matsumoto M., Kobayashi Y., Penninger J.M., Takayanagi H. Stepwise cell fate decision pathways during osteoclastogenesis at single-cell resolution. *Nat. Metab.*, 2020, Vol. 2, pp. 1382-1390.
157. van Tuyl L.H.D., Voskuyl A.E., Boers M. Baseline RANKL:OPG ratio and markers of bone and cartilage degradation predict annual radiological progression over 11 years in rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.*, 2010, Vol. 69, no. 9, pp. 1623-1628.
158. Varga C., Maglio M., Ghobrial I.M., Richardson P.G. Current use of monoclonal antibodies in the treatment of multiple myeloma. *Br. J. Haematol.*, 2018, Vol. 181, pp. 447-459.
159. Vi L., Baht G.S., Whetstone H., Mg A., Wei Q., Poon R. Macrophages promote osteoblastic differentiation *in-vivo*: implications in fracture repair and bone homeostasis. *J. Bone Miner. Res.*, 2015, Vol. 30, pp. 1090-1102.
160. Vi L., Baht G.S., Soderblom E.J., Whetstone H., Wei Q., Furman B. Macrophage cells secrete factors including LRP1 that orchestrate the rejuvenation of bone repair in mice. *Nat. Commun.*, 2018, Vol. 9, 5191. doi: 10.1038/s41467-018-07666-0
161. Walker D.G. Bone resorption restored in osteopetrotic mice by transplants of normal bone marrow and spleen cells. *Science*, 1975, Vol. 190, pp. 784-785.
162. Walker D.G., Schwarz E.M., O'Keefe R.J., Ma L., Looney R.J., Ritchlin C.T. Systemic tumor necrosis factor alpha mediates an increase in peripheral CD11b^{high} osteoclast precursors in tumor necrosis factor alpha-transgenic mice. *Arthritis Rheum.*, 2004, Vol. 50, pp. 265-276.
163. Wang C.W., Yu S.H., Fretwurst T., Larsson L., Sugai J.V., Oh J. Maresin 1 promotes wound healing and socket bone regeneration for alveolar ridge preservation. *J. Dent. Res.*, 2020, Vol. 99, pp. 930-937.
164. Wei J., Karsenty G. An overview of the metabolic functions of osteocalcin. *Curr. Osteopor. Rep.*, 2013, Vol. 13, pp. 80-85.
165. Weitzmann M.N. T-cells and B-cells in osteoporosis. *Curr. Opin. Endocrinol. Diabetes Obes.*, 2014, Vol. 21, pp. 461-467.
166. Wu X., Chen H., Wang Y., Gu Y. Akt2 affects periodontal inflammation via altering the M1/M2 ratio. *J. Dent. Res.*, 2020, Vol. 99, pp. 577-587.
167. Xiong Q., Zhang I., Ge W., Tang P. The roles of interferons in osteoclasts and osteoclastogenesis. *Joint Bone Spine*, 2016, Vol. 83, pp. 276-281.
168. Yaccoby S. Advances in the understanding of myeloma bone disease and tumour growth. *Br. J. Haematol.*, 2010, Vol. 149, pp. 311-321.
169. Yao Z., Li P., Zhang Q., Schwarz E.M., Keng P., Arbin A., Boyce B.F., Xing L. Tumor necrosis factor-alpha increases circulating osteoclast precursor numbers by promoting their proliferation and differentiation in the bone marrow through up-regulation of c-Fms expression. *J. Biol. Chem.*, 2006, Vol. 281, pp. 11846-11855.
170. Yasuda H., Shima N., Nakagawa N., Yamaguchi K., Kinosaki M., Mochizuki S., Tomoyasu A., Yano K., Goto M., Murakami A., Tsuda E., Morinaga T., Higashio K., Udagawa N., Takahashi N., Suda T. Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 1998, Vol. 95, pp. 3597-3602.
171. Yeap B.B., Chubb S.A., Flicker L., McCul K.A., Ebeling P.R., Beilby J.P., Norman P.E. Reduced serum total osteocalcin is associate with metabolic syndrome in older men via waist circumference, hyperglycemia, and triglyceride levels. *Eur. J. Endocrinol.*, 2010, Vol. 163, pp. 265-272.
172. Zaiss M.M., Axmann R., Zwerina J., Polzer K., Gückel E., Skapenko A., Schulze-Koops H., Horwood N., Cope A., Schett G. Treg cells suppress osteoclast formation: a new link between the immune system and bone. *Arthritis Rheum.*, 2007, Vol. 56, pp. 4104-4412.
173. Zaiss M.M., Frey B., Hess A., Zwerina J., Luther J., Nimmerjahn F., Engelke K., Kollias G., Hünig T., Schett G., David J.P. Regulatory T cells protect from local and systemic bone destruction in arthritis. *J. Immunol.*, 2010, Vol. 184, pp. 7238-7246.

174. Zhang J., Niu C., Ye L., Huang H., He X., Tong W.G., Ross J., Haug J., Johnson T., Feng J.Q., Harris S., Wiedemann L.M., Mishina Y., Li L. Identification of the hematopoietic stem cell niche and control of the niche size. *Nature*, 2003, Vol. 425, pp. 836-841.

175. Zhou A., Wu B., Yu H., Tang Y., Liu J., Jia Y., Yang X., Xiang L. Current understanding of osteoimmunology in certain osteoimmune diseases. *Front. Cell Dev. Biol.*, 2021, Vol. 9, 698068. doi: 10.3389/fcell.2021.698068.

176. Zhou A., Yu H., Liu J., Zheng J., Jia Y., Wu B. Role of Hippo-YAP signaling in osseointegration by regulating osteogenesis, angiogenesis, and osteoimmunology. *Front. Cell Dev. Biol.*, 2020, Vol. 8, 780. doi: 10.3389/fcell.2020.00780.

177. Zhu J., Emerson S.G. A new bone to pick: osteoblasts and the haematopoietic stem-cell niche. *Bioessays*, 2004, Vol. 26, pp. 595-599.

178. Zhu J., Garrett R., Jung Y., Kim N., Wang J., Joe G.J., Hexner E., Choi Y., Taichman R.S., Emerson S.G. Osteoblasts support B-lymphocyte commitment and differentiation from hematopoietic stem cells. *Blood*, 2007, Vol. 109, pp. 3706-3712.

Авторы:

Ширинский В.С. — д.м.н., профессор, главный научный сотрудник лаборатории клинической иммунофармакологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

Ширинский И.В. — д.м.н., ведущий научный сотрудник, врач-ревматолог, заведующий лабораторией клинической иммунофармакологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

Authors:

Shirinsky V.S., PhD, MD (Medicine), Professor, Chief Research Associate, Laboratory of Clinical Immunopharmacology, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

Shirinsky I.V., PhD, MD (Medicine), Leading Research Associate, Rheumatologist, Head, Laboratory of Clinical Immunopharmacology, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

Поступила 15.03.2022
Принята к печати 22.03.2022

Received 15.03.2022
Accepted 22.03.2022

М-CSF И GM-CSF ДЕТЕРМИНИРУЮТ ФИБРОМОДУЛИРУЮЩУЮ АКТИВНОСТЬ ПОЛЯРИЗОВАННЫХ МАКРОФАГОВ ЧЕЛОВЕКА

Максимова А.А., Шевела Е.Я., Сахно Л.В., Тихонова М.А.,
Останин А.А., Черных Е.Р.

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии»,
г. Новосибирск, Россия

Резюме. Колонистимулирующие факторы, GM-CSF и M-CSF, вызывают различные фенотипические изменения в популяциях линии макрофагов, способствуя дифференцировке клеток в M1- и M2-подобные макрофаги соответственно. Про- и противовоспалительные свойства макрофагов, генерируемых под влиянием данных колонистимулирующих факторов, хорошо описаны в литературе, однако вклад дифференцировочных и поляризующих сигналов в фибромодулирующую активность макрофагов остается неизученным. Для выяснения различий в регуляторных механизмах, контролирующих фиброгенез, которые присущи различно активированным макрофагам, нами было проведено исследование влияния кондиционных сред макрофагов на пролиферацию и дифференцировку фибробластов дермы. В работе были исследованы макрофаги человека, генерированные из моноцитов периферической крови, которые дифференцировали M-CSF или GM-CSF и далее поляризовали в M1-направлении липополисахаридом и в M2-направлении IL-4 или дексаметазоном. Пролиферативный ответ фибробластов определяли радиометрически по включению [3H]-тимидина. Дифференцировку в миофибробласты определяли по экспрессии специфического маркера α -гладкомышечного актина (α -SMA) с помощью проточной цитометрии. Уровень продукции TGF- β 1 макрофагами оценивали с помощью соответствующего ELISA kit. Полученные результаты свидетельствуют о том, что макрофаги, дифференцированные под влиянием «гомеостатического» M-CSF, характеризуются умеренным стимулирующим влиянием на пролиферацию фибробластов, причем эффекты M2 (IL-4) и M2 (Dex) макрофагов превышают эффекты M1 (LPS), при этом не различаются значимо между собой. M-CSF-индуцированные M1 (LPS) и M2 (IL-4) макрофаги, но не M2 (Dex), также усиливают дифференцировку фибробластов, демонстрируя схожий уровень стимуляции. В отличие от M-CSF, макрофаги, индуцированные «провоспалительным» GM-CSF, оказывают выраженный стимулирующий эффект на пролиферацию фибробластов, причем эффекты M2-макрофагов превышают таковые M1-клеток и наиболее ярко выражены у M2 (Dex). В то же время способность усиливать дифференцировку фибробластов проявляют только GM-CSF-индуцированные макрофаги с M2 (IL-4) фенотипом. Поляризованные дексаметазоном макрофаги – вне зависимости от используемого CSF (M-CSF или GM-CSF) – не влияют значимо на дифференцировку фибробластов. Содержание TGF- β 1 в суперна-

Адрес для переписки:

Максимова Александра Александровна
ФГБНУ «Научно-исследовательский институт
фундаментальной и клинической иммунологии»,
г. Новосибирск, Россия
630099, Россия, г. Новосибирск, ул. Ядринцевская, 14.
Тел.: 8 (383) 222-26-74.
Факс: 8 (383) 222-70-28.
E-mail: parkinson.dses@gmail.com

Address for correspondence:

Maksimova Aleksandra A.
Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology
630099, Russian Federation, Novosibirsk,
Yadrintsevskaya str., 14.
Phone: 7 (383) 222-26-74.
Fax: 7 (383) 222-70-28.
E-mail: parkinson.dses@gmail.com

Образец цитирования:

А.А. Максимова, Е.Я. Шевела, Л.В. Сахно,
М.А. Тихонова, А.А. Останин, Е.Р. Черных «М-CSF
и GM-CSF детерминируют фибромодулирующую
активность поляризованных макрофагов человека» //
Медицинская иммунология, 2022. Т. 24, № 5. С. 931-942.
doi: 10.15789/1563-0625-MCA-2525
© Максимова А.А. и соавт., 2022

For citation:

A.A. Maksimova, E.Ya. Shevela, L.V. Sakhno,
M.A. Tikhonova, A.A. Ostanin, E.R. Chernykh "M-CSF
and GM-CSF determinate fibromodulatory activity of
polarized human macrophages", Medical Immunology
(Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2022, Vol. 24, no. 5,
pp. 931-942. doi: 10.15789/1563-0625-MCA-2525
DOI: 10.15789/1563-0625-MCA-2525

тантах различно активированных макрофагов не коррелирует с уровнем стимулирующего влияния кондиционных сред макрофагов на дифференцировку фибробластов. В целом, полученные данные свидетельствуют о вовлечении дифференцировочных и поляризующих сигналов в модуляцию про- и антифиброгенных свойств макрофагов.

Ключевые слова: макрофаги, колониестимулирующие факторы, поляризующие стимулы, кондиционная среда, фибробласты, фиброз

M-CSF AND GM-CSF DETERMINATE FIBROMODULATORY ACTIVITY OF POLARIZED HUMAN MACROPHAGES

Maksimova A.A., Shevela E.Ya., Sakhno L.V., Tikhonova M.A., Ostanin A.A., Chernykh E.R.

Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

Abstract. GM-CSF and M-CSF, the hematopoietic colony-stimulating factors, induce various phenotypic changes in macrophage lineage populations and promote cell differentiation, respectively, into M1- and M2-like macrophages. The pro- and anti-inflammatory properties of macrophages generated by these colony-stimulating factors are well described, but the contribution of differentiation and polarization signals to the fibromodulatory activity of macrophages remains unexplored. To clarify the differences in the fibrogenesis regulation mechanisms inherent in differently activated macrophages, we studied the effects of macrophage-conditioned media on proliferation and differentiation of dermal fibroblasts. In this study, the human macrophages generated from peripheral blood monocytes were investigated. They were induced for differentiation by M-CSF or GM-CSF, being further polarized in the M1 direction with lipopolysaccharide and, in the M2 direction, with IL-4 or dexamethasone. Proliferative response of the fibroblasts was determined radiometrically by [³H]-thymidine incorporation. Differentiation into myofibroblasts was determined with flow cytometry technique, as expression of a specific marker α -smooth muscle actin (α -SMA). The level of macrophage TGF- β 1 production was assessed using an appropriate ELISA kit. The data obtained indicate that the macrophages differentiated under the influence of “homeostatic” M-CSF are characterized by a moderate stimulating effect upon fibroblast proliferation, and the effects of M2(IL-4) and M2(Dex) macrophages exceed that of M1(LPS), but do not differ significantly from each other. The M-CSF-induced M1(LPS) and M2(IL-4) macrophages, but not M2(Dex), enhance the fibroblast differentiation and show similar level of stimulation. In contrast to M-CSF, the macrophages induced by “pro-inflammatory” GM-CSF exhibit a pronounced stimulatory effect on fibroblast proliferation, and the effects of M2 macrophages exceed those of M1 cells, being most pronounced for M2(Dex). At the same time, only GM-CSF-induced M2(IL-4) macrophages enhance fibroblast differentiation. Dexamethasone-polarized macrophages do not significantly affect fibroblast differentiation regardless of the CSF used (M-CSF or GM-CSF). The content of TGF- β 1 in the supernatants of differently activated macrophages does not correlate with the level of stimulating effect of macrophage-conditioned media upon fibroblast differentiation. In general, the data obtained suggest the involvement of differentiation and polarization signals into modulation of pro- and anti-fibrogenic properties of macrophages.

Keywords: macrophages, colony-stimulating factors, polarizing stimuli, conditioned media, fibroblasts, fibrosis

Работа выполнена в рамках гранта Российского фонда фундаментальных исследований № 19-315-90001, а также за счет средств федерального бюджета на проведение фундаментальных научных исследований по теме «Обоснование и разработка новых технологий иммуномодуляции, стимуляции репаративных процессов и коррекции поведенческих и аддиктивных расстройств на основе использования миелоидных, лимфо-

идных и стволовых клеток и/или продуктов их секрета» (№ госрегистрации 122011800324-4).

Введение

Колониестимулирующие факторы (CSF) играют ключевую роль в функционировании клеток моноцитарно-макрофагального ряда. Впервые описанные как факторы гемопоэза, M-CSF и GM-CSF регулируют функциональную актив-

ность макрофагов как в гомеостатических, так и в воспалительных условиях [27]. При этом М-CSF в большей степени проявляет черты гомеостатического цитокина, который в steady-state условиях конститутивно продуцируется различными типами клеток (эндотелиальными клетками, фибробластами, моноцитами, макрофагами) и регулирует функционирование большинства тканевых макрофагов (Мф) [18, 27]. Роль GM-CSF в steady-state миелопоэзе не так велика, поскольку этот фактор практически не обнаруживается в системном кровотоке [11], а у GM-CSF-дефицитных мышей не наблюдается серьезных нарушений в миелоидной системе [4, 10, 11, 17]. В то же время продукция GM-CSF резко возрастает при воспалении [21], причем GM-CSF, в отличие от М-CSF, может продуцироваться не только эндотелиальными клетками, фибробластами, Мф, но также и Т- и В-лимфоцитами [19, 30].

М-CSF и GM-CSF по-разному модулируют фенотип Мф, способствуя формированию, соответственно, противовоспалительного (про-M2) и провоспалительного (про-M1) фенотипа [7]. Однако ни один из факторов не является достаточным для индукции дефинитивной поляризации по сравнению с поляризующими стимулами (IFN γ , TLRs, IL-4, IL-10 и др.), и как про-M1-, так и про-M2-клетки способны далее поляризоваться в M1- и M2-направлении [12, 25]. Тем не менее тип дифференцировочного фактора, по-видимому, предопределяет функциональные особенности поляризованных Мф [3, 15, 29]. Иными словами, гетерогенность Мф детерминируется не только активирующими сигналами, но и дифференцировочными факторами.

Известно, что Мф являются основными клетками-регуляторами фиброгенеза благодаря своей способности контролировать воспалительную реакцию, участвовать в удалении клеточного детрита и модулировать функциональную активность фибробластов [31]. При этом в зависимости от фазы заживления Мф могут оказывать как стимулирующее, так и ингибирующее влияние на активность фибробластов, включая хоуминг, пролиферацию, дифференцировку и коллаген-секреторную активность. Координированная регуляция функций фибробластов макрофагами определяет успешное восстановление ткани/органа, тогда как нарушение этих взаимодействий или хроническое повреждение приводит к недостаточному восстановлению тканей (незаживающие раны) или чрезмерному фиброгенезу, переходящему в патологическое рубцевание и фиброз органов [14, 32]. При этом в основе контроля репаративных и фибротических процессов лежит способность данных клеток влиять на функци-

ональную активность фибробластов и процесс синтеза/деградации внеклеточного матрикса.

Большинство данных о про- и антифиброгенных свойствах Мф получено *in vivo* на мышинных моделях, поэтому эффекты Мф могут быть опосредованы не только прямым влиянием на функции фибробластов, но и через множество паракринных механизмов [1]. Кроме того, Мф мышинного и человеческого происхождения существенно различаются по функциональным маркерам, сигнальным путям активации, спектру продуцируемых факторов [20, 23, 26]. Поэтому данные, полученные на мышинных моделях, нельзя экстраполировать на человека. Имеющиеся на сегодняшний день исследования Мф человека немногочисленны и преимущественно ограничены двумя оппозиционными подтипами — классически и альтернативно активированными Мф (M1 и M2a) [9, 16]. Кроме того, в подавляющем большинстве работ для генерации M1- и M2-Мф используют различные дифференцировочные факторы — GM-CSF для индукции M1-фенотипа и М-CSF — для M2, что позволяет изучить свойства Мф с оппозиционными фенотипами, но не позволяет оценить вклад дифференцировочных и поляризующих сигналов. Таким образом, вопрос о том, насколько детерминанты фенотипа Мф определяют характер фибромодулирующей активности, остается открытым.

Исследование Мф человека, формирующихся под влиянием различных дифференцировочных (М-CSF/GM-CSF) факторов, в контексте их фибромодулирующих свойств ранее не проводилось. Между тем участие активированных Мф как в накоплении внеклеточного матрикса, так и в разрешении фиброза делает эти клетки перспективными мишенями для лечения заболеваний, связанных с дисрегуляцией фиброгенеза, и требует идентификации фенотипов Мф с про- и антифиброгенными эффектами. Учитывая вышесказанное, **целью настоящего исследования** явился сравнительный анализ влияния М-CSF- и GM-CSF-дифференцированных Мф, поляризованных липополисахаридом (LPS), IL-4 или дексаметазоном (Dex), на пролиферацию и дифференцировку фибробластов дермы.

Материалы и методы

В исследование были включены условно здоровые доноры обоего пола 21-64 лет. Забор крови и дальнейшие исследования проводили после получения письменного информированного согласия. Мононуклеарные клетки (МНК) выделяли центрифугированием гепаринизированной венозной крови в градиенте плотности фиколла-верографина (Sigma-Aldrich, США) и далее культивировали в количестве $4-5 \times 10^6$ /мл в 12-луночных

планшетах (TPP, Швейцария) в среде RPMI-1640 («БиолоТ», Россия), дополненной 0,05 мМ 2-меркаптоэтанола, 2 мМ пирувата натрия, 0,3 мг/мл L-глутамина, 1% незаменимых аминокислот (все реагенты Sigma-Aldrich, США), 10% сыворотки крови плодов коровы (Biowest, США) и 50 нг/мл рекомбинантного M-CSF или GM-CSF (Sigma-Aldrich, США). Через 1 час неадгезивную фракцию клеток удаляли, а адгезивную фракцию продолжали культивировать в течение 7 дней. На 5-й день в культуры добавляли соответствующие поляризующие стимулы: 10 мкг/мл LPS (*E. coli* 0114:B4, Sigma-Aldrich, США), 20 нг/мл IL-4 (Sigma-Aldrich, США), 50 нг/мл Dex (KRKA, Словения). По окончании срока культивирования (7 дней) Мф получали при помощи механической диссоциации, подсчитывали количество клеток и определяли их жизнеспособность (по исключению трипанового синего). Супернатанты собирали, центрифугировали, подвергали стерилизующей фильтрации, криоконсервировали и хранили при температуре -80 °С.

Для определения фенотипа Мф окрашивали CD14-FITC, HLA-DR-PE, CD86-FITC, и CD163-PerCP. Относительное содержание позитивных клеток в культурах Мф оценивали при помощи проточной цитометрии (FACSCalibur, Becton-Dickinson, США). Аллостимуляторную активность определяли по способности Мф стимулировать пролиферацию аллогенных Т-клеток в смешанной культуре лейкоцитов. Для этого МНК (1×10^5 /лунку) культивировали в отсутствие (контроль) или присутствии различных типов Мф (в соотношении МНК:Мф 10:1). Пролиферацию Т-клеток оценивали радиометрически на 5-й день по включению [3H]-тимидина, внесенного за 18 ч до окончания культивации (1 мКю/лунку). Аллостимуляторную активность выражали в виде индекса стимуляции (отношение пролиферативного ответа МНК в присутствии Мф к уровню спонтанной пролиферации МНК).

Источником фибробластов служила линия дермальных фибробластов ожогового больного NAF1, которая была любезно предоставлена ЦКП «Коллекция плюрипотентных культур клеток человека и млекопитающих общепрофилактического и биомедицинского направления» ФИЦ ИЦиГ СО РАН. Пролиферативный ответ клеток линии NAF1 определяли радиометрическим методом. Для этого фибробласты культивировали в 96-луночном планшете (TPP, Швейцария) в концентрации 5×10^3 клеток/лунку в кондиционной среде различно активированных Мф или среде DMEM/F12 («БиолоТ», Россия) (спонтанная пролиферация) в течение 24 ч, затем среду удаляли, клетки однократно отмывали и продолжали культивирование в среде DMEM/F12 до 5 суток.

Пролиферацию фибробластов оценивали радиометрически по включению [3H]-тимидина, внесенного за 18 ч до окончания культивирования (1 мКю/лунку). Индекс стимуляции пролиферации фибробластов рассчитывали как отношение пролиферативного ответа фибробластов, обработанных кондиционными средами различно активированных Мф, к уровню спонтанной пролиферации. Для исследования дифференцировки фибробластов в миофибробласты клетки линии NAF1 культивировали в 12-луночных планшетах (TPP, Швейцария) в кондиционной среде различно активированных Мф в течение 24 ч, затем однократно отмывали 3ФР и продолжали культивировать в бессывороточной среде DMEM/F12 («БиолоТ», Россия) в течение 5 дней. Активацию клеток NAF1 оценивали по уровню внутриклеточной экспрессии α -гладкомышечного актина (α -SMA) с помощью проточной цитометрии с использованием APC-конъюгированными α -SMA-антителами (R&D Systems, США). В качестве позитивного контроля использовали TGF- β 1-индуцированный (PeproTECH, США) уровень экспрессии α -SMA.

Содержание TGF- β 1 в культурах различно активированных Мф исследовали с помощью соответствующего ELISA kit (R&D Systems, США) в соответствии с инструкцией производителя.

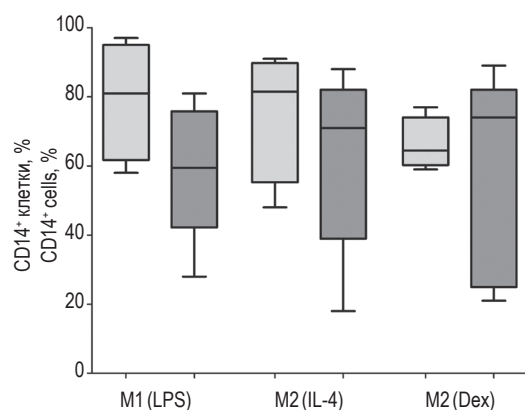
Статистический анализ проводили с использованием возможностей программного обеспечения STATISTICA 8.0 (StatSoft. Inc., США). Данные представлены в виде медианных значений с указанием интерквартильных диапазонов ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$, 25-75% квартили). Значимость различий оценивали с помощью критерия Вилкоксона для связанных выборок и критерия Манна-Уитни; различия считались значимыми при $p < 0,05$.

Результаты

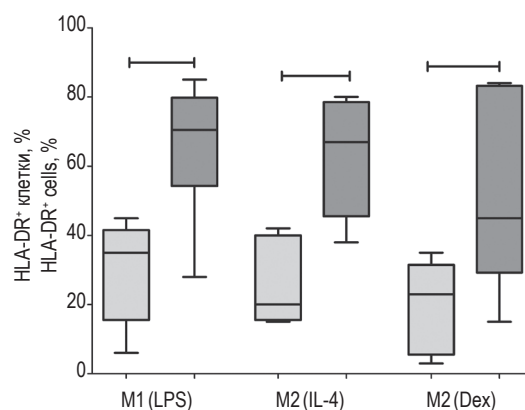
Характеристика макрофагов

Экспрессия определенных молекул, в том числе ассоциированных с M1- или M2-фенотипом, широко используется для характеристики Мф. Сравнительный фенотипический анализ M-CSF- и GM-CSF-дифференцированных Мф (M-Мф и GM-Мф соответственно) представлен на рисунке 1. Независимо от типа поляризующего стимула, культуры M-Мф и GM-Мф содержали значительное количество CD14⁺ клеток и не различались по данному параметру (рис. 1А). В то же время поляризованные GM-Мф отличались от M-Мф значимо большим уровнем HLA-DR⁺ клеток (рис. 1Б). При этом мы не выявили различий по экспрессии CD14 и HLA-DR между различно поляризованными Мф (M1 (LPS), M2 (IL-4) и M2 (Dex)) в популяциях M-Мф и GM-Мф.

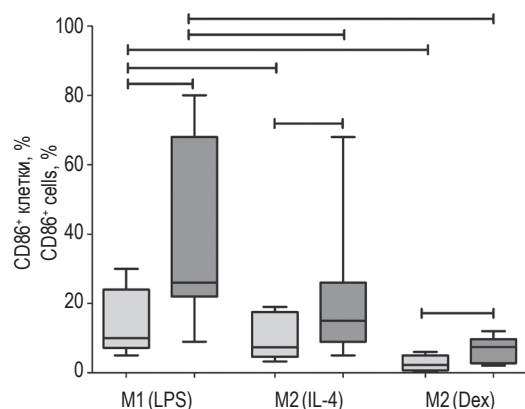
А (A)



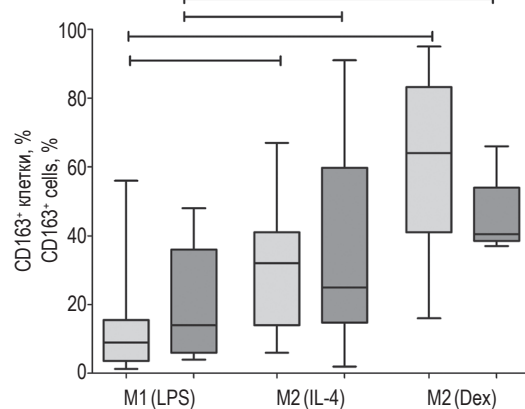
Б (B)



В (C)



Г (D)



■ M-CSF

■ GM-CSF

Рисунок 1. Экспрессия поверхностных маркеров M-CSF- и GM-CSF-дифференцированными макрофагами

Примечание. А-Г – данные по экспрессии CD14, HLA-DR, CD86 и CD163 представлены в виде Me ($Q_{0.25}$ – $Q_{0.75}$) и min-max (n = 5-14).

Figure 1. Expression of surface markers of M-CSF- and GM-CSF-differentiated macrophages

Note. A-D, data on the expression of CD14, HLA-DR, CD86 and CD163 are presented in Me ($Q_{0.25}$ – $Q_{0.75}$) and min-max (n = 5-14).

Содержание CD86 (M1-ассоциированный маркер) в культурах М-Мф, независимо от поляризующего стимула, было в два раза ниже по сравнению с культурами GM-Мф ($p_U < 0,05$). Доля CD163⁺ клеток (M2-ассоциированный маркер, рис. 1Г) в культурах М-Мф была минимальной при поляризации LPS и максимальной – при поляризации дексаметазоном. Аналогичные закономерности наблюдались и в культурах поляризованных GM-Мф. При этом содержание CD163⁺ клеток в культурах поляризованных М-Мф не отличалось от аналогичных показателей GM-Мф ($p_U > 0,05$).

Ранее нами было показано, что отличительным свойством Мф человека с M2-фенотипом является низкая аллостимуляторная активность (способность индуцировать пролиферацию аллогенных Т-клеток в смешанной культуре лейкоцитов), что позволяет различать M1- и M2-фенотипы с высокой чувствительностью и специфичностью [33]. Действительно (рис. 2), Мф, поляризованные LPS (M1), независимо от дифференцировочного фактора, характеризовались значимо более высокими уровнями данного показателя, по сравнению с Мф, поляризованными в M2-направлении (IL-4 и Dex). При этом аллостимуляторная активность GM-Мф с M1-фенотипом

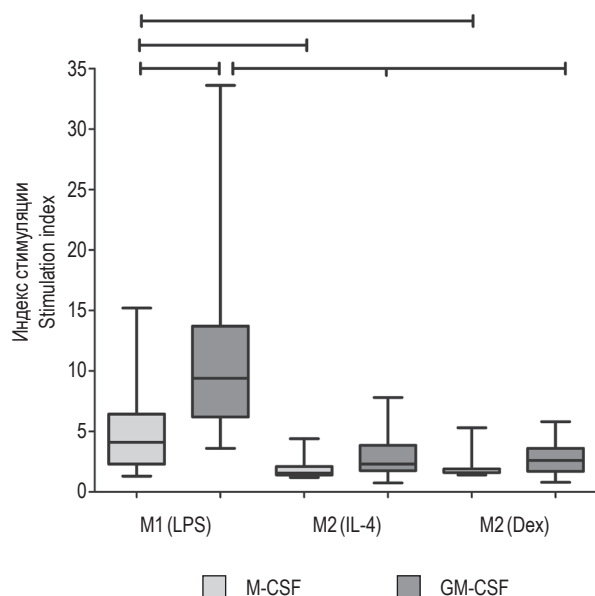


Рисунок 2. Аллостимуляторная активность M-CSF- и GM-CSF-дифференцированных макрофагов
Примечание. Представлены индексы стимуляции пролиферации клеток линии NAF1 (Me ($Q_{0.25}$ - $Q_{0.75}$), min-max); n = 50.

Figure 2. Allostimulatory activity of M-CSF- and GM-CSF-differentiated macrophages

Note. Stimulatory indices of NAF1 cell proliferation (Me ($Q_{0.25}$ - $Q_{0.75}$), min-max) are presented; n = 50.

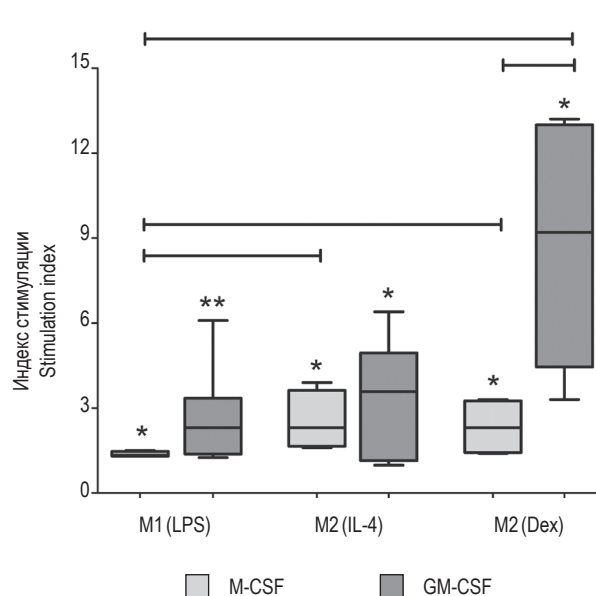


Рисунок 3. Пролиферативный ответ фибробластов, обработанных кондиционной средой различно активированных макрофагов

Примечание. * – значимые различия с контролем, n = 8.

Figure 3. Proliferative response of fibroblasts treated with conditioned media of differently activated macrophages

Note. *, significant differences with the control, n = 8.

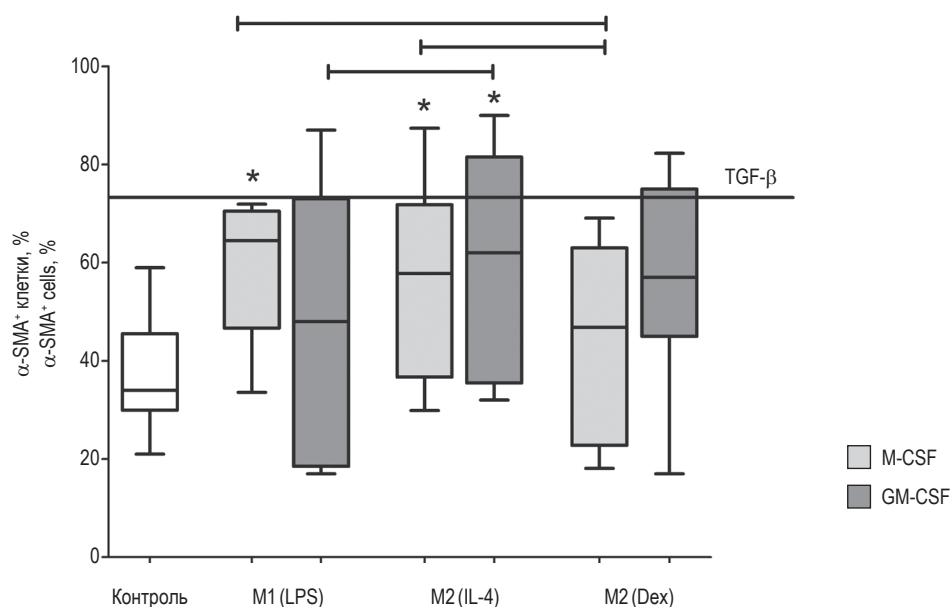


Рисунок 4. Относительное содержание α-SMA-позитивных клеток в культуре фибробластов, обработанных кондиционными средами различно активированных макрофагов

Примечание. * – значимые различия с контролем, линией обозначен уровень TGF-β1-индуцированного (позитивного) контроля; n = 10.

Figure 4. Relative content of α-SMA-positive cells in the culture of fibroblasts treated with conditioned media of differently activated macrophages

Note. *, significant differences with the control, the line indicates the level of TGF-β1-induced (positive) control; n = 10.

превышала таковую М-Мф ($p_U = 0,0009$). В то же время различий в аллостимуляторной активности между М2-поляризованными (IL-4 и Dex) Мф не наблюдалось.

Таким образом, активированные LPS М-Мф и GM-Мф проявляли признаки клеток с M1-фенотипом, тогда как поляризованные IL-4 и Dex Мф характеризовались признаками M2-фенотипа.

Влияние кондиционных сред макрофагов на пролиферацию фибробластов

Поскольку в основе регуляции фиброгенеза макрофагами лежит способность этих клеток регулировать активность фибробластов, основным разделом исследования явилось изучение эффектов Мф на пролиферацию и дифференцировку фибробластов. Анализ влияния кондиционных сред Мф на пролиферативный ответ дермальных фибробластов линии NAF1 показал (рис. 3), что кондиционные среды как М-Мф, так и GM-Мф усиливали пролиферативную активность клеток NAF1. Индекс стимуляции М-Мф варьировал в диапазоне от 1,33 (M1) до 2,3 (M2), причем стимулирующий эффект M2 (IL-4) и M2 (Dex) превышал таковой M1 (LPS) ($p_w < 0,05$). Среди GM-Мф наиболее выраженный стимулирующий эффект проявляли Dex-поляризованные GM-Мф. Индекс стимуляции этих клеток составлял 9,2 и значимо превышал показатели М-CSF-дифференцированных M1 (LPS) и M2 (Dex).

Полученные данные свидетельствуют о том, что способностью к стимуляции пролиферативного ответа дермальных фибробластов обладают как М-Мф, так и GM-Мф, независимо от поляризующего стимула, с максимальным эффектом для GM-Мф, поляризованных дексаметазоном.

Влияние кондиционных сред макрофагов на дифференцировку фибробластов

Важным этапом фиброгенеза является активация фибробластов и приобретение ими миофибробластного фенотипа, что отражает увеличение экспрессии α -гладкомышечного актина, α -SMA. Оценка способности клеток линии дермальных фибробластов NAF1 к спонтанной дифферен-

цировке выявила высокое содержание α -SMA⁺ клеток ($Me = 59\%$, IQR 50-83%) в культуре, что было расценено нами и подтверждено другими авторами [2] как результат влияния ростовых факторов сыворотки (в частности TGF- β). Для исключения влияния сывороточных факторов в дальнейших экспериментах была использована бессывороточная среда DMEM/F12, что позволило существенно снизить уровень спонтанной дифференцировки клеток NAF1 до 34% α -SMA⁺ фибробластов (негативный контроль). В качестве позитивного контроля использовали TGF- β 1-индуцированный уровень экспрессии α -SMA (72,5%).

Анализ влияния кондиционных сред, полученных от М-Мф, на экспрессию α -SMA показал, что как M1 (LPS) и M2 (IL-4) стимулировали дифференцировку фибробластов с одинаковым эффектом. Так, содержание α -SMA⁺ клеток в присутствии указанных кондиционных сред возрастало в 1,8 и 1,7 раза соответственно ($p_w < 0,05$ по сравнению с негативным контролем). В то же время среди исследуемых популяций GM-Мф стимулирующий эффект был выявлен только для M2 (IL-4), тогда как M1 (LPS) и M2 (Dex) не влияли значимо на количество α -SMA⁺ клеток в культурах NAF1.

Таким образом, колониестимулирующий фактор (М-CSF или GM-CSF) оказывал влияние на способность Мф с M1-фенотипом индуцировать дифференцировку дермальных фибробластов *in vitro*. Напротив, эффекты Мф с M2-фенотипом на дифференцировку фибробластов не зависели от CSF и определялись преимущественно поляризующим стимулом, поскольку только поляризованные IL-4, но не дексаметазоном, Мф индуцировали экспрессию α -SMA.

Содержание TGF- β 1 в кондиционных средах макрофагов

Поскольку одним из ключевых факторов дифференцировки фибробластов является TGF- β 1, анализ содержания данного ростового фактора в культурах Мф в сопоставлении с данными по экспрессии α -SMA на фибробластах представ-

ТАБЛИЦА 1. СОДЕРЖАНИЕ TGF- β 1 (пг/мл) В КОНДИЦИОННЫХ СРЕДАХ 7-ДНЕВНЫХ КУЛЬТУР МАКРОФАГОВ, Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)

TABLE 1. CONTENT OF TGF- β 1 (pg/mL) IN CONDITIONED MEDIA OF 7-DAY MACROPHAGE CULTURES, Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)

	M-CSF	GM-CSF
M1 (LPS)	2150 (645-4400)	4700 (3350-6000)
M2 (IL-4)	4680 (960-5250)	4850 (4200-7250)
M2 (Dex)	4550 (620-5400)	4100 (1850-5950)*

Примечание. n = 5-8. * – $p < 0,05$ по сравнению с GM-CSF-дифференцированными M2 (IL-4).

Note. n = 5-8. *, $p < 0.05$ compared with GM-CSF-differentiated M2 (IL-4).

лялся логичным. Из данных таблицы 1 видно, что и М-Мф, и GM-Мф активно продуцировали TGF- β 1, не различаясь значимо, вопреки ожиданиям, между собой по уровню продукции фактора. В то же время среди М-Мф, LPS-поляризованные М1-клетки демонстрировали наиболее низкий уровень продукции TGF- β 1 по сравнению с М2(IL-4) (на уровне тренда, $p_w = 0,07$). При этом М2(Dex) не отличались ни от М1(LPS), ни от М2(IL-4) по содержанию TGF- β 1. Среди GM-Мф М1(LPS) и М2(IL-4) не различались по уровню продукции TGF- β 1, в то время как М2(Dex) характеризовались минимальной TGF- β 1-продуцирующей активностью и значимо отличались от М2(IL-4) ($p_w = 0,017$).

Обсуждение

Полученные данные в целом свидетельствуют о том, что способностью к стимуляции пролиферации дермальных фибробластов обладают как М-Мф, так и GM-Мф, независимо от поляризующего стимула. При этом М-Мф характеризуются умеренным стимулирующим эффектом, и макрофаги с М2-фенотипом (поляризованные IL-4 и Dex) обладают более выраженной стимулирующей активностью, чем М1. В отличие от М-Мф, дифференцированные в присутствии GM-CSF макрофаги более эффективно стимулируют пролиферацию фибробластов с наибольшей стимулирующей активностью у М2(Dex). Дифференцировку фибробластов стимулируют на сопоставимом уровне М-CSF-индуцированные М1(LPS) и М2(IL-4), в то время как среди GM-Мф такой способностью обладают только М2(IL-4). Поляризованные дексаметазоном Мф, вне зависимости от используемого CSF (М-CSF или GM-CSF), не индуцируют дифференцировку фибробластов.

В доступной литературе нам не удалось найти сравнимого по объему исследования, что существенно затрудняет обсуждение представленных данных. В большом количестве исследований для получения М1-фенотипа используется GM-CSF, а для М2 — М-CSF [8, 28, 34]. Позднее было показано, что Мф любого функционального фенотипа (и М1, и М2) могут быть получены как из GM-CSF-, так и М-CSF-дифференцированных Мф [12, 25], однако подобные исследования представлены единичными работами. При этом вопросы взаимодействия Мф и фибробластов и, в частности, фибромодулирующих свойств Мф с различными фенотипами, остаются практически неизученными.

Ploeger и соавт. показали, что М-CSF-дифференцированные Мф, активированные IFN γ /LPS, отличаются от М2(IL-4/IL-13) менее выраженным стимулирующим эффектом на про-

лиферацию дермальных фибробластов [16]. Эти данные согласуются с полученными нами результатами, несмотря на использование авторами комбинации поляризующих сигналов (IFN γ /LPS и IL-4/IL-13), а не моностимулов (LPS и IL-4). Авторы отметили также усиление экспрессии мРНК α -SMA в фибробластах, обработанных кондиционными средами М2(IL-4/IL-13), но не М1(IFN γ /LPS). Однако на уровне экспрессии белка данные различия не были обнаружены. Эти результаты в целом согласуются с полученными нами данными, демонстрирующими, что М-Мф, активированные LPS, характеризуются значимо меньшим стимулирующим эффектом на пролиферацию фибробластов по сравнению с М2(IL-4), однако не различаются по влиянию на уровень экспрессии α -SMA.

В другом исследовании Glim и соавт. изучали влияние спонтанно дифференцированных Мф (без использования CSF) и поляризованных IFN γ /LPS (М1) или IL-4 (М2), на дифференцировку фибробластов. Согласно полученным ими данным, кондиционные среды М2-Мф повышали экспрессию α -SMA, тогда как М1 характеризовались тенденцией к подавлению дифференцировки фибробластов [9], что расходится с результатами наших исследований. Причинами таких расхождений могут быть различия в протоколах генерации Мф, в частности дифференцировка макрофагов в отсутствие колониестимулирующих факторов. Более того, неоднозначность данных по влиянию М1-Мф на дифференцировку фибробластов может указывать на важное значение CSF как дифференцировочных стимулов в реализации фиброгенной активности Мф.

Следует отметить, что для поляризации М2-макрофагов авторы использовали IL-4, в то время как другие типы М2-Мф, в частности поляризованные дексаметазоном, оставались неисследованными. Между тем, высвобождение кортикостероидов является важным эндогенным фактором, определяющими переход от воспалительной к пролиферативной и ремоделирующей фазам репаративного ответа. В присутствии дексаметазона Мф приобретают противовоспалительный М2-подобный фенотип (М2с), который, как предполагается, проявляет антифиброгенную активность [1], что было подтверждено у экспериментальных животных [6, 24]. С другой стороны, у человека спонтанно индуцированные Мф, поляризованные IL-4 и Dex, не различаются по фибромодулирующей активности [22]. Согласно нашим данным, М-CSF-дифференцированные М2(IL-4) и М2(Dex) действительно не различались по влиянию на пролиферативный ответ фибробластов, однако стимулирующий эффект GM-CSF-дифференцированных М2(Dex) более

чем в два раза превышал эффекты других функциональных фенотипов. Примечательно, что вне зависимости от используемого CSF, M2(Dex) не влияли на содержание α -SMA⁺ клеток в отличие от M2(IL-4). Таким образом, полученные нами данные указывают на то, что поляризованные дексаметазоном Мф человека отличаются от M2(IL-4) по своим фибромодулирующим свойствам, что противоречит данным Song и соавт. и, вероятнее всего, связано с отсутствием CSF в протоколе генерации Мф в этой работе [22].

Известно, что TGF- β 1 является важным фактором дифференцировки фибробластов [5, 13], поэтому высокий уровень его продукции в культурах M2(IL-4) может объяснить выраженное стимулирующее влияние Мф этого фенотипа на дифференцировку NAF1. Тем не менее TGF- β 1, по-видимому, является не единственным фактором, опосредующим влияние Мф на экспрессию α -SMA фибробластами. Так, M-CSF-дифференцированные M1(LPS) продуцировали меньшие концентрации TGF- β 1 по сравнению с M2(IL-4), но обладали сопоставимым стимулирующим эффектом на дифференцировку фибробластов. С другой стороны, GM-CSF-дифференцированные M1(LPS) и M2(IL-4), несмотря на одинаковый уровень продукции TGF- β 1, оказывали различное влияние на дифференцировку фибробластов. Наконец, мы не выявили связи между концентрацией TGF- β 1 и уровнем экспрессии α -SMA в отношении

M2(Dex). Полученные результаты вполне согласуются с работой Glim и соавт., продемонстрировавших, что спонтанно дифференцированные M1(IFN γ /LPS) и M2(IL-4) стимулируют экспрессию α -SMA преимущественно через TGF- β -независимые механизмы [9].

Непосредственное сравнение фибромодулирующих свойств М-Мф и GM-Мф показывает, что одно из наиболее принципиальных различий касается Мф с M1-фенотипом. В частности, GM-CSF-стимулированные M1(LPS) значительно превышают M-CSF-индуцированные M1-клетки по способности усиливать пролиферацию фибробластов, в то же время уступая по стимулирующему влиянию на дифференцировку последних. Другое различие касается M2(Dex). Действительно, по сравнению с M-CSF, GM-CSF многократно усиливает способность поляризованных дексаметазоном Мф стимулировать пролиферацию дермальных фибробластов.

Заключение

Таким образом, дифференцировочные факторы, наряду с поляризующими стимулами, вносят существенный вклад в фибромодулирующую активность фибробластов, что следует учитывать при разработке клеточных платформ для лечения заболеваний, связанных с дисрегуляцией фиброгенеза.

Список литературы / References

1. Adhyatmika A., Putri K.S., Beljaars L., Melgert B.N. The elusive antifibrotic macrophage. *Front. Med. (Lausanne)*, 2015, Vol. 2, 81. doi: 10.3389/fmed.2015.00081.
2. Baranyi U., Winter B., Gugerell A., Hegedus B., Brostjan C., Laufer G., Messner B. Primary human fibroblasts in culture switch to a myofibroblast-like phenotype independently of TGF Beta. *Cells*, 2019, Vol. 8, no. 7, 721. doi: 10.3390/cells8070721.
3. Beyer M., Mallmann M.R., Xue J., Staratschek-Jox A., Vorholt D., Krebs W., Sommer D., Sander J., Mertens C., Nino-Castro A., Schmidt S.V., Schultze J.L. High-resolution transcriptome of human macrophages. *PLoS One*, 2012, Vol. 7, no. 9, e45466. doi: 10.1371/journal.pone.0045466.
4. Bogunovic M., Ginhoux F., Helft J., Shang L., Hashimoto D., Greter M., Liu K., Jakubzick C., Ingersoll M.A., Leboeuf M., Stanley R., Nussenzweig M., Lira S.A., Randolph G.J., Merad M. Origin of the lamina propria dendritic cell network. *Immunity*, 2009, Vol. 31, no. 3, pp. 513-525.
5. Borthwick L.A., Wynn T.A., Fisher A.J. Cytokine mediated tissue fibrosis. *Biochim. Biophys. Acta*, 2013, Vol. 1832, no. 7, pp. 1049-1060.
6. Duan J., Liu, X., Wang, H., Guo, S. W. The M2a macrophage subset may be critically involved in the fibrogenesis of endometriosis in mice. *Reprod. Biomed. Online*, 2018, Vol. 37, no. 3, pp. 254-268.
7. Fleetwood A.J., Dinh H., Cook A.D., Hertzog P.J., Hamilton J.A. GM-CSF- and M-CSF-dependent macrophage phenotypes display differential dependence on type I interferon signaling. *J. Leukoc. Biol.*, 2009, Vol. 86, no. 2, pp. 411-421.
8. Gindele J.A., Mang S., Pairet N., Christ I., Gantner F. Schymeinsky J., Lamb D.J. Opposing effects of *in vitro* differentiated macrophages sub-type on epithelial wound healing. *PLoS One*, 2017, Vol. 12, no. 9, e0184386. doi: 10.1371/journal.pone.0184386.

9. Glim J.E., Niessen F.B., Everts V., van Egmond M., Beelen R.H. Platelet derived growth factor-CC secreted by M2 macrophages induces alpha-smooth muscle actin expression by dermal and gingival fibroblasts. *Immunobiology*, 2013, Vol. 218, no. 6, pp. 924-929.
10. Hamilton J.A. Colony-stimulating factors in inflammation and autoimmunity. *Nat. Rev. Immunol.*, 2008, no. 8, pp. 533-544.
11. Hamilton J.A., Anderson G.P. GM-CSF Biology. *Growth Factors*, 2004, Vol. 22, no. 4, pp. 225-231.
12. Jaguin M., Houlbert N., Fardel O., Lecureur V. Polarization profiles of human M-CSF-generated macrophages and comparison of M1-markers in classically activated macrophages from GM-CSF and M-CSF origin. *Cell Immunol.*, 2013, Vol. 281, no. 1, pp. 51-61.
13. Luzina I.G., Meng X.M., Nikolic-Paterson D.J., Lan H.Y. TGF- β : the master regulator of fibrosis. *Nat. Rev. Nephrol.*, 2016, Vol. 12, no. 6, pp. 325-338.
14. Mescher AL. Macrophages and fibroblasts during inflammation and tissue repair in models of organ regeneration. *Regeneration (Oxf.)*, 2017, Vol. 4, no. 2, pp. 39-53.
15. Orecchioni M., Ghosheh Y., Pramod A.B., Ley K. Macrophage Polarization: Different Gene Signatures in M1 (LPS+) vs. Classically and M2 (LPS-) vs. Alternatively Activated Macrophages. *Front. Immunol.*, 2019, no. 10, 1084. doi: 10.3389/fimmu.2019.01084.
16. Ploeger D.T., Hosper N.A., Schipper M., Koerts J.A., de Rond S., Bank R.A. Cell plasticity in wound healing: paracrine factors of M1/ M2 polarized macrophages influence the phenotypical state of dermal fibroblasts. *Cell Commun. Signal.*, 2013, Vol. 11, no. 1, 29. doi: 10.1186/1478-811X-11-29.
17. Shi Y., Liu C.H., Roberts A.I., Das J., Xu G., Ren G., Zhang Y., Zhang L., Yuan Z.R., Tan H.S., Das G., Devadas S. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) and T-cell responses: what we do and don't know. *Cell Res.*, 2006, Vol. 16, no. 2, pp. 126-133.
18. Shibata Y., Berclaz P.Y., Chroneos Z.C., Yoshida M., Whitsett J.A., Trapnell B.C. GM-CSF regulates alveolar macrophage differentiation and innate immunity in the lung through PU.1. *Immunity*, 2001, Vol. 15, no. 4, pp. 557-567.
19. Shiomi A., Usui T. Pivotal roles of GM-CSF in autoimmunity and inflammation. *Mediators Inflamm.*, 2015, Vol. 2015, 568543. doi: 10.1155/2015/568543.
20. Shiratori H., Feinweber C., Luckhardt S., Linke B., Resch E., Geisslinger G., Weigert A., Parnham M.J. THP-1 and human peripheral blood mononuclear cell-derived macrophages differ in their capacity to polarize *in vitro*. *Mol. Immunol.*, 2017, Vol. 88, pp. 58-68.
21. Sierra-Filardi E., Nieto C., Domínguez-Soto A., Barroso R., Sánchez-Mateos P., Puig-Kroger A., López-Bravo M., Joven J., Ardavín C., Rodríguez-Fernández J.L., Sánchez-Torres C., Mellado M., Corbí A.L. CCL2 shapes macrophage polarization by GM-CSF and M-CSF: identification of CCL2/CCR2-dependent gene expression profile. *J. Immunol.*, 2014, Vol. 192, no. 8, pp. 3858-3867.
22. Song E., Ouyang N., Hörbelt M., Antus B., Wang M., Exton M.S. Influence of alternatively and classically activated macrophages on fibrogenic activities of human fibroblasts. *Cell. Immunol.*, 2000, Vol. 204, no. 1, pp. 19-28.
23. Spiller K.L., Wrona E.A., Romero-Torres S., Pallotta I., Graney P.L., Witherel C.E., Panicker L.M., Feldman R.A., Urbanska A.M., Santambrogio L., Vunjak-Novakovic G., Freytes D.O. Differential gene expression in human, murine, and cell line-derived macrophages upon polarization. *Exp. Cell Res.*, 2016, Vol. 347, no. 1, pp. 1-13.
24. Tang L., Zhang H., Wang C., Li H., Zhang Q., Bai J. M2A and M2C macrophage subsets ameliorate inflammation and fibroproliferation in acute lung injury through interleukin 10 pathway. *Shock*, 2017, Vol. 48, no. 1, pp. 119-129.
25. Tarique A.A., Logan J., Thomas E., Holt P.G., Sly P.D., Fantino E. Phenotypic, functional, and plasticity features of classical and alternatively activated human macrophages. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, 2015, Vol. 53, no. 5, pp. 676-688.
26. Tedesco S., de Majo F., Kim J., Trenti A., Trevisi L., Fadini G.P., Bolego C., Zandstra P.W., Cignarella A., Vitiello L. Convenience versus biological significance: Are PMA-Differentiated THP-1 cells a reliable substitute for blood-derived macrophages when studying *in vitro* polarization? *Front. Pharmacol.*, 2018, Vol. 9, 71. doi: 10.3389/fphar.2018.00071.
27. Ushach I., Zlotnik A. Biological role of granulocyte macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) and macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) on cells of the myeloid lineage. *J. Leukoc. Biol.*, 2016, Vol. 100, no. 3, pp. 481-489.
28. Verreck F.A., de Boer T., Langenberg D.M., van der Zanden L., Ottenhoff T.H. Phenotypic and functional profiling of human proinflammatory type-1 and anti-inflammatory type-2 macrophages in response to microbial antigens and IFN- γ - and CD40L-mediated costimulation. *J. Leukoc. Biol.*, 2006, Vol. 79, no. 2, pp. 285-293.
29. Vogel D.Y., Glim J.E., Stavenuiter A.W., Breur M., Heijnen P., Amor S., Dijkstra C.D., Beelen R.H. Human macrophage polarization *in vitro*: maturation and activation methods compared. *Immunobiology*, 2014, Vol. 219, no. 9, pp. 695-703.

30. Wicks I.P., Roberts A.W. Targeting GM-CSF in inflammatory diseases. *Nat. Rev. Rheumatol.*, 2016, Vol. 12, no. 1, pp. 37-48.
31. Wynn T., Barron L. Macrophages: master regulators of inflammation and fibrosis. *Semin. Liver. Dis.*, 2010, Vol. 30, no. 3, pp. 245-257.
32. Xu X., Gu S., Huang X., Ren J., Gu Y., Wei C., Lian X., Li H., Gao Y., Jin R., Gu B., Zan T., Wang Z. The role of macrophages in the formation of hypertrophic scars and keloids. *Burns Trauma*, 2020, Vol. 8, tkaa006. doi: 10.1093/burnst/tkaa006.
33. Yankovskaya A.A., Shevela E.Y., Sakhno L.V., Tikhonova M.A., Dome A.S., Ostanin A.A., Chernykh E.R. Allostimulatory activity as a criterion of the functional phenotype of human macrophages. *Hum. Immunol.*, 2019, Vol. 80, no. 10, pp. 890-896.
34. Zizzo G., Hilliard B.A., Monestier M., Cohen P.L. Efficient clearance of early apoptotic cells by human macrophages requires M2c polarization and MerTK induction. *J. Immunol.*, 2012, Vol. 189, no. 7, pp. 3508-3520.

Авторы:

Максимова А.А. — к.м.н., младший научный сотрудник лаборатории клеточной иммунотерапии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

Шевела Е.Я. — д.м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории клеточной иммунотерапии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

Сахно Л.В. — к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории клеточной иммунотерапии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

Authors:

Maksimova A.A., PhD (Mecicine), Junior Research Associate, Laboratory of Cellular Immunotherapy, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

Shevela E.Ya., PhD, MD (Mecicine), Leading Research Associate, Laboratory of Cellular Immunotherapy, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

Sakhno L.V., PhD (Biology), Senior Research Associate, Laboratory of Cellular Immunotherapy, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

Тихонова М.А. — к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории клеточной иммунотерапии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

Останин А.А. — д.м.н., профессор, главный научный сотрудник лаборатории клеточной иммунотерапии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

Черных Е.Р. — д.м.н., профессор, член-корр. РАН, заведующая лабораторией клеточной иммунотерапии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

Tikhonova M.A., PhD (Biology), Senior Research Associate, Laboratory of Cellular Immunotherapy, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

Ostanin A.A., PhD, MD (Medicine), Professor, Chief Research Associate, Laboratory of Cellular Immunotherapy, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

Chernykh E.R., PhD, MD (Medicine), Professor, Corresponding Member, Russian Academy of Sciences, Head, Laboratory of Cellular Immunotherapy, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

Поступила 20.05.2022
Принята к печати 22.05.2022

Received 20.05.2022
Accepted 22.05.2022

ЦИТОКИНОВЫЙ ПРОФИЛЬ ПРИ ВНЕБОЛЬНИЧНОЙ ПНЕВМОНИИ У ДЕТЕЙ

Изюрова Н.В.¹, Савочкина А.Ю.¹, Узунова А.Н.¹, Нохрин Д.Ю.²

¹ ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Челябинск, Россия

² ФГБОУ ВО «Челябинский государственный университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Челябинск, Россия

Резюме. Внебольничная пневмония относится к числу наиболее распространенных острых инфекционных заболеваний. Заболеваемость внебольничной пневмонией среди детского населения значительно снизилась во всем мире, главным образом, из-за все более широкого использования эффективных средств профилактики. Тем не менее внебольничная пневмония остается распространенной причиной детской заболеваемости и смертности. Пневмония может развиваться в любом возрасте, но чаще всего она возникает у детей раннего возраста, у которых чаще встречается и более тяжелое течение пневмонии. Ранняя диагностика и прогноз тяжести заболевания у детей являются актуальной проблемой на современном этапе. Было обнаружено, что в большинстве случаев комбинация традиционных биомаркеров, включая количество лейкоцитов, прокальцитонин, СРБ недостаточно эффективны в диагностике внебольничной пневмонии у детей. Актуальным является поиск новых маркеров, позволяющих в дополнение к клинической оценке существенно улучшить диагностику и ведение внебольничной пневмонии у детей и уменьшить неблагоприятные исходы, связанные с этим заболеванием. Такими маркерами могут стать цитокины, которые являются активными участниками патогенеза при внебольничной пневмонии. Целью данного исследования стало определение уровня ряда цитокинов в сыворотке крови у детей с ВП и оценка изменения цитокинового профиля в зависимости от влияния факторов: возраст пациента и тяжесть заболевания. В исследовании были включены 117 детей в возрасте от 1 года до 18 лет с верифицированным диагнозом внебольничной пневмонии, подтвержденной рентгенологически. Группа сравнения сформирована из 28 здоровых детей, не имеющих на момент обследования внебольничной пневмонии, а также других признаков острой респираторной вирусной инфекции и не состоящих на диспансерном наблюдении по поводу какой-либо хронической патологии. Были определены уровни следующих цитокинов в сыворотке крови: IL-1 β , IFN γ , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF α , IFN λ 2 (IL-28A), IFN λ 3 (IL-28B), IL-8, MCP-1, IL-17AF, GM-CSF с помощью тест-систем, основанных на «сэндвич»-методе твердофазного ИФА с применением пероксидазы в качестве индикаторного фермента. В результате проведенного исследования было установлено, что содержание IL-6, IL-17AF, IL-1 β , IFN γ , MCP-1, IFN λ 2 (IL-28A), IFN λ 3 (IL-28B), GM-CSF было значительно выше в группе детей с тяжелой внебольничной пневмонией. Уровень таких цитокинов, как IL-6, IFN λ 2 (IL-28A), IFN λ 3 (IL-28B), GM-CSF изменялся в зависимости от возраста пациентов, что может отражать степень активации иммунной системы у детей в различные возрастные периоды.

Ключевые слова: внебольничная пневмония, тяжелая пневмония, дети, цитокины, интерфероны, маркеры пневмонии

Адрес для переписки:

Изюрова Наталья Владимировна
ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный
медицинский университет» Министерства
здравоохранения РФ,
454092, Россия, г. Челябинск, ул. Воровского, 64.
Тел.: 8 (963) 081-46-78.
E-mail: Natusaz@live.ru

Address for correspondence:

Iziurova Natalia V.
South Ural Medical State University
454092, Russian Federation, Chelyabinsk, Vorovsky str., 64.
Phone: 7 (963) 081-46-78.
E-mail: Natusaz@live.ru

Образец цитирования:

Н.В. Изюрова, А.Ю. Савочкина, А.Н. Узунова,
Д.Ю. Нохрин «Цитокиновый профиль при
внебольничной пневмонии у детей» // Медицинская
иммунология, 2022. Т. 24, № 5. С. 943-954.
doi: 10.15789/1563-0625-CPI-2538
© Изюрова Н.В. и соавт., 2022

For citation:

N.V. Iziurova, A.Yu. Savochkina, A.N. Uzunova,
D.Yu. Nokhrin "Cytokine profile in community-acquired
pneumonia in children", Medical Immunology (Russia)/
Meditsinskaya Immunologiya, 2022, Vol. 24, no. 5,
pp. 943-954. doi: 10.15789/1563-0625-CPI-2538
DOI: 10.15789/1563-0625-CPI-2538

CYTOKINE PROFILE IN COMMUNITY-ACQUIRED PNEUMONIA IN CHILDREN

Iziurova N.V.^a, Savochkina A.Yu.^a, Uzunova A.N.^a, Nokhrin D.Yu.^b

^a South Ural Medical State University, Chelyabinsk, Russian Federation

^b Chelyabinsk State University, Chelyabinsk, Russian Federation

Abstract. Community-acquired pneumonia (CAP) is one of the most common acute infectious diseases. To date, the incidence of CAP among children was decreased significantly worldwide, mainly due to increasing use of effective preventive measures. Nevertheless, CAP remains a common cause of childhood morbidity and mortality. Pneumonia may develop at any age, but most often it occurs in young children, who are more likely to have a more severe course of pneumonia. Currently, early diagnosis and prognosis of the disease severity in children is an urgent issue. It was found that, in most cases, a panel of conventional biomarkers, including the number of leukocytes, procalcitonin, CRP is not sufficient for the diagnosis of pediatric CAP. There is a demand for new biological markers which, along with clinical evaluation, may significantly improve diagnostics and management of CAP in children, thus reducing the risk of adverse outcomes associated with this disease. Such markers could be found among the cytokines, which are active participants in the CAP pathogenesis. The aim of this study was to determine the level of several cytokines in blood serum of children with CAP and to assess changes in the cytokine profile depending on the patient's age and severity of the disease. The study included 117 children aged 1 to 18 years with a diagnosis of CAP confirmed by X-ray examination. The comparison group included 28 healthy children who did not have CAP or other signs of acute respiratory viral infection at the time of examination, being free of any chronic pathology requiring outpatient observation. A number of cytokines were determined quantitatively in blood serum, i.e., IL-1 β , IFN γ , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF α , IFN λ 2 (IL-28A), IFN λ 3 (IL-28B), IL-8, MCP-1, IL-17AF, GM-CSF using test systems based on the "sandwich" method of solid-phase ELISA using peroxidase labeling. As a result, it was found that the content of IL-6, IL-17AF, IL-1 β , IFN γ , MCP-1, IFN λ 2 (IL-28A), IFN λ 3 (IL-28B), GM-CSF was significantly higher in the group of children with severe community-acquired pneumonia. The levels of certain cytokines, e.g., IL-6, IFN λ 2 (IL-28A), IFN λ 3 (IL-28B), GM-CSF varied depending on the age of patients, thus, probably, reflecting the degree of immune system activation in the children of different age groups.

Keywords: community-acquired pneumonia, severe pneumonia, children, cytokines, interferons, pneumonia markers

Введение

Внебольничная пневмония (ВП) является актуальной проблемой для педиатрической практики. Несмотря на значительные успехи, которые были достигнуты в понимании факторов риска и этиологии пневмонии, в разработке основных аспектов патогенеза, стандартизованных методов лечения, пневмония остается одной из ведущих причин детской смертности [1]. Остается высокой и заболеваемость пневмонией у детей и подростков повсеместно, особенно в возрасте до 5 лет. Ежегодно в мире регистрируется приблизительно 150 миллионов случаев пневмонии у детей в возрасте до 5 лет [1, 4, 30].

Как известно, на развитие ВП у детей влияют многочисленные факторы. В течение многих лет как факторы, влияющие на клиническое течение и прогноз пневмонии у детей раннего возраста,

рассматривалась так называемая «фоновая» патология, а именно рахит, белково-энергетическая недостаточность, перинатальное гипоксическое поражение ЦНС и другие. Улучшение работы амбулаторного звена по профилактике данной патологии уменьшили ее значимость как ведущей при формировании пневмонии. На оценку прогноза и тяжести пневмонии влияют различные тяжелые заболевания у детей, врожденные пороки развития, наличие иммунного дефицита, связанного с аутоиммунными заболеваниями, аутовоспалительным синдромом, ВИЧ-инфекция. На тяжесть пневмонии оказывают влияние наличие хронических очагов инфекции, частые респираторные заболевания [3, 18].

С методологической позиции, природу пневмонии следует оценивать, как своеобразный динамический процесс воздействия микроорганизма/ассоциации микробов, их последовательного

воздействия и противоинфекционной защиты макроорганизма [5]. Нарушение бронхиальной проходимости, альвеолярной вентиляции и перфузии способствуют развитию той или иной степени тяжести ВП, за счет снижения газообмена в тканях и органах у детей. По степени тяжести внебольничная пневмония подразделяется на тяжелую и нетяжелую [4].

При развитии пневмонии идет постоянная смена причинно-следственных взаимодействий, изменяется значимость вклада в патогенез этиологических факторов как таковых и состояние противоинфекционной защиты организма ребенка. Это вызвано прежде всего тем, что в детском возрасте идет созревание иммунной системы, неотрывно связанное с периодом детства, т. е. с возрастом [2].

Большое значение в развитии внебольничной пневмонии играет противоинфекционная защита, в первую очередь состояние врожденного иммунитета, факторов как клеточного, так и гуморального его звеньев.

Незрелая иммунная система делает детей особенно восприимчивыми к инфекциям. Поэтому оценка тяжести ВП у детей имеет решающее значение для улучшения решений по оказанию медицинской помощи и своевременного осуществления адекватного лечения. Биомаркеры воспаления, такие как прокальцитонин (PCT) и С-реактивный белок (СРБ), были описаны у детей как маркеры, связанные с тяжелой пневмонией. Однако данные показатели являются неспецифическими и отражают тяжесть не только при пневмонии у детей, но и при других тяжелых бактериальных инфекциях, системных заболеваниях соединительной ткани, сепсисе и т. д. По данным некоторых исследований, использование прокальцитонина в качестве метода диагностики при внебольничной пневмонии у детей, имеет малую доказательную базу [7]. Актуальным является поиск новых маркеров, позволяющих в дополнение к клинической оценке существенно улучшить диагностику и ведение ВП у детей и уменьшить неблагоприятные исходы, связанные с этим заболеванием [10, 23]. Возможно, такими маркерами могут стать цитокины, которые могут активировать В-клетки, Т-клетки и NK-клетки для инициирования и усиления воспалительного/иммунного ответа, обеспечивая, таким образом, важнейшие функции в защите хозяина от бактериальных и вирусных инфекций [14, 15, 26].

Цитокины являются неспецифическими полипептидными молекулами, вырабатываемыми преимущественно активированными клетками иммунной системы. Количественная оценка ци-

токинов имеет важное значение в клинической практике, поскольку определение уровня цитокинов дает представление о физиологических и патологических процессах и используется для диагностики и лечения заболевания [20].

Цитокины измеряются в различных жидкостях организма, включая кровь, слюну, слезы, мочу и стул. Кровь близка к внутренней среде человека, отражая состояние отдельных клеток, тканей, органов и организма в целом. Анализ уровня цитокинов в клинических образцах крови, особенно в плазме или сыворотке, важен для диагностики заболевания, поскольку незначительное изменение уровня может отражать состояние иммунной функции [19]. Провоспалительные цитокины, включая IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF α и интерфероны, облегчают воспалительные реакции и, как правило, стимулируют иммунокомпетентные клетки. Напротив, противовоспалительные цитокины, такие как IL-4, IL-6, IL-10, IL-11, IL-13 ингибируют воспаление и подавляют иммунные клетки [20].

По данным различных исследований, была выявлена взаимосвязь между увеличением уровня определенных цитокинов в сыворотке крови и тяжестью воспалительного процесса, в том числе и при пневмонии. В частности, в ряде исследований установлено, что увеличение уровня IL-4, IL-6, IL-8, IL-1 β , IL-17, GM-CSF в сыворотке крови может быть связано с тяжестью пневмонии у детей [9, 14, 15, 21, 24, 26].

Доказана роль IL-6 как маркера, отражающего тяжесть внебольничной пневмонии и раннего прогностического маркера исхода данного заболевания, поскольку возможно, что тяжелая ВП имеет общие черты воспаления с септическим состоянием [6, 10]. В некоторых исследованиях изучалась роль интерферона III типа, также известного как IFN λ , как фактора, участвующего в противомикробной защите дыхательных путей [31]. В исследованиях последних лет моноцитарный хемоаттрактантный белок (MCP-1) указывается как фактор, отражающий тяжесть инфекционного процесса при ВП и может быть использован в качестве диагностического маркера [32].

Предыдущие исследования цитокиновых профилей при внебольничной пневмонии у детей в основном основывались на анализе только нескольких цитокинов и у детей только в одной возрастной группе. Профили некоторых цитокинов представлены только у взрослых. В связи с этим исследование уровня цитокинов в сыворотке крови у детей с внебольничной пневмонией является актуальным, поскольку их опреде-

ление может быть использовано в клинической практике. Возможно, ни один из существующих маркеров не даст полную клиническую и диагностическую картину, только панель из нескольких маркеров поможет улучшить диагностический поиск и улучшить тактику ведения пациентов с ВП.

Цель исследования — определить уровень ряда цитокинов в сыворотке крови у детей с ВП и оценить изменения цитокинового профиля в зависимости от влияния факторов: возраст пациента и тяжесть заболевания.

Материалы и методы

Для достижения поставленной цели нами проведен анализ и обобщение результатов собственных исследований и обследования 117 детей в возрасте от 1 года до 18 лет с верифицированным диагнозом внебольничной пневмонии, подтвержденной рентгенологически. Все дети находились на стационарном лечении в отделениях респираторных инфекций и отделениях реанимации МБУЗ ДГКБ № 7 и МАУЗ ДГКБ № 8 г. Челябинска. Группа сравнения сформирована из 28 здоровых детей, не имеющих на момент обследования внебольничной пневмонии, а также других признаков острой респираторной вирусной инфекции и не состоящих на диспансерном наблюдении по поводу какой-либо хронической патологии.

Для оценки тяжести пациентов с ВП использованы критерии степени тяжести у детей с внебольничной пневмонией, представленных в клинических рекомендациях 2022 года. Тяжелая внебольничная пневмония характеризуется кашлем или одышкой, наличием цианоза или $SpO_2 < 90\%$, ДН II и более степени, системными опасными признаками (нарушение микроциркуляции, нарушение сознания, судороги), а также наличием осложнений (деструктивная пневмония, плеврит и пр.) [4].

Иммунологические лабораторные исследования выполнялись на базе НИИ иммунологии ФГБОУ ВО ЮУГМУ Минздрава РФ. В ходе проведенного исследования были определены уровни 13 цитокинов: IL-1 β , IFN γ , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF α , IFN λ 2 (IL-28A), IFN λ 3 (IL-28B), IL-8, MCP-1, IL-17AF, GM-CSF.

Для определения уровня IL-1 β , IFN γ , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF α , IL-8, MCP-1 использованы тест-системы АО «Вектор-Бест» (г. Новосибирск), IL-17AF, GM-CSF применялась система ELISA Kit Bender MedSystems (GmbH Campus Vienna Biocenter 2, Вена, Австрия). Для определения уровня IFN λ 2 (IL-28A), IFN λ 3 (IL-28B)

использована тест система OmniKine™ ELISA Kit (Assay Biotechnology Company, Inc. Fremont, США). Исследование проводилось по методикам, приложенным к тест-системам. Эти тест-системы основаны на «сэндвич»-методе твердофазного ИФА с применением пероксидазы в качестве индикаторного фермента. Учет результатов проводили на ИФА анализаторе. Результаты выражались в пг/мл.

В ходе статистического анализа группы детей сравнивали в модели двухфакторного дисперсионного анализа с фиксированными факторами «Группа» (3 градации: дети с ВП нетяжелой — 88 детей, дети с тяжелой ВП — 29 детей, группа сравнения — здоровые дети — 28 детей) и «Возраст» (4 градации — дети были поделены на 4 возрастные группы: 1-я группа — дети с 1 года до 3 лет, 2-я группа — дети с 4 до 7 лет, 3-я группа — дети с 8 до 12 лет, 4 группа — дети с 13 до 18 лет). Все дети были сопоставимы по полу и возрасту.

Поскольку распределения концентраций цитокинов были асимметричными и существенно отличались от нормального распределения, данные предварительно преобразовывали с помощью нормализующего преобразования Бокса–Кокса [27] в пакете PAST (v. 4.06b [13]), а значение параметра λ выписывали. Апостериорные сравнения групп в рамках дисперсионного комплекса проводили по Тьюки. Для построения графиков групповые средние с 95%-ными доверительными интервалами (95% ДИ), рассчитанными для модели дисперсионного анализа, ретрансформировали в исходную шкалу концентраций (в пг/мл) с помощью соответствующего значения λ . Статистически значимыми считали эффекты при $p \leq 0,05$. Расчеты выполнены в пакете IBM SPSS (v. 23), графические построения — в пакете KyPlot (v. 6.0.3 [33]).

Результаты

По данным проведенного исследования средних ($\pm SD$) возраст детей с ВП составил 7,35 ($\pm 4,89$) года и из включенных детей 64 человека (54,7%) были мальчиками. Доля детей с тяжелой пневмонией составила 24,8% (29 человек).

В таблице 1 представлены концентрации цитокинов в группе внебольничной пневмонии тяжелой и нетяжелой и в группе сравнения.

Все дети с внебольничной пневмонией, независимо от тяжести, имели достоверно более высокие уровни всех изучаемых цитокинов по сравнению с группой сравнения.

При сравнении групп детей с нетяжелой и тяжелой пневмонией установлено, что уровень большинства цитокинов (IL-6, IL-17AF, IL-1 β ,

ТАБЛИЦА 1. КОНЦЕНТРАЦИЯ ЦИТОКИНОВ (пг/мл) В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ДЕТЕЙ С ВНЕБОЛЬНИЧНОЙ ПНЕВМОНИЕЙ И В ГРУППЕ СРАВНЕНИЯ, МЕ ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)

TABLE 1. CONCENTRATION OF CYTOKINES (pg/mL) IN THE BLOOD SERUM OF CHILDREN WITH COMMUNITY-ACQUIRED PNEUMONIA AND IN THE COMPARISON GROUP, Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)

Цитокины (пг/мл) Cytokines (pg/mL)	Группа сравнения Comparison group (A) (n = 28)	Нетяжелая пневмония Non-severe pneumonia (B) (n = 88)	Тяжелая пневмония Severe pneumonia (C) (n = 29)
IL-1 β	3,15 (2,91-3,59)	3,20 (0,48-17,18) ($p_{A-B, C} < 0,001$)	3,78 (2,57-9,29) ($p_{B-C} = 0,031$)
IFN γ	1,60 (1,02-1,89)	2,62 (0,98-16,05) ($p_{A-B, C} < 0,001$)	2,92 (1,02-16,78) ($p_{B-C} = 0,04$)
IL-6	1,08 (0,11-3,76)	1,30 (0,001-53,810) ($p_{A-B, C} = 0,019$)	2,32 (0,26-53,81) ($p_{B-C} = 0,033$)
IL-4	1,75 (1,58-2,03)	2,03 (1,01-61,74) ($p_{A-B, C} < 0,001$)	2,09 (1,01-14,35)
IL-2	1,69 (1,03-2,26)	2,07 (0,75-7,17) ($p_{A-B, C} < 0,001$)	2,64 (0,18-5,66)
IL-10	1,79 (1,41-2,38)	1,98 (0,01-18,23) ($p_{A-B, C} = 0,009$)	3,01 (0,84-18,23) ($p_{B-C} = 0,001$)
IL-8	3,59 (2,10-229,73)	49,12 (0,78-503,26) ($p_{A-B, C} < 0,001$)	52,65 (2,10-503,26)
IL-17AF	2,31 (1,15-7,53)	8,69 (0,001-120,830) ($p_{A-B, C} < 0,001$)	8,11 (1,15-73,61) ($p_{B-C} = 0,003$)
TNF α	1,40 (0,31-1,90)	1,68 (0,31-4,50) ($p_{A-B, C} < 0,001$)	1,68 (0,68-2,77)
MCP-1	18,96 (0,86-358,77)	118,96 (2,58-1113,20) ($p_{A-B, C} = 0,003$)	173,52 (2,580-1113,208) ($p_{B-C} < 0,001$)
GM-CSF	2,45 (1,56-3,56)	3,34 (1,56-53,72) ($p_{A-B, C} < 0,001$)	4,23 (1,78-27,23) ($p_{B-C} < 0,001$)
IFN λ 2 (IL-28A)	12,83 (6,75-379,93)	494,99 (5,40-8218,62) ($p_{A-B, C} < 0,001$)	1061,25 (4,05-3152,67) ($p_{B-C} = 0,012$)
IFN λ 3 (IL-28B)	13,67 (5,46-21,68)	20,41 (10,15-2090,51) ($p_{A-B, C} < 0,001$)	26,36 (3,90-70,72) ($p_{B-C} = 0,004$)

Примечание. Жирным шрифтом выделены статистически значимые различия. $p_{A-B, C}$ — различия между исследуемыми показателями группы А от группы В, С; p_{B-C} — различия между исследуемыми показателями группы В от группы С.

Note. Statistically significant differences are highlighted in bold. $p_{A-B, C}$, differences between the studied indicators of group A from group B, C; p_{B-C} , differences between the studied indicators of group B from group C.

ТАБЛИЦА 2. РЕЗУЛЬТАТЫ ДВУХФАКТОРНОГО ДИСПЕРСИОННОГО АНАЛИЗА ИЗМЕНЕНИЯ КОНЦЕНТРАЦИИ ЦИТОКИНОВ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ У ДЕТЕЙ С ВНЕБОЛЬНИЧНОЙ ПНЕВМОНИЕЙ И ГРУППЕ СРАВНЕНИЯ

TABLE 2. RESULTS OF A TWO-FACTOR ANALYSIS OF VARIANCE OF CHANGES IN THE CONCENTRATION OF CYTOKINES IN BLOOD SERUM IN CHILDREN WITH COMMUNITY-ACQUIRED PNEUMONIA AND THE COMPARISON GROUP

Источник изменчивости Source of variability	Сумма квадратов Sum of squares SS	Степени Свободы Degrees of Freedom df	Средний квадрат Middle Square MS	F-критерий F-criterion	p
IL-6					
Фактор «Группа» The "Group" factor	24,598	2	12,299	8,21	< 0,001
Фактор «Возраст» The "Age" factor	12,626	3	4,209	2,81	0,042
Совокупное влияние факторов Cumulative influence of factors	21,610	6	3,602	2,40	0,031
Ошибка Error	199,321	133	1,499	–	–
IL-17AF					
Фактор «Группа» The "Group" factor	43,583	2	21,792	7,68	< 0,001
Фактор «Возраст» The "Age" factor	8,745	3	2,915	1,03	0,383
Совокупное влияние факторов Cumulative influence of factors	26,909	6	4,485	1,58	0,157
Ошибка Error	377,225	133	2,836	–	–
IL-28A					
Фактор «Группа» The "Group" factor	771,070	2	385,535	29,41	< 0,001
Фактор «Возраст» The "Age" factor	66,278	3	22,093	1,69	0,173
Совокупное влияние факторов Cumulative influence of factors	111,287	6	18,548	1,41	0,213
Ошибка Error	1743,592	133	13,110	–	–
IL-28B					
Фактор «Группа» The "Group" factor	1,525	2	0,762	20,11	< 0,001
Фактор «Возраст» The "Age" factor	0,039	3	0,013	0,34	0,797
Совокупное влияние факторов Cumulative influence of factors	0,890	6	0,148	3,91	0,001
Ошибка Error	5,042	133	0,038	–	–
GM-CSF					
Фактор «Группа» The "Group" factor	0,910	2	0,455	13,77	< 0,001
Фактор «Возраст» The "Age" factor	0,462	3	0,154	4,66	0,004
Совокупное влияние факторов Cumulative influence of factors	0,645	6	0,108	3,25	0,005
Ошибка Error	4,394	133	0,033	–	–
MCP-1					
Фактор «Группа» The "Group" factor	433,360	2	216,680	11,17	< 0,001
Фактор «Возраст» The "Age" factor	24,820	3	8,270	0,43	0,734
Совокупное влияние факторов Cumulative influence of factors	59,640	6	9,940	0,51	0,798
Ошибка Error	2578,990	133	19,390	–	–

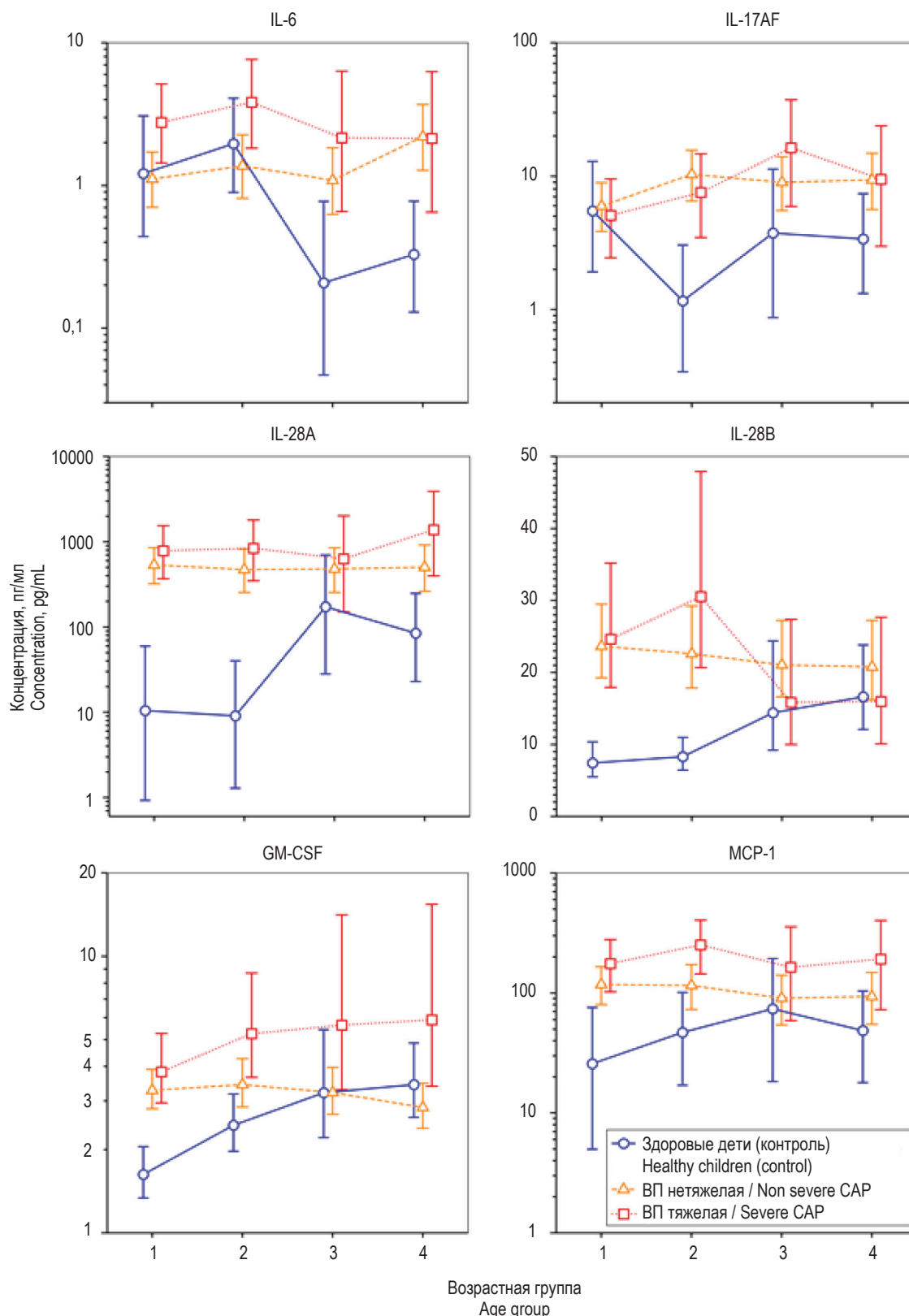


Рисунок 1. Результаты анализа цитокинов в сыворотке крови у детей с внебольничной пневмонией и в группе сравнения в зависимости от возраста

Примечание. (ME; 95% ДИ) в дисперсионном анализе.

Figure 1. Results of the analysis of cytokines in the blood serum of children with community-acquired pneumonia and in the comparison group, depending on age

Note. (ME; 95% CI) in the analysis of variance.

IFN γ , MCP-1, IFN λ 2 (IL-28A), IFN λ 3 (IL-28B), GM-CSF) был значительно выше в группе детей с тяжелой внебольничной пневмонией. Кроме того, отмечается большая вариабельность показателей уровня MCP-1, IFN λ 2 (IL-28A), концентрация которых превышает данные показатели в группе сравнения более чем в 10 раз.

Для изучения влияния факторов (возраст детей и тяжесть внебольничной пневмонии) на изменения цитокинов у детей с ВП в сыворотке крови был проведен двухфакторный дисперсионный анализ. Далее представлены результаты только по тем цитокинам, уровень которых достоверно изменялся в зависимости от тяжести ВП, так как один из факторов — это тяжесть заболевания.

Результаты представлены в таблице 2 и на рисунке 1.

Фактор «Группа» (отражает тяжесть внебольничной пневмонии). Как видно из таблицы 2 и рисунка 1, концентрация цитокинов почти всегда была в целом выше в группе детей с тяжелой ВП. Однако статистически значимые различия между группами детей с ВП разной тяжести (тяжелой и нетяжелой) были наиболее выражены для: IL-6 ($p = 0,007$), GM-CSF ($p = 0,002$) и MCP-1 ($p = 0,005$).

Фактор «Возраст». Как видно из таблицы 1, значимые различия между детьми разного возраста наблюдались только в двух случаях: для IL-6 и GM-CSF. Причем апостериорные сравнения в обоих случаях не позволили понять за счет каких именно возрастных групп данные различия проявились ($p > 0,10$). Это означает, что возрастные особенности в уровнях цитокинов в среднем малы и обнаруживаются только на фоне заболевания, т.е. во взаимодействии факторов.

При изучении взаимодействия факторов «Совокупное влияние факторов» (возраст и тяжесть заболевания) установлено, что входящие в него факторы правильнее рассматривать совместно, поскольку на действие одного из них влияет другой, что выражается в появлении неаддитивных эффектов. В нашем случае значимыми оказались 3 взаимодействия. Статистически значимые изменения наблюдались по 3 цитокинам: IL-6 ($p < 0,031$), IL-28B ($p < 0,001$), GM-CSF ($p < 0,005$).

Для IL-6 оно проявилось в том, что в группе здоровых детей его уровень с возрастом значительно снижался, в то время как группах детей с ВП он изменялся в зависимости от тяжести пневмонии.

У здоровых детей наблюдалось увеличение уровня IL-28B в сыворотке крови с возрастом, схожий профиль был и для IL-28A в группе срав-

нения, в то время как у детей с ВП данные показатели были достоверно повышены в группе детей с тяжелой пневмонией.

Для GM-CSF взаимодействие заключалось в особой возрастной динамике показателя у детей с нетяжелой ВП. Видно, что для группы сравнения и тяжелой ВП взаимодействия не было: линии возрастных профилей шли параллельно, увеличиваясь. Для детей с нетяжелой ВП такого роста не наблюдалось и даже отмечалось небольшое снижение в старшей возрастной группе.

Обсуждение

Уровни всех исследованных цитокинов (IL-1 β , IFN γ , IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, TNF α , IFN λ 2 (IL-28A), IFN λ 3 (IL-28B), MCP-1, IL-17AF, GM-CSF) достоверно увеличиваются при внебольничной пневмонии у детей вне зависимости от тяжести процесса, что согласуется с другими исследованиями, поскольку цитокины — это полипептидные молекулы, которые вырабатываются в ответ на воспаление. Воспалительная реакция в данном случае управляется сложной сетью медиаторов и сигнальных путей. Цитокины, в том числе интерлейкины, хемокины, интерфероны регулируют воспаление и отвечают за связь между лейкоцитами, способствуют хемотаксису, а также оказывают противовирусное и антибактериальное действие. Более того, эти молекулы участвуют как во врожденном, так и в адаптивном иммунитете, играя значительную физиологическую роль в онтогенезе лимфоидной ткани, органогенезе, васкулогенезе и репарации тканей [9, 10, 14, 17, 21, 23, 24].

Тяжесть внебольничной пневмонии у детей обусловлена повышением уровня таких цитокинов, как IL-6, IL-17AF, IL-1 β , IFN γ , MCP-1, IFN λ 2 (IL-28A), IFN λ 3 (IL-28B), GM-CSF, что подтверждается литературными данными об увеличении данных цитокинов при различных состояниях, в том числе и при пневмонии [9, 10, 14, 21, 23, 24].

Среди всех цитокинов огромный интерес представляет IL-6, который является наиболее изученным цитокином, уровень которого достоверно повышался в группе детей с тяжелой ВП. Представители семейства IL-6 могут опосредовать острые воспалительные заболевания. Уровни IL-6 очень низки в нормальных условиях, но эти уровни могут повышаться во много тысяч раз при различных воспалительных, септических состояниях, аутоиммунных заболеваниях [25]. Доказана роль IL-6 и при новой коронавирусной инфекции. У тяжелых пациентов с COVID-19, а также умерших вследствие острого респиратор-

ного дистресс-синдрома был выявлен повышенный уровень IL-6 в сыворотке крови [22]. В ряде исследований по изучению COVID-19 было отмечено не только увеличение концентрации в сыворотке крови IL-6, но и таких цитокинов, как MCP-1, IL-1 β , что также было выявлено и в нашем исследовании [16]. Увеличение уровня IL-6 в сыворотке крови положительно коррелирует с тяжестью инфекционного процесса и при внебольничной пневмонии, как у детей, так и у взрослых и является прогностическим маркером неблагоприятного исхода [9, 10, 14, 23].

Повышенный уровень IL-17AF в сыворотке крови, вероятно, может быть связан с тем, что данный интерлейкин участвует в защите от пневмококковой инфекции и препятствует колонизации возбудителя в верхних дыхательных путях, поскольку известно, что пневмококк является наиболее распространенной причиной внебольничной пневмонии у детей. В литературе встречаются единичные исследования по данному цитокину, например у детей до 1 года с тяжелой ВП был отмечен повышенный уровень в сыворотке крови таких цитокинов, как IL-17, который продуцируется Th-17, также IL-1 β и IL-6 [22], а в экспериментальных исследованиях, проведенных на мышах, была доказана роль IL-17 как фактора, способствующего защите дыхательных путей от пневмококка [24, 29].

Интерфероны III типа (IFN λ 2 (IL-28A) и IFN λ 3 (IL-28B)), которые по некоторым литературным данным представляют собой первую линию защиты от микробных инфекций, особенно от вирусов, также были значительно увеличены у детей с тяжелой ВП в сравнении с детьми с не тяжелой пневмонией. Доказано, что они обеспечивают противовирусные свойства клеткам, индуцируя экспрессию сотен генов, известных как интерферон-стимулированные гены (ISG). IFN λ вырабатывается эпителиальными клетками дыхательных путей и имеет важное значение в его защите, обеспечивая противовирусный ответ, а также путем регуляции самого эпителия, контроля и поддержания адаптивных иммунных реакций и целостности эпителиального барьера [28]. В некоторых исследованиях была обнаружена корреляция между IFN λ 2 (IL-28A) и IL-6, что выражалось в увеличении IL-6 и снижении IFN λ 2 у тяжелых пациентов с COVID-19 у взрослых [11]. Примечательно, что более высокие концентрации IFN λ у пациентов с COVID-19 в ряде исследований коррелировали с более низкой вирусной нагрузкой в бронхиальных аспиратах и были связаны с улучшением исхода у тяжелых пациентов [12].

Увеличение уровня GM-CSF у детей с тяжелой внебольничной пневмонией может рассматриваться как маркер тяжести наряду с увеличением уровня IL-6. GM-CSF обычно рассматривается как провоспалительный цитокин и продуцируется многими клетками, включая макрофаги, Т-клетки, фибробласты, эндотелиальные клетки, эпителиальные клетки, причем большая часть продукции происходит в местах воспаления. Уровни GM-CSF являются низкими или неопределяемыми в нормальных условиях, однако любой иммунный триггер может быстро увеличивать его концентрации в сыворотке крови. Бактериальные эндотоксины и провоспалительные цитокины, в частности IL-1 β , IL-6 активно индуцируют выработку GM-CSF. В ряде исследований описана роль GM-CSF как фактора, ответственного за дифференцировку альвеолярных макрофагов, активно участвующих в защите дыхательных путей. Однако по некоторым данным у пациентов с тяжелой пневмонией, вызванной COVID-19, заметное повышение уровня GM-CSF рассматривается как часть «цитокинового шторма», который приводит к прогрессированию острой дыхательной недостаточности. Блокирование передачи сигналов GM-CSF может быть эффективной терапевтической стратегией с целью уменьшения воспаления [8].

Высокая вариабельность и значительное повышение в сыворотке крови такого показателя, как MCP-1, может рассматриваться как маркер тяжести ВП у детей. Известно, что MCP-1 является мощным моноцитарным и макрофагальным, нейтрофильным и Т-клеточным хемоаттрактантом против бактериальной легочной инфекции. В литературе имеются данные взаимосвязи с увеличением уровня MCP-1 и тяжестью внебольничной пневмонии у взрослых, что подтверждается и данными нашего исследования [32].

При анализе уровня цитокинов в сыворотке крови здоровых детей было отмечено, что IL-6 с возрастом снижается, в то время как показатели IFN λ 2 (IL-28A), IFN λ 3 (IL-28B), GM-CSF с возрастом увеличиваются, что подтверждается некоторыми исследованиями, проведенными у здоровых детей, и, вероятно, обусловлено физиологическими изменениями, происходящими в подростковом возрасте, а также степенью активации иммунитета в группах детей различного возраста [17]. Однако проблемами при интерпретации уровня цитокинов в сыворотке крови здоровых детей является отсутствие установленных нормальных диапазонов и ограниченные знания о возрастных различиях.

Изучение уровня цитокинов у детей с ВП в различных возрастных группах и в зависимости от тяжести является перспективным направлением, а использование комбинации различных цитокинов в дальнейшем может быть использовано для создания диагностической модели. Данные иммунологические показатели в сыворотке крови могут отражать степень воспалительного процесса и являться дополнительными иммунологическими маркерами тяжести внебольничной пневмонии у детей.

Выводы

Внебольничная пневмония у детей приводит к повышению уровня всех изучаемых цитокинов по сравнению со здоровыми детьми. Отмечается значительное повышение IL-6, IL-17AF, MCP-1, IFN λ 2 (IL-28A), IFN λ 3 (IL-28B), GM-CSF у детей с тяжелой формой внебольничной пневмонии. Уровень таких цитокинов, как IL-6, IFN λ 2 (IL-28A), IFN λ 3 (IL-28B), GM-CSF изменяется в зависимости от возраста пациентов, что, возможно, отражает степень активации иммунной системы в возрастном аспекте.

Список литературы / References

1. Геппе Н.А., Малахов А.Б., Дронов И.А., Хабибуллина Е.А. Внебольничная пневмония у детей: проблемы диагностики, лечения и профилактики // Доктор.Ру, 2015. № 13 (114). С. 20-27. [Geppe N.A., Malakhov A.B., Dronov I.A., Khabibullina E.A. Community-acquired pneumonia in children: problems of diagnosis, treatment and prevention. *Doktor.Ru = Doktor.Ru*, 2015, no. 13 (114), pp. 20-27. (In Russ.)]
2. Зайцева О.В. Формирование иммунитета: актуальные вопросы педиатрии // Аллергология и иммунология в педиатрии, 2014. № 2 (37). С. 12-22. [Zaitseva O.V. Formation of immunity: topical issues of pediatrics. *Allergologiya i immunologiya v pediatrii = Allergology and Immunology in Pediatrics*, 2014, no. 2 (37), pp. 12-22. (In Russ.)]
3. Пикуза О.И., Самороднова Е.А. Современные особенности внебольничных пневмоний у детей раннего возраста // Практическая медицина, 2013. № 6 (75). С. 35-41. [Pikuza O.I., Samorodnova E.A. Modern features of community-acquired pneumonia in young children. *Prakticheskaya meditsina = Practical Medicine*, 2013, no. 6 (75), pp. 35-41. (In Russ.)]
4. Пневмония (внебольничная). Оригинал-макет, 2022. 82 с. [Электронный ресурс]. Режим доступа: https://cr.minzdrav.gov.ru/schema/714_1. [Pneumonia (community-acquired). Original layout, 2022. 82 p. [Electronic resource]. Access mode: https://cr.minzdrav.gov.ru/schema/714_1.]
5. Узунова А.Н. Пневмонии в детском возрасте. Челябинск: Челяб. гос. мед. акад., 2002. 215 с. [Uzunova A.N. Pneumonia in childhood]. Chelyabinsk: Chelyabinsk State Medical Academy, 2002. 215 p.
6. Bacci M.R., Leme R.C., Zing N.P., Murad N., Adami F., Hinnig P.F., Feder D., Chagas A.C., Fonseca F.L. IL-6 and TNF- α serum levels are associated with early death in community-acquired pneumonia patients. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 2015, Vol. 48, no. 5, pp. 427-432.
7. Banerjee R. CON: Procalcitonin does not have clinical utility in children with community-acquired pneumonia. *JAC Antimicrob. Resist.*, 2021, Vol. 3, no. 4, dlab152. doi: 10.1093/jacamr/dlab152.
8. Bonaventura A., Vecchié A., Wang T.S., Lee E., Cremer P.C., Carey B., Rajendram P., Hudock K.M., Korbé L., van Tassel B.W., Dagna L., Abbate A. Targeting GM-CSF in COVID-19 Pneumonia: Rationale and Strategies. *Front. Immunol.*, 2020, Vol. 11, 1625. doi: 10.3389/fimmu.2020.01625.
9. de Brito R.C., Lucena-Silva N., Torres L.C., Luna C.F., Correia J.B., da Silva G.A. The balance between the serum levels of IL-6 and IL-10 cytokines discriminates mild and severe acute pneumonia. *BMC Pulm. Med.*, 2016, Vol. 16, no. 1, 170. doi: 10.1186/s12890-016-0324-z.
10. Fernandes C.D., Arriaga M.B., Costa M.C.M., Costa M.C.M., Costa M.H.M., Vinhaes C.L., Silveira-Mattos P.S., Fukutani K.F., Andrade B.B. Host inflammatory biomarkers of disease severity in pediatric community-acquired pneumonia: a systematic review and meta-analysis. *Open Forum Infect. Dis.*, 2019, Vol. 6, no. 12, ofz520. doi: 10.1093/ofid/ofz520.
11. Fukuda Y., Homma T., Inoue H., Onitsuka C., Ikeda H., Goto Y., Sato Y., Kimura T., Hirai K., Ohta S., Yamamoto M., Kusumoto S., Suzuki S., Tanaka A., Sagara H. Downregulation of type III interferons in patients with severe COVID-19. *J. Med. Virol.*, 2021, Vol. 93, no. 7, pp. 4559-4563.
12. Galani I.E., Rovina N., Lampropoulou V., Triantafyllia V., Manioudaki M., Pavlos E., Koukaki E., Fragkou P.C., Panou V., Rapti V., Koltsida O., Mentis A., Koulouris N., Tsiodras S., Koutsoukou A., Andreaskos E. Untuned antiviral immunity in COVID-19 revealed by temporal type I/III interferon patterns and flu comparison. *Nat. Immunol.*, 2021, Vol. 22, no. 1, pp. 32-40.
13. Hammer O., Harper D.A.T., Ryan P.D. PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. *Palaeontologia Electronica*, 2001, Vol. 4, iss. 1, 9 p. Available at: https://palaeo-electronica.org/2001_1/past/issue1_01.htm.

14. Haugen J., Chandyo R.K., Brokstad K.A., Mathisen M., Ulak M., Basnet S., Valentiner-Branth P., Strand T.A. Cytokine concentrations in plasma from children with severe and non-severe community acquired pneumonia. *PLoS One*, 2015, Vol. 10, no. 9, e0138978. doi: 10.1371/journal.pone.0138978.
15. Jin H.L., Zhan L., Mei S.F., Shao Z.Y. Serum cytokines and FeNO in school-aged children with mycoplasma pneumoniae pneumonia. *Med. Sci. Monit.*, 2020, Vol. 26, e923449. doi: 10.12659/MSM.923449.
16. Khaedir Y., Kartika R. Perspectives on Targeting IL-6 as a Potential Therapeutic Strategy for COVID-19. *J. Interferon Cytokine Res.*, 2021, Vol. 41, no. 2, pp. 37-43.
17. Kleiner G., Marcuzzi A., Zanin V., Monasta L., Zauli G. Cytokine levels in the serum of healthy subjects. *Mediators Inflamm.*, 2013, Vol. 2013, 434010. doi: 10.1155/2013/434010.
18. le Roux D.M., Zar H.J. Community-acquired pneumonia in children – a changing spectrum of disease. *Pediatr. Radiol.*, 2017, Vol. 47, no. 11, pp. 1392-1398.
19. Lee J.E., Kim J.W., Han B.G., Shin S.Y. Impact of whole-blood processing conditions on plasma and serum concentrations of cytokines. *Biopreserv. Biobank.*, 2016, Vol. 14, no. 1, pp. 51-55.
20. Liu C., Chu D., Kalantar-Zadeh K., George J., Young H.A., Liu G. Cytokines: from clinical significance to quantification. *Adv. Sci. (Weinh)*, 2021, Vol. 8, no. 15, e2004433. doi: 10.1002/advs.202004433.
21. Liu M., Lu B., Fan H., Guo X., Du S., Yang D., Xu Y., Li Y., Che D., Liu Y., Gu X., Ding T., Wang P., Luo H.B., Lu G. Heightened local Th17 cell inflammation is associated with severe community-acquired pneumonia in children under the age of 1 year. *Mediators Inflamm.*, 2021, Vol. 2021, 9955168. doi: 10.1155/2021/9955168.
22. Potere N., Batticciotto A., Vecchié A., Porreca E., Cappelli A., Abbate A., Dentali F., Bonaventura A. The role of IL-6 and IL-6 blockade in COVID-19. *Expert Rev. Clin. Immunol.*, 2021, Vol. 17, no. 6, pp. 601-618.
23. Principi N., Esposito S. Biomarkers in pediatric community-acquired pneumonia. *Int. J. Mol. Sci.*, 2017, Vol. 18, no. 2, 447. doi: 10.3390/ijms18020447.
24. Ritchie N.D., Ritchie R., Bayes H.K., Mitchell T.J., Evans T.J. IL-17 can be protective or deleterious in murine pneumococcal pneumonia. *PLoS Pathog.*, 2018, Vol. 14, no. 5, e1007099. doi: 10.1371/journal.ppat.1007099.
25. Rose-John S. Interleukin-6 family cytokines. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, 2018, Vol. 10, no. 2, a028415. doi: 10.1101/cshperspect.a028415.
26. Saghaian-Hedengren S., Mathew J.L., Hagel E., Singhi S., Ray P., Ygberg S., Nilsson A. Assessment of cytokine and chemokine signatures as potential biomarkers of childhood community-acquired pneumonia severity: a nested cohort study in india. *Pediatr. Infect. Dis. J.*, 2017, Vol. 36, no. 1, pp. 102-108.
27. Sokal R.R., Rohlf F.J. Biometry, the principles and practice of statistics in biological research, 3rd ed.; W.H. Freeman and Co.: New York, NY, USA, 1997.
28. Stanifer M.L., Guo C., Doldan P., Boulant S. Importance of Type I and III interferons at respiratory and intestinal barrier surfaces. *Front. Immunol.*, 2020, Vol. 11, 608645. doi: 10.3389/fimmu.2020.608645.
29. Wilson R., Cohen J.M., Jose R.J., de Vogel C., Baxendale H., Brown J.S. Protection against Streptococcus pneumoniae lung infection after nasopharyngeal colonization requires both humoral and cellular immune responses. *Mucosal Immunol.*, 2015, Vol. 8, no. 3, pp. 627-639.
30. World Health Organization. Revised WHO Classification and Treatment of Childhood Pneumonia at Health Facilities: Evidence Summaries. Geneva: World Health Organization; 2014. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK264162/>.
31. Ye L., Schnepf D., Staeheli P. Interferon- λ orchestrates innate and adaptive mucosal immune responses. *Nat. Rev. Immunol.*, 2019, Vol. 19, no. 10, pp. 614-625.
32. Yong K.K., Chang J.H., Chien M.H., Tsao S.M., Yu M.C., Bai K.J., Tsao T.C., Yang S.F. Plasma Monocyte chemoattractant protein-1 level as a predictor of the severity of community-Acquired Pneumonia. *Int. J. Mol. Sci.*, 2016, Vol. 17, no. 2, 179. doi: 10.3390/ijms17020179.
33. Yoshioka K. KyPlot – A User-oriented Tool for Statistical Data Analysis and Visualization. *CompStat*, 2002, Vol. 17, iss. 3, 425-437.

Авторы:

Изюрова Н.В. — ассистент кафедры пропедевтики детских болезней и педиатрии ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Челябинск, Россия

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

Authors:

Iziurova N.V., Assistant Professor, Department of Propaedeutics of Children's Diseases and Pediatrics, South Ural Medical State University, Chelyabinsk, Russian Federation

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

Узунова А.Н. — д.м.н., профессор, заведующая кафедрой пропедевтики детских болезней и педиатрии ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Челябинск, Россия

Uzunova A.N., PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Department of Propaedeutics of Children's Diseases and Pediatrics, South Ural Medical State University, Chelyabinsk, Russian Federation

Нохрин Д.Ю. — к.б.н., доцент кафедры микробиологии, иммунологии и общей биологии биологического факультета ФГБОУ ВО «Челябинский государственный университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Челябинск, Россия

Nokhrin D. Yu., PhD (Biology), Associate Professor, Department of Microbiology, Immunology and General Biology, Faculty of Biology, Chelyabinsk State University, Chelyabinsk, Russian Federation

Поступила 24.06.2022
Принята к печати 29.07.2022

Received 24.06.2022
Accepted 29.07.2022

CD3⁺CD294⁺Т-ЛИМФОЦИТЫ 2-ГО ТИПА ИММУННОГО ОТВЕТА И ИХ РОЛЬ В РАЗВИТИИ АЛЛЕРГИЧЕСКОГО ВОСПАЛЕНИЯ

Бычкова Н.В.

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

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

Резюме. Т-лимфоциты 2-го типа иммунного ответа осуществляют защиту от гельминтов и токсинов, а также способствуют развитию аллергического воспаления. Один из наиболее специфичных поверхностных маркеров Т-клеток 2 — молекула CRTH2 (CD294), являющаяся активирующим рецептором для простагландина D₂. Популяция CD3⁺CD294⁺ незначительна в периферической крови здоровых лиц, повышение встречается у пациентов с аллергическими заболеваниями и аутоиммунным характером реагирования. Целью исследования стало изучить количественные и функциональные особенности лимфоцитов 2-го типа иммунного ответа CD3⁺CD294⁺ у пациентов с риноконъюнктивальными симптомами (n = 248) и лекарственной гиперчувствительностью (n = 184). У 68 пациентов с повышенным и крайне высоким количеством CD3⁺CD294⁺ клеток охарактеризован подробный фенотип этой популяции методом проточной цитометрии и исследована функциональная активность изучаемой популяции клеток в отношении продукции интерлейкина-4 и интерферона с помощью иммуноферментного анализа. Группу сравнения составили 34 волонтера. Относительное количество CD3⁺CD294⁺ клеток было значимо выше в группе пациентов с лекарственной гиперчувствительностью — 1,6% и риноконъюнктивальными симптомами — 1,2% по отношению к группе сравнения — 1,0%. Повышенное (1,6-3,6%) и крайне высокое (>3,6%) количество CD3⁺CD294⁺ клеток достоверно чаще выявляли у пациентов с лекарственной гиперчувствительностью. В обеих группах повышение количества CD3⁺CD294⁺ клеток наблюдалось при выраженном повреждении кожного покрова. Определен фенотип популяции Т-лимфоцитов 2-го типа CD45RA-CD3⁺CD294⁺CD2⁺CD5⁺CD7⁺CD27⁺CD28⁺CD57-CCR7⁻, который соответствует Т-лимфоцитам эффекторной памяти. При умеренно повышенном относительном количестве этой популяции Т-лимфоциты 2-го типа иммунного ответа были представлены, как правило, Т-хелперами 2. Выраженное увеличение популяции наблюдалось за счет Т-цитотоксических лимфоцитов 2. Независимо от преобладания хелперной или цитотоксической популяции 2-го типа иммунного ответа у пациентов выявлено увеличение спонтанной продукции интерлейкина-4 при нормальном уровне интерферона. Повышение в периферической крови Т-лимфоцитов 2-го типа с экспрессией CD294 способствует развитию, поддержанию и обострению аллергического воспаления при участии IgE-зависимых и IgE-независимых механизмов. Популяцию CD3⁺CD294⁺ клеток сле-

Адрес для переписки:

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

Address for correspondence:

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

Образец цитирования:

Н.В. Бычкова «CD3⁺CD294⁺ Т-лимфоциты
2-го типа иммунного ответа и их роль в развитии
аллергического воспаления» // Медицинская
иммунология, 2022. Т. 24, № 5. С. 955-966.
doi: 10.15789/1563-0625-CCO-2543
© Бычкова Н.В., 2022

For citation:

N.V. Bychkova "CD3⁺CD294⁺ T cells of the type 2 immune
response: their role in allergic inflammation", Medical
Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2022,
Vol. 24, no. 5, pp. 955-966.
doi: 10.15789/1563-0625-CCO-2543
DOI: 10.15789/1563-0625-CCO-2543

дует определять в качестве дополнительного параметра при оценке наличия сенсibilизации в тесте активации базофилов у пациентов с реакциями гиперчувствительности. Использование этого лабораторного биомаркера для оценки доминирующего типа иммунного воспаления позволит персонализировать терапию обследованных пациентов. Выявление выраженных отклонений показателей от средних значений популяции будет влиять на тактику ведения пациента.

Ключевые слова: Т-лимфоциты 2-го типа иммунного ответа, риноконъюнктивальные симптомы, лекарственная гиперчувствительность

CD3⁺CD294⁺T CELLS OF THE TYPE 2 IMMUNE RESPONSE: THEIR ROLE IN ALLERGIC INFLAMMATION

Bychkova N.V.

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

Abstract. T lymphocytes type 2 immune response protect against helminths and toxins, and also contribute to the development of allergic inflammation. One of the most specific T cell surface markers T lymphocytes 2 is the CCR4 molecule (CD294), which is an activating receptor for prostaglandin D2. The CD3⁺CD294⁺ population is negligible in the peripheral blood of healthy individuals; an increase occurs in patients with allergic diseases and an autoimmune nature of the response. The aim of the study was to study the quantitative and functional characteristics T lymphocytes type 2 immune response in patients with rhinoconjunctival symptoms (n = 248) and drug hypersensitivity (n = 184). In 68 patients with an elevated and extremely high number of CD3⁺CD294⁺ cells, a detailed phenotype of this population was characterized by flow cytometry and the functional activity of the studied cell population in relation to the production of interleukin 4 and interferon γ was studied using enzyme immunoassay. The control group consisted of 34 volunteers. The relative number of CD3⁺CD294⁺ cells was significantly higher in the group of patients with drug hypersensitivity – 1.6% and rhinoconjunctival symptoms – 1.2% compared to the control group – 1.0%. Elevated (1.6–3.6%) and extremely high (>3.6%) CD3⁺CD294⁺ cell number were significantly more frequently detected in patients with drug hypersensitivity. In both groups, an increase in the number of CD3⁺CD294⁺ cells were observed with severe damage to the skin. The phenotype of the population T lymphocytes type 2 CD45RA-CD3⁺CD294⁺CD2⁺CD5⁺CD7⁺CD27⁺CD28⁺CD57-CCR4⁺ was determined, which corresponds to effector memory T lymphocytes. With a moderately increased relative amount of this population, T lymphocytes 2 were usually represented by T helpers 2. A pronounced increase in the population was observed due to T cytotoxic lymphocytes 2. Regardless of the predominance of the T helper or T cytotoxic 2 cells in patients revealed an increase in spontaneous production of interleukin 4 at a normal level of interferon. An increase in the peripheral blood T lymphocytes with CD294 expression contributes to the development, maintenance and exacerbation of allergic inflammation with the participation of IgE-dependent and IgE-independent mechanisms. The CD3⁺CD294⁺ cell population should be determined as an additional parameter in assessing the presence of sensitization in the basophil activation test in patients with hypersensitivity reactions. The use of this laboratory biomarker to assess the dominant type of immune inflammation will make it possible to personalize the therapy of the examined patients. Identification of pronounced deviations of indicators from the average values of a population will influence the tactics of patient management.

Keywords: T cells, type 2 immune response, rhino-conjunctival symptoms, drug hypersensitivity

Введение

В периферической крови и анатомических компартментах охарактеризовано множество субпопуляций Т-лимфоцитов, различающихся по своим функциям в иммунном ответе, что определяется профилем продуцируемых ими цитокинов и экспрессией внутриклеточных и по-

верхностных молекул [4, 21]. Было определено, что Т-лимфоциты 2-го типа иммунного ответа осуществляют защиту от гельминтов и токсинов, а также способствуют развитию аллергического воспаления [24]. В настоящее время существует мнение, что клетки 2-го типа иммунного ответа также осуществляют контроль хронических вос-

палительных заболеваний, метаболического гомеостаза, репарации и фиброобразования тканей и др. [13].

Одним из наиболее специфичных поверхностных маркеров Т-клеток 2-го типа иммунного ответа является молекула CRTH2 (CD294, chemoattractant receptor-homologous molecule expressed on T helper cells), экспрессируемая вне лимфоидной популяции на эозинофилах, базофилах, тучных клетках, субпопуляции провоспалительных моноцитов [30, 39]. CRTH2 является активирующим рецептором для простагландина D₂ [32], взаимодействие рецептора и лиганда приводит к усилению миграции и активации Т-лимфоцитов 2-го типа, а также обеспечивает мобилизацию эозинофилов и базофилов из костного мозга, активацию тучных клеток в тканях [29, 32], что способствует персистирующему аллергическому воспалению. CD3⁺CD294⁺ лимфоциты синтезируют и продуцируют интерлейкины 4 (IL-4), 5 (IL-5), 13 (IL-13) в отсутствие синтеза интерферона γ (IFN γ) [28]. Эти клетки характеризуются экспрессией CD45RO, CD25, CCR6 и отсутствием экспрессии CD45RA и CD27 [23, 28, 30], что определяет их как одну из популяций антиген-активированных Т-лимфоцитов памяти.

Популяция CD3⁺CD294⁺ незначительна в периферической крови здоровых лиц и составляет 0,5-1,5% от всего пула лимфоцитов [2, 36]. Повышение по сравнению с референтным интервалом встречается у пациентов с аллергическими заболеваниями [3, 5, 23], а также аутоиммунным характером реагирования [8, 27].

Целью исследования стало изучить количественные и функциональные особенности лимфоцитов 2-го типа иммунного ответа CD3⁺CD294⁺ у пациентов с риноконъюнктивальными симптомами и лекарственной гиперчувствительностью.

Материалы и методы

В исследование были включены 248 пациентов ВЦЭРМ им. А.М. Никитова МЧС России с сенсibilизацией к ингаляционным аллергенам, риноконъюнктивальными симптомами и/или патологией верхних и средних дыхательных путей (68 мужчин и 180 женщин, от 18 до 71 года, 40,9 $\pm$ 0,7 г.). Пациенты предъявляли жалобы на заложенность носа, затруднение носового дыхания, насморк, чихание, кашель, слезотечение, зуд век. У пациентов была диагностирована бронхиальная астма легкой или средней тяжести, аллергический ринит либо их сочетание.

Вторую обследованную группу составили 184 пациента ВЦЭРМ им. А.М. Никитова МЧС России (52 мужчины и 132 женщины, от 29 до 81

года, 61,9 $\pm$ 0,8) с симптомами лекарственной гиперчувствительности при приеме лекарственных средств, в 75% случаев установлена местная либо системная реакция на йодсодержащие, в том числе рентгеноконтрастные, препараты. Гиперчувствительность к препаратам у этих пациентов сопровождалась дерматитами с симптомами зуда, покраснения, ожога кожи, распухания тканей, отмечались локализованные уртикарные высыпания или генерализованная крапивница, отеки, в том числе гортани, а также бронхоспазм.

Третья группа пациентов, специально отобранная среди обследуемых в связи с реакциями лекарственной гиперчувствительности лиц — 68 человек (20 мужчин и 48 женщин, от 30 до 78 лет, 67,1 $\pm$ 1,5 г.). Она состояла из пациентов с повышенным ($n = 26$) (1,5-3,6%) и крайне высоким ($n = 42$) (более 3,6%) относительным количеством Т-клеток 2-го типа.

Группу сравнения составили 34 волонтера (12 мужчин и 22 женщины, от 24 до 76 лет, 55,1 $\pm$ 1,5 г.). Волонтеры не имели реакций гиперчувствительности в анамнезе, онкологических заболеваний, в момент исследования отсутствовали острые и не было обострения хронических заболеваний.

Всем пациентам проводили оценку сенсibilизации к различным аллергенам в тесте активации базофилов методом проточной цитометрии (FC500, Beckman Coulter) с использованием набора Allergenicity kit (Cellular Analysis of Allergy, Beckman Coulter) согласно инструкции производителя, как было подробно описано ранее [1]. Периферическую кровь забирали из локтевой вены в вакутейнеры с гепарином лития и исследовали в лаборатории в течение 2 часов после взятия. В качестве дополнительного параметра исследовали относительное количество Т-лимфоцитов 2-го типа иммунного ответа CD3⁺CD294⁺.

Пациентам третьей группы дополнительно проведено изучение субпопуляционной принадлежности Т-лимфоцитов 2-го типа с расширенным исследованием их фенотипа в многоцветном анализе методом проточной цитометрии с использованием моноклональных антител к CD294, CD2, CD3, CD4, CD5, CD7, CD8, CD27, CD28, CD45, CD45RA, CD57, CCR7 (Navios, Beckman Coulter, США). Для лизирования эритроцитов использовали OptiLyse C (Beckman Coulter, США).

У пациентов третьей группы изучены спонтанная, индуцированная продукция IL-4 и IFN γ , а также их содержание в сыворотке крови методом твердофазного иммуноферментного анализа (АО «Вектор-Бест», Россия).

Статистическую обработку результатов проводили с помощью пакета Statistica 12.0 (StatSoft,

США) с определением описательных статистик (медианы и квартилей). Статистическую значимость различий в группах оценивали при помощи непараметрического U-критерия Манна–Уитни для независимых переменных. Для выявления и оценки тесноты связи между количественными признаками использовали непараметрический корреляционный анализ по Спирмену. Частотный анализ проводили с использованием четырехпольных таблиц сопряженности на основании критерия χ^2 Пирсона. Статистически значимыми различия сравниваемых показателей считали при $p < 0,05$.

Результаты

При анализе данных выявлено, что относительное количество Т-лимфоцитов 2-го типа иммунного ответа $CD3^+CD294^+$ было в полтора раза выше в группе пациентов с лекарственной гиперчувствительностью — 1,6% (1,0-2,4) и на 20% выше у пациентов с риноконъюнктивальными симптомами — 1,2% (0,8-1,8) по отношению к группе сравнения — 1,0% (0,6-1,3), $p < 0,01$. Установлено статистически значимое повышение этой популяции клеток у лиц с лекарственной гиперчувствительностью по сравнению с пациентами с риноконъюнктивальными симптомами, $p < 0,01$.

В обеих группах обследованных пациентов выявлена выраженная гетерогенность относительного количества Т-лимфоцитов 2-го типа иммунного ответа $CD3^+CD294^+$. Пациенты первой и второй групп были разделены на 3 подгруппы — с нормальным (0,3-1,5%), умеренно повышенным (1,6-3,6%) и крайне высоким (более 3,6%) относительным количеством Т-лимфоцитов с фенотипом $CD3^+CD294^+$ (табл. 1).

Как видно из таблицы 1, у пациентов с лекарственной гиперчувствительностью по сравнению с другой группой в 2 раза чаще были выявлены крайне высокие значения Т-лимфоцитов 2-го типа иммунного ответа, в 1,5 раза чаще этот параметр был умеренно повышенным, различия статистически значимы при попарном сравнении согласно критерию χ^2 .

Клиническими проявлениями лекарственной гиперчувствительности были, в основном, дерматиты с папулезными и эритематозными элементами, а также крапивница и отеки слизистых. У части пациентов с риноконъюнктивальными симптомами наряду с патологией верхних и средних дыхательных путей были проявления аллергического, контактного и хронического дерматитов, экзематиды, токсико-аллергические реакции с поражением кожного покрова распро-

страненного характера и рецидивирующего течения.

Обследованные пациенты с риноконъюнктивальными симптомами были сгруппированы следующим образом: пациенты с изолированным аллергическим ринитом, бронхиальной астмой, в том числе сопровождаемой ринитом, а также лица, у которых ринит и/или астма сочетались с кожными поражениями. У пациентов с ринитом количество Т-лимфоцитов 2-го типа иммунного ответа было невелико и находилось на уровне группы сравнения, значимо отличаясь от показателей в двух других группах пациентов (табл. 2).

Пациенты с сочетанным кожным поражением имели самое высокое относительное количество Т-лимфоцитов 2-го типа иммунного ответа и значимо отличались по этому параметру от двух остальных групп больных с риноконъюнктивальными симптомами (табл. 2). Значение этого показателя в 3-й группе больных было сопоставимо с таковым у пациентов с лекарственной гиперчувствительностью, где клиническими проявлениями, в основном, были поражения кожного покрова.

Для выявления фенотипических и функциональных особенностей Т-лимфоцитов 2-го типа иммунного ответа $CD3^+CD294^+$ в периферической крови пациентов третьей группы была проанализирована экспрессия ряда поверхностных молекул на этих клетках и продукция оппозитных цитокинов.

В результате исследования определен фенотип популяции Т-лимфоцитов 2, экспрессирующих $CD294$, — $CD45RA^-CD3^+CD294^+CD2^+CD5^+CD7^+CD27^+CD28^+CD57^-CCR7^-$. Молекулы $CD2$, $CD5$, $CD28$ были экспрессированы на 100% клеток $CD3^+CD294^+$, маркеры $CD27$ и $CD7$ на 60-85%. Отсутствие экспрессии $CD45RA$ и $CCR7$ позволяет классифицировать эту популяцию как клетки эффекторной памяти [11], а согласно расширенной классификации Mathew D. [26], это клетки эффекторной памяти 1-го типа EM1 с фенотипом $CD45RA^-CD27^+CCR7^-$. В отличие от клеток центральной памяти с фенотипом $CD45RA^-CD27^+CCR7^+$, клетки эффекторной памяти активно пролиферируют и секретируют цитокины в ответ на антигенную стимуляцию.

В отличие от исследования Rudulier C.D. и соавт. [30] в нашей работе большинство клеток $CD3^+CD294^+$ экспрессировали $CD27$. Возможно, это расхождение объясняется тем, что авторы изучали популяцию Т-хелперов 2 $CD3^+CD4^+CD294^+$, а согласно нашим данным, экспрессия $CD27$ выше на цитотоксических Т-лимфоцитах 2, где она составила 70% и выше по сравнению с популяцией $CD3^+CD4^+CD294^+$,

ТАБЛИЦА 1. ЧАСТОТА ВЫЯВЛЕНИЯ ПАЦИЕНТОВ С НОРМАЛЬНЫМ, ПОВЫШЕННЫМ И КРАЙНЕ ВЫСОКИМ КОЛИЧЕСТВОМ Т-ЛИМФОЦИТОВ 2-ГО ТИПА ИММУННОГО ОТВЕТА В РАЗНЫХ ГРУППАХ ПАЦИЕНТОВ, N (%)

TABLE 1. FREQUENCY OF DETECTION OF PATIENTS WITH NORMAL, ELEVATED AND EXTREMELY HIGH NUMBER OF T LYMPHOCYTES TYPE 2 IMMUNE RESPONSE IN DIFFERENT GROUPS OF PATIENTS, N (%)

CD3⁺CD294⁺ %	Референтный интервал Reference interval %	Сенсибилизация к ингаляционным аллергенам Sensitization to inhalant allergens N (%)	Лекарственная гиперчувствительность Drug hypersensitivity N (%)	Значимость различий Significance of differences
Нормальное количество 0,3-1,5 Normal number 0.3-1.5	0,3-1,5	168 (68)	90 (49)	p < 0,001
Повышенное количество 1,6-3,5 Elevated number 1.6-3.5		66 (27)	75 (41)	p < 0,01
Крайне высокое количество более 3,6 Extremely high number over 3.6		14 (5)	19 (10)	p < 0,05

ТАБЛИЦА 2. КОЛИЧЕСТВО Т-ЛИМФОЦИТОВ 2-ГО ТИПА ИММУННОГО ОТВЕТА В РАЗЛИЧНЫХ ГРУППАХ ПАЦИЕНТОВ, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75}), %

TABLE 2. NUMBER OF T LYMPHOCYTES TYPE 2 IMMUNE RESPONSE IN DIFFERENT GROUPS OF PATIENTS, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75}), %

Аллергический ринит 1-я группа Allergic rhinitis 1st group n = 116	Бронхиальная астма легкой либо средней степени тяжести 2-я группа Bronchial asthma of mild or moderate severity 2nd group n = 110	Дополнительные проявления дерматитов 3-я группа Additional manifestations of dermatitis 3rd group n = 22	Группа сравнения 4-я группа Control group 4th group n = 34	Значимость отличий Significance of differences
1,0*, ** (0,8-1,5)	1,3*, ***, **** (0,9-1,9)	2,0**, ***, **** (1,4-2,7)	1,0 (0,6-1,3)	* p < 0,01 между 1 и 2 between 1 and 2 ** p < 0,0001 между 1 и 3 between 1 and 3 *** p < 0,001 между 2 и 3 between 2 and 3 **** p < 0,001 в отношении группы сравнения in relation to the control group

ТАБЛИЦА 3. КОЛИЧЕСТВО ПОПУЛЯЦИЙ Т-ЛИМФОЦИТОВ В ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ПАЦИЕНТОВ С ПОВЫШЕННЫМ И КРАЙНЕ ВЫСОКИМ КОЛИЧЕСТВОМ Т-ЛИМФОЦИТОВ 2-ГО ТИПА ИММУННОГО ОТВЕТА, Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$), %

TABLE 3. NUMBER OF POPULATIONS OF T LYMPHOCYTES IN THE PERIPHERAL BLOOD OF PATIENTS WITH AN ELEVATED AND EXTREMELY HIGH NUMBER OF T LYMPHOCYTES TYPE 2 IMMUNE RESPONSE, Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$), %

Параметр Parameter	Референтные значения Reference values	Повышенное количество CD3 ⁺ CD294 ⁺ Elevated number CD3 ⁺ CD294 ⁺ n = 26	Крайне высокое количество CD3 ⁺ CD294 ⁺ Extremely high number CD3 ⁺ CD294 ⁺ n = 42	Значимость различий Significance of differences
CD3⁺ (Т-лимфоциты) CD3 ⁺ (T lymphocytes)	67-82	77,0 (73-78)	77,5 (73-83)	p > 0,05
CD3⁺CD4⁺ (Т-хелперы) CD3 ⁺ CD4 ⁺ (T helpers)	37-52	49,0 (44-54)	44,5 (39-52)	p > 0,05
CD3⁺CD8⁺ (Т-цитотоксические) CD3 ⁺ CD8 ⁺ (T cytotoxic)	21-34	25,0 (21-27)	29,0 (26-36)	p < 0,05
CD3⁺CD4⁺CD8⁺ («дубль-позитивные» Т-клетки) CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD8 ⁺ ("double-positive" T cells)	0,3-1,2	0,8 (0,7-1,1)	1,8 (1,2-2,5)	p < 0,001
CD3⁺CD294⁺ (Т-лимфоциты 2-го типа) CD3 ⁺ CD294 ⁺ (T lymphocytes type 2)	0,3-1,5	2,1 (1,5-2,4)	7,2 (5,0-9,1)	p < 0,000001
CD3⁺CD4⁺CD294⁺ (Т-хелперы 2-го типа) CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD294 ⁺ (T helpers type 2)	0,2-1,2	1,6 (1,2-1,9)	2,0 (1,4-2,5)	p > 0,05
CD3⁺CD8⁺CD294⁺ (Т-цитотоксические 2-го типа) CD3 ⁺ CD8 ⁺ CD294 ⁺ (T cytotoxic type 2)	0,1-0,3	0,5 (0,3-0,7)	5,7 (3,6-8,4)	p < 0,000001

где количество клеток, экспрессирующих CD27, было на уровне 30-50%.

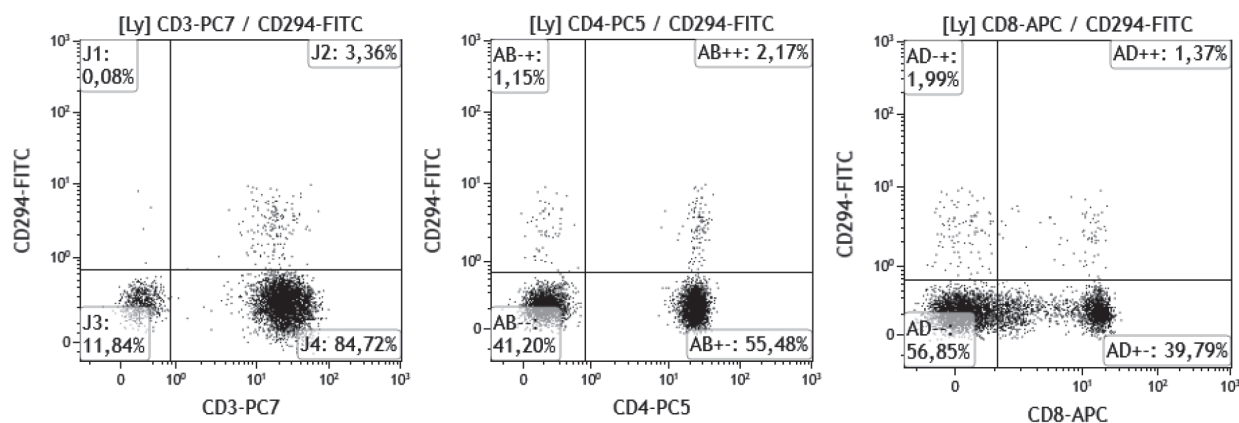
Далее был исследован субпопуляционный состав Т-лимфоцитов периферической крови пациентов 3-й группы. У пациентов с крайне высоким относительным количеством Т-клеток CD3⁺CD294⁺ выявлено значимое увеличение относительного количества Т-цитотоксических лимфоцитов, не выходящее за верхнюю границу референтных значений, и «дубль-позитивных» Т-лимфоцитов, причем количество последних было в полтора раза выше верхней границы референтного интервала (табл. 3).

Согласно полученным данным, при умеренно повышенном относительном количестве Т-лимфоцитов, экспрессирующих CD294

(как и у здоровых лиц без повышения этой популяции клеток), Т-лимфоциты 2-го типа иммунного ответа были представлены, как правило, Т-хелперами 2 (Th2), что описывается в литературе [30, 38]. Выраженное увеличение популяции CD3⁺CD294⁺ наблюдалось, напротив, за счет Т-цитотоксических лимфоцитов 2-го типа иммунного ответа (Tc2) с фенотипом CD3⁺CD8⁺CD294⁺ (табл. 3, рис. 1). Эти данные согласуются с нашими предварительными результатами [2].

При исследовании фенотипических особенностей Т-лимфоцитов 2-го типа иммунного ответа мы впервые обнаружили, что молекула CD28 экспрессируется на всей популяции CD3⁺CD294⁺ клеток. Известно, что CD28, гликопротеиновый

А (А)



Б (В)

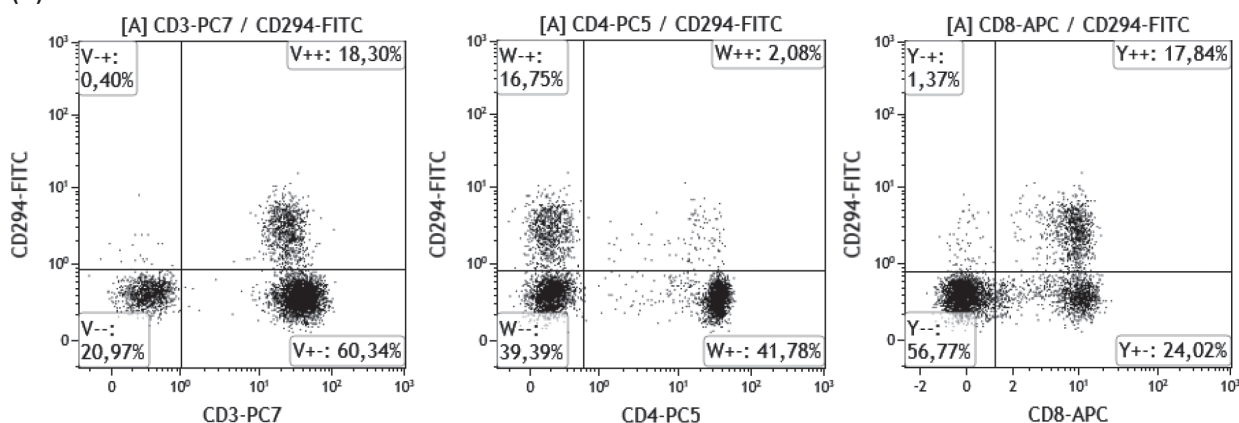


Рисунок 1. Экспрессия CD294 на Т-лимфоцитах CD3⁺, Т-хелперах CD3⁺CD4⁺ и Т-цитотоксических CD3⁺CD8⁺ лимфоцитах у пациентов с повышенным (А) и крайне высоким (Б) количеством Т-клеток 2-го типа иммунного ответа

Figure 1. Expression of CD294 on CD3⁺T lymphocytes, CD3⁺CD4⁺T helpers and CD3⁺CD8⁺T cytotoxic lymphocytes in patients with elevated (A) and extremely high (B) number of T cells 2

рецептор клеточной поверхности, принадлежит к суперсемейству иммуноглобулинов и преимущественно экспрессируется на активированных Т-клетках, обеспечивая необходимый костимулирующий сигнал в процессе презентации антигена [20, 40]. Его функция заключается в усилении сигнала Т-клеточного рецептора в случае распознавания им антигена, несущего реальную угрозу организму [7]. В экспериментальных работах показано, что стимуляция Т-клеток через рецептор CD28 приводила к значительному возрастанию в процессе культивирования эффекторной популяции лимфоцитов с увеличением их цитотоксического потенциала, а именно экспрессии гранзима В и перфорина [33].

При исследовании цитокинового профиля было выявлено, что спонтанная продукция IFN γ ,

индуцированная продукция IFN γ и IL-4, а также содержание в сыворотке исследованных цитокинов в обеих группах пациентов с лекарственной гиперчувствительностью не выходили за пределы референтного интервала и не различались, независимо от преобладания в периферической крови лиц первой группы Th2, а второй Tc2-лимфоцитов (табл. 4).

У пациентов с повышенным и крайне высоким количеством Т-лимфоцитов 2-го типа иммунного ответа выявлено увеличение спонтанной продукции IL-4, этот параметр был в два раза выше верхней границы референтного интервала в обеих группах, что доказывало возможность синтеза IL-4 как Т-хелперами, так и Т-цитотоксическими лимфоцитами в случае принадлежности их к Т2-типу иммунного ответа. Ранее было упоми-

ТАБЛИЦА 4. СПОНТАННАЯ И ИНДУЦИРОВАННАЯ ПРОДУКЦИЯ ЦИТОКИНОВ, СОДЕРЖАНИЕ ИХ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ПАЦИЕНТОВ С ПОВЫШЕННЫМ И КРАЙНЕ ВЫСОКИМ КОЛИЧЕСТВОМ Т-ЛИМФОЦИТОВ 2-ГО ТИПА ИММУННОГО ОТВЕТА, Ме ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$), пг/мл

TABLE 4. SPONTANEOUS AND INDUCED PRODUCTION OF CYTOKINES, THEIR CONTENT IN THE BLOOD SERUM OF PATIENTS WITH AN ELEVATED AND EXTREMELY HIGH NUMBER OF T LYMPHOCYTES TYPE 2 IMMUNE RESPONSE, Ме ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$), pg/mL

Параметр Parameter	Референтные значения Reference values	Повышенное количество CD3 ⁺ CD294 ⁺ Elevated number CD3 ⁺ CD294 ⁺ n = 26	Крайне высокое количество CD3 ⁺ CD294 ⁺ Extremely high number CD3 ⁺ CD294 ⁺ n = 42	Значимость различий Significance of differences
IL-4 (спонтанная продукция) IL-4 (spontaneous production)	0-2	4,0 (3,0-7,0)	4,0 (1,0-7,0)	p > 0,05
IL-4 (индуцированная продукция) IL-4 (induced production)	0-24	17 (13-19)	22 (12-26)	p > 0,05
IL-4 (содержание в сыворотке крови) IL-4 (in blood serum)	0-4	2,0 (1,0-3,0)	2,0 (1,0-4,0)	p > 0,05
IFNγ (спонтанная продукция) IFN γ (spontaneous production)	0-6	4,0 (3,0-5,0)	2,0 (2,0-11,0)	p > 0,05
IFNγ (индуцированная продукция) IFN γ (induced production)	281-4335	1350 (989-1833)	1965 (1260-3030)	p > 0,05
IFNγ (содержание в сыворотке крови) IFN γ (in blood serum)	0-10	2,0 (2,0-2,3)	2,0 (2,0-2,0)	p > 0,05

нение [14], что CD8⁺Т-лимфоциты центральной памяти наряду с Т-хелперами имеют возможность синтезировать различные цитокины, а тропные к коже и кишечному эпителию CD8⁺ Т-лимфоциты даже превосходили Т-хелперы по продукции различных цитокинов.

Выявлена обратная корреляционная зависимость между количеством CD3⁺CD294⁺ клеток и содержанием в сыворотке IFN γ у пациентов с повышенным содержанием Т-лимфоцитов 2-го типа ($R = -0,53$), а также индуцированной продукцией этого главного цитокина 1-го типа иммунного ответа в группе пациентов с крайне высоким количеством этих клеток ($R = -0,38$).

Выявленная закономерность свидетельствовала о подавлении активности клеток 1-го типа иммунного ответа при высоком содержании лимфоцитов 2-го типа.

В исследовании определено, что пациенты с повышенным и крайне высоким содержанием CD3⁺CD294⁺ лимфоцитов различались по клиническим проявлениям аллергической реакции. У пациентов с лекарственной гиперчувствительностью, у которых было выявлено более 3,6% CD3⁺CD294⁺ клеток, чаще отмечены проявления различных дерматитов – у 28 из 42 обследованных лиц, т. е. в 65% против 3 из 26 человек в другой группе, где частота составила 12% ($p < 0,05$).

согласно критерию χ^2). Атопический, контактный дерматит, розацеа, нейродермит, диагностированные у пациентов с крайне высоким количеством в периферической крови Т-лимфоцитов 2-го типа иммунного ответа, сопровождались значительными высыпаниями, длительно текущим зудом и плохо поддавались стандартной терапии. Возможно, нахождение в периферической крови высокого количества CD3⁺CD294⁺ клеток с преимущественным фенотипом цитотоксических Т-клеток отражает ситуацию их повышения в коже, где они способны усиливать воспаление, что будет сопровождаться повреждением тканей.

Обсуждение

Накопленные в последнее время данные о функциональном разнообразии популяций цитотоксических Т-лимфоцитов меняют общепринятый взгляд на возможности и функции Т-хелперов CD4⁺ и Т-цитотоксических CD8⁺ лимфоцитов. Показано, что цитотоксические клетки Тс2, Тс17 и Тс22, в отличие от популяций Тс1 и Тс17+1, не обладают цитотоксическим потенциалом и вместо этого проявляют регуляторные функции, присущие Т-хелперам, включая экспрессию CD40L [25]. У пациентов со склеродермией было выявлено, что CD8⁺ Т-лимфоциты вызывают утолщение кожи, синтезируя высокое количество IL-13, что приводило к профибротическому фенотипу дермальных фибробластов [9]. При этом было показано, что Т-хелперы продуцировали более низкое количество IL-13 по сравнению с Т-цитотоксическими лимфоцитами.

Выявлена пластичность Т-цитотоксических лимфоцитов — в присутствии IL-4 эти клетки могли менять профиль экспрессии генов, переходить из Тс1- в Тс2-клетки с переключением синтеза IFN γ на продукцию IL-4 и IL-13, что было показано у пациентов с бронхиальной астмой [18].

Участие резидентных цитотоксических Т-клеток памяти установлено в патогенезе ряда аллергических заболеваний, сопровождающихся кожными проявлениями, а именно при токсическом эпидермальном некролизе [19], экзематозном пустулезе [37], кожных реакциях гиперчувствительности к лекарственным средствам [35]. Высказывается мнение [12], что в отличие от ранних работ о значении Т-хелперов 2-го типа в настоящее время накоплено много данных, подтверждающих основную патогенетическую роль именно Т-цитотоксических клеток 2 в разных тканях. Авторы полагают, что именно CD8⁺Т-резидентные клетки памяти ответственны за развитие обострений при экземе, аллергическом

контактном дерматите и реакциях гиперчувствительности на лекарства [12].

Поскольку резидентные Т-клетки являются нециркулирующими, возможность их определения в крови в целях лабораторной диагностики невелика. Значительно более интересны популяции циркулирующих эффекторных Т-клеток памяти с экспрессией CD8⁺, которым посвящено меньше исследований. Описана одна популяция Т-цитотоксических эффекторных клеток памяти с фенотипом CD8⁺CCR10⁺, которые были выявлены в коже и периферической крови [22]. Их классифицировали как Тс2-клетки по профилю продуцируемых цитокинов — IL-4 и IL-13. Ранее были описаны Т-хелперы 2-го типа CD4⁺CCR10⁺ [34] со схожими регуляторными функциями. Повышение популяции CD8⁺CCR10⁺, но не CD4⁺CCR10⁺, в периферической крови наблюдалось у пациентов с псориатическим артритом и не фиксировалось у больных псориазом без артрита и здоровых доноров, что может быть использовано для мониторинга вероятности развития артрита у пациентов с псориазом.

В тесте активации лимфоцитов *in vitro* описано выявление цитотоксических Т-клеток памяти со специфическим к лекарству Т-клеточным рецептором у пациентов с тяжелыми побочными реакциями, затрагивающими кожу по механизму замедленной гиперчувствительности, на ароматические противоэпилептические препараты [10]. Вероятно, выявленное в нашем исследовании выраженное увеличение в периферической крови Т-клеток эффекторной памяти CD45RA⁺CD3⁺CD8⁺CD294⁺CD27⁺CD28⁺CCR7⁻ отражает возможность развития у пациентов в том числе и замедленных реакций гиперчувствительности IV типа.

Параллельно Т-лимфоциты 2 участвуют в развитии аллергического воспаления немедленного типа. Показана возможность индукции этой субпопуляцией лимфоцитов синтеза IgE плазматическими клетками [15]. Ранее была выявлена значимая корреляция между концентрацией общего иммуноглобулина Е и относительным количеством CD3⁺CD294⁺ лимфоцитов у пациентов с хронической крапивницей [6]. Установлено, что количество CD3⁺CRTH2⁺ в периферической крови пациентов увеличивалось при обострении астмы и коррелировало с показателями опросников ACQ6 и AQLQ, демонстрирующих уровень контроля симптомов астмы [32].

Т-лимфоциты 2 также участвуют в индукции и поддержании эозинофильного и нейтрофильного воспаления. Цитокины 2-го типа иммунного ответа, синтезируемые этой популяцией клеток,

вызывали накопление эозинофилов в коже в эксперименте с овальбумином в качестве эпитопного аллергена [16]. Дополнительно показано, что простагландин D₂, действующий через свой активирующий рецептор CRTH2 (CD294), удлинял и ухудшал позднюю фазу воспалительного ответа, способствуя активации нейтрофилов [31].

В нашем исследовании была выявлена прямая корреляционная зависимость между относительным количеством CD3⁺CD294⁺ и эозинофилов ($R = 0,4$, $p < 0,05$) у пациентов с бронхиальной астмой. Высокое количество CD3⁺CD8⁺CRTH2⁺ в периферической крови, по данным Hilvering B. и соавт. [17], наблюдалось у пациентов с тяжелым эозинофильным фенотипом бронхиальной астмы. Негативная роль выраженного увеличения популяции Tc2 при бронхиальной астме подтверждается тем, что эти клетки являются более стероидрезистентными, чем Т-хелперы 2-го типа [18].

Заключение

В исследовании впервые описан расширенный фенотип популяции Т-лимфоцитов 2-го типа иммунного ответа CD45RA⁺CD3⁺CD294⁺CD2⁺CD5⁺CD7⁺CD27⁺CD28⁺CCR7⁻, соответствующий Т-клеткам эффекторной памяти. Увеличе-

ние в периферической крови этой популяции способствует развитию, поддержанию и обострению аллергического воспаления с участием нескольких механизмов. Т-лимфоциты 2-го типа являются одними из центральных звеньев патогенеза при реакциях гиперчувствительности немедленного, замедленного типов, эозинофильного и нейтрофильного аллергического воспаления. Особенно неблагоприятным фактором является выявление цитотоксических Т-лимфоцитов 2, которые доминируют при значительно повышенном относительном количестве лимфоцитов CD3⁺CD294⁺.

В отличие от резидентных клеток памяти популяция с фенотипом CD3⁺CD294⁺ присутствует в периферической крови и может быть выявлена методами лабораторной диагностики. В качестве дополнительного параметра при оценке наличия сенсибилизации в тесте активации базофилов следует определять количество Т-лимфоцитов, экспрессирующих CD294⁺. Использование этого лабораторного биомаркера для характеристики доминирующего типа иммунного воспаления позволит персонализировать терапию пациентов. Выявление выраженных отклонений показателей от средних значений популяции будет влиять на тактику ведения пациента.

Список литературы / References

1. Бычкова Н.В., Селиванов П.А., Калинина Н.М. Клиническая значимость выявления сенсибилизации к йодсодержащим рентгеноконтрастным веществам в тесте активации базофилов методом проточной цитометрии // Клиническая лабораторная диагностика, 2021. Т. 66, № 12. С. 747-754. [Bychkova N.V., Selivanov P.A., Kalinina N.M. Clinical significance of detecting sensitization to iodine-containing radiopaque substances in the basophil activation test by flow cytometry. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika = Russian Clinical Laboratory Diagnostics*, 2021, Vol. 66, no. 12, pp. 747-754. (In Russ.)]
2. Бычкова Н.В., Чиненова Л.В., Калинина Н.М. Увеличение Т-цитотоксических 2 лимфоцитов с фенотипом CD3⁺CD8⁺CD294⁺ у пациентов с тяжелыми кожными проявлениями лекарственной аллергии // Российский иммунологический журнал, 2017. Т. 11 (20), № 4. С. 687-689. [Bychkova N.V., Chinenova L.V., Kalinina N.M. Increase in T-cytotoxic 2 lymphocytes with CD3⁺CD8⁺CD294⁺ phenotype in patients with severe skin manifestations of drug allergy. *Rossiyskiy immunologicheskiy zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2017, Vol. 11 (20), no. 4, pp. 687-689. (In Russ.)]
3. Калинина Н.М., Синельникова Н.А., Бычкова Н.В. Клинические и лабораторные показатели при хронической крапивнице у детей и взрослых // Российский иммунологический журнал, 2016. Т. 10 (19), № 2 (1). С. 321-323. [Kalinina N.M., Sinelnikova N.A., Bychkova N.V. Clinical and laboratory parameters for chronic urticaria in children and adults. *Rossiyskiy immunologicheskiy zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2016, Vol. 10 (19), no. 2 (1), pp. 321-323. (In Russ.)]
4. Кудрявцев И.В., Борисов А.Г., Васильева Е.В., Кробинец И.И., Савченко А.А., Серебрякова М.К., Тотолян Арег А. Фенотипическая характеристика цитотоксических Т-лимфоцитов: регуляторные и эффекторные молекулы // Медицинская иммунология, 2018. Т. 20, № 2. С. 227-240. [Kudryavtsev I.V., Borisov A.G., Vasilieva A.V., Krobinec I.I., Savchenko A.A., Serebryakova M.K., Totolyan Areg A. Phenotypic characteristics of cytotoxic T-lymphocytes: regulatory and effector molecules. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2018, Vol. 20, no. 2, pp. 227-240. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2018-2-227-240.
5. Лабис В.В., Базилян Э.А., Сизова С.В., Железный В.В., Бычкова Н.В., Козлов И.Г. Базофильный тест в практической медицине // Практическая медицина, 2019. № 1. С. 76-79. [Labis V.V., Bazikyan E.A., Sizova S.V., Zheleznyj V.V., Bychkova N.V. Basophilic test in practical medicine. *Prakticheskaya medicina = Practical Medicine*, 2019, no. 1, pp. 76-79. (In Russ.)]

6. Синельникова Н.А., Бычкова Н.В., Калинина Н.М. Особенности иммунного ответа и активации базофилов у детей с хронической крапивницей // Медицинская иммунология, 2015. Т. 17, № 1. С. 39-46. [Sinelnikova N.A., Bychkova N.V., Kalinina N.M. Features of the immune response and activation of basophil in children with chronic urticaria. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2015, Vol. 17, no. 1, pp. 39-46. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2015-1-39-46.
7. Beyersdorf N., Kerkau T. CD28-Kostimulation und Checkpointblockade in T-Zellen [CD28 costimulation and checkpoint inhibition in T cells]. *Internist (Berl.)*, 2020, Vol. 61, no. 7, pp. 652-659.
8. Boin F., De Fanis U., Bartlett S.J., Wigley F.M., Rosen A., Casolaro V. T cell polarization identifies distinct clinical phenotypes in scleroderma lung disease. *Arthritis Rheum.*, 2008, Vol. 58, no. 4, pp. 1165-1174.
9. Cascio S., Medsger T.A. Jr, Hawse W.F., Watkins S.C., Milcarek C., Moreland L.W., Lafyatis R.A., Fuschiotti P. 14-3-3z sequesters cytosolic T-bet, upregulating IL-13 levels in Tc2 and CD8⁺ lymphocytes from patients with scleroderma. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2018, Vol. 142, no. 1, pp. 109-119.e6.
10. Chu M.T., Wang C.W., Chang W.C., Chen C.B., Chung W.H., Hung S.I. Granulysin-based lymphocyte activation test for evaluating drug causality in antiepileptics-induced severe cutaneous adverse reactions. *J. Invest. Dermatol.*, 2021, Vol. 141, no. 6, pp. 1461-1472.e10.
11. de Biasi S., Meschiari M., Gibellini L., Bellinazzi C., Borella R., Fidanza L., Gozzi L., Iannone A., Lo Tartaro D., Mattioli M., Paolini A., Menozzi M., Milić J., Franceschi G., Fantini R., Tonelli R., Sita M., Sarti M., Trenti T., Brugioni L., Cicchetti L., Facchinetti F., Pietrangelo A., Clini E., Girardis M., Guaraldi G., Mussini C., Cossarizza A. Marked T cell activation, senescence, exhaustion and skewing towards TH17 in patients with COVID-19 pneumonia. *Nat. Commun.*, 2020, Vol. 11, no. 1, 3434. doi: 10.1038/s41467-020-17292-4.
12. Emmanuel T., Mistegård J., Bregnhøj A., Johansen C., Iversen L. Tissue-resident memory T cells in skin diseases: a systematic review. *Int. J. Mol. Sci.*, 2021, Vol. 22, no. 16, 9004. doi: 10.3390/ijms22169004.
13. Gause W.C., Rothlin C., Loke P. Heterogeneity in the initiation, development and function of type 2 immunity. *Nat. Rev. Immunol.*, 2020, Vol. 20, no. 10, pp. 603-614.
14. Gehad A., Teague J.E., Matos T.R., Huang V., Yang C., Watanabe R., O'Malley J.T., Trimble C.L., Kupper T.S., Clark R.A. A primary role for human central memory cells in tissue immunosurveillance. *Blood Adv.*, 2018, Vol. 2, no. 3, pp. 292-298.
15. Haase P., Voehringer D. Regulation of the humoral type 2 immune response against allergens and helminths. *Eur. J. Immunol.*, 2021, Vol. 51, no. 2, pp. 273-279.
16. He R., Oyoshi M.K., Wang J.Y., Hodge M.R., Jin H., Geha R.S. The prostaglandin D-receptor CRTH2 is important for allergic skin inflammation after epicutaneous antigen challenge. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2010, Vol. 126, no. 4, pp. 784-790.
17. Hilvering B., Hinks T.S.C., Stöger L., Marchi E., Salimi M., Shrimanker R., Liu W., Chen W., Luo J., Go S., Powell T., Cane J., Thulborn S., Kurioka A., Leng T., Matthews J., Connolly C., Borg C., Bafadhel M., Willberg C.B., Ramasamy A., Djukanović R., Ogg G., Pavord I.D., Klenerman P., Xue L. Synergistic activation of pro-inflammatory type-2 CD8⁺ T lymphocytes by lipid mediators in severe eosinophilic asthma. *Mucosal Immunol.*, 2018, Vol. 11, no. 5, pp. 1408-1419.
18. Hinks T.S.C., Hoyle R.D., Gelfand E.W. CD8⁺ Tc2 cells: underappreciated contributors to severe asthma. *Eur. Respir. Rev.*, 2019, Vol. 28, no. 154, 190092. doi: 10.1183/16000617.0092-2019.
19. Iriki H., Adachi T., Mori M., Tanese K., Funakoshi T., Karigane D., Shimizu T., Okamoto S., Nagao K. Toxic epidermal necrolysis in the absence of circulating T cells: a possible role for resident memory T cells. *J. Am. Acad. Dermatol.*, 2014, Vol. 71, no. 5, pp. e214-e216.
20. Kawai H., Yagyu F., Terada A., Matsunaga T., Inobe M. CD28 confers CD4⁺ T cells with resistance to cyclosporin A and tacrolimus but to different degrees. *Asian Pac. J. Allergy Immunol.*, 2021. doi: 10.12932/AP-270820-0949.
21. Kumar B.V., Connors T.J., Farber D.L. Human T cell development, localization, and function throughout life. *Immunity*, 2018, Vol. 48, no. 2, pp. 202-213.
22. Leijten E.F., van Kempen T.S., Olde Nordkamp M.A., Pouw J.N., Kleinrensink N.J., Vincken N.L., Mertens J., Balak D.M.W., Verhagen F.H., Hartgring S.A., Lubberts E., Tekstra J., Pandit A., Radstake T.R., Boes M. Tissue-resident memory CD8⁺ T cells from skin differentiate psoriatic arthritis from psoriasis. *Arthritis Rheumatol.*, 2021, Vol. 73, no. 7, pp. 1220-1232.
23. Li J., Wu J., Liu H., Hua L., Liu Q., Fang D., Chen Y., Ji R., Zhang J., Zhong W. A pilot study to evaluate the role of circulation CD4⁺ CCR6⁺ CRTh2⁺ cell in predicting risk of asthma in wheezing children. *BMC Pediatr.*, 2021, Vol. 21, no. 1, 263. doi: 10.1186/s12887-021-02746-5.
24. Lloyd C.M., Snelgrove R.J. Type 2 immunity: Expanding our view. *Sci. Immunol.*, 2018, Vol. 3, no. 25, eaat1604. doi: 10.1126/sciimmunol.aat1604.
25. Loyal L., Warth S., Jürchott K., Mölder F., Nikolaou C., Babel N., Nienen M., Durlanik S., Stark R., Kruse B., Frentsch M., Sabat R., Wolk K., Thiel A. SLAMF7 and IL-6R define distinct cytotoxic versus helper memory CD8⁺ T cells. *Nat. Commun.*, 2020, Vol. 11, no. 1, 6357. doi: 10.1038/s41467-020-19002-6.
26. Mathew D., Giles J.R., Baxter A.E., Oldridge D.A., Greenplate A.R., Wu J.E., Alanio C., Kuri-Cervantes L., Pampena M.B., D'Andrea K., Manne S., Chen Z., Huang Y.J., Reilly J.P., Weisman A.R., Ittner C.A.G., Kuthuru O.,

- Dougherty J., Nzingha K., Han N., Kim J., Pattekar A., Goodwin E.C., Anderson E.M., Weirick M.E., Gouma S., Arevalo C.P., Bolton M.J., Chen F., Lacey S.F., Ramage H., Cherry S., Hensley S.E., Apostolidis S.A., Huang A.C., Vella L.A., UPenn COVID Processing Unit, Betts M.R., Meyer N.J., Wherry E.J. Deep immune profiling of COVID-19 patients reveals distinct immunotypes with therapeutic implications. *Science*, 2020, Vol. 369, no. 6508, eabc8511. doi: 10.1126/science.abc8511.
27. Mitson-Salazar A., Prussin C. Pathogenic Effector Th2 Cells in Allergic Eosinophilic Inflammatory Disease. *Front. Med. (Lausanne)*, 2017, Vol. 4, 165. doi: 10.3389/fmed.2017.00165.
28. Nagata K., Tanaka K., Ogawa K., Kemmotsu K., Imai T., Yoshie O., Abe H., Tada K., Nakamura M., Sugamura K., Takano S. Selective expression of a novel surface molecule by human Th2 cells *in vivo*. *J. Immunol.*, 1999, Vol. 162, no. 3, pp. 1278-1286.
29. Pettipher R. The roles of the prostaglandin D(2) receptors DP(1) and CRTH2 in promoting allergic responses. *Br. J. Pharmacol.*, 2008, Vol. 153, Suppl. 1, pp. S191-S199.
30. Rudulier C.D., Tonti E., James E., Kwok W.W., Larché M. Modulation of CRTh2 expression on allergen-specific T cells following peptide immunotherapy. *Allergy*, 2019, Vol. 74, no. 11, pp. 2157-2166.
31. Sarashina H., Tsubosaka Y., Omori K., Aritake K., Nakagawa T., Hori M., Hirai H., Nakamura M., Narumiya S., Urade Y., Ozaki H., Murata T. Opposing immunomodulatory roles of prostaglandin D2 during the progression of skin inflammation. *J. Immunol.*, 2014, Vol. 192, no. 1, pp. 459-465.
32. Tanaka K., Hirai H., Takano S., Nakamura M., Nagata K. Effects of prostaglandin D2 on helper T cell functions. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2004, Vol. 316, no. 4, pp. 1009-1014.
33. Timala S., Pluangnooch P., Wongkajornsilp A., Soontrapa K. An additional CD28 costimulatory signal enhances proliferation and cytotoxicity of murine T cell-derived CIK cell. *Asian Pac. J. Allergy Immunol.*, 2017, Vol. 35, no. 2, pp. 67-74.
34. Trifari S., Kaplan C.D., Tran E.H., Crellin N.K., Spits H. Identification of a human helper T cell population that has abundant production of interleukin 22 and is distinct from T(H)-17, T(H)1 and T(H)2 cells. *Nat. Immunol.*, 2009, Vol. 10, no. 8, pp. 864-871.
35. Trubiano J.A., Gordon C.L., Castellucci C., Christo S.N., Park S.L., Mouhtouris E., Konvinse K., Rose M., Goh M., Boyd A.S., Phillips E.J., Mackay L.K. Analysis of skin-resident memory T cells following drug hypersensitivity reactions. *J. Invest. Dermatol.*, 2020, Vol. 140, no. 7, pp. 1442-1445.e4.
36. Tsuda H., Michimata T., Sakai M., Nagata K., Nakamura M., Saito S. A novel surface molecule of Th2- and Tc2-type cells, CRTH2 expression on human peripheral and decidual CD4⁺ and CD8⁺ T cells during the early stage of pregnancy. *Clin. Exp. Immunol.*, 2001, Vol. 123, no. 1, pp. 105-111.
37. Tsutsumi R., Yoshida Y., Adachi K., Nanba E., Yamamoto O. Acute localized exanthematous pustulosis caused by a herbal medicine, dai-kenchu-to. *Contact Dermatitis*, 2018, Vol. 79, no. 4, pp. 257-259.
38. Wambre E., Bajzik V., DeLong J.H., O'Brien K., Nguyen Q.A., Speake C., Gersuk V.H., DeBerg H.A., Whalen E., Ni C., Farrington M., Jeong D., Robinson D., Linsley P.S., Vickery B.P., Kwok W.W. A phenotypically and functionally distinct human T_H2 cell subpopulation is associated with allergic disorders. *Sci. Transl. Med.*, 2017, Vol. 9, no. 401, eaam9171. doi: 10.1126/scitranslmed.aam9171.
39. Watanabe S., Yamada Y., Murakami H. Expression of Th1/Th2 cell-related chemokine receptors on CD4⁺ lymphocytes under physiological conditions. *Int. J. Lab. Hematol.*, 2020, Vol. 42, no. 1, pp. 68-76.
40. Xia S., Chen Q., Niu B. CD28: A new drug target for immune disease. *Curr. Drug Targets*, 2020, Vol. 21, no. 6, pp. 589-598.

Автор:

Бычкова Н.В. — к.б.н., ведущий научный сотрудник научно-исследовательского отдела лабораторной диагностики ФГБУ «Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины имени А.М. Никифорова» МЧС России; доцент кафедры иммунологии ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Author:

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

Поступила 14.07.2022
Принята к печати 29.07.2022

Received 14.07.2022
Accepted 29.07.2022

ОЦЕНКА УРОВНЯ СРЫВА ТОЛЕРАНТНОСТИ К АЛЛЕРГЕНАМ ПРИ ЛОКАЛЬНОМ И КЛАССИЧЕСКОМ АЛЛЕРГИЧЕСКОМ РИНИТЕ

Климов А.В., Салахутдинова З.В., Найдина О.А., Климов В.В.,
Свиридова В.С., Пронина Н.А., Слёзкин М.И.

ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ,
г. Томск, Россия

Резюме. Локальный аллергический ринит — новый эндотип аллергического ринита, который был идентифицирован исследователями испанской аллергологической школы, в настоящее время оказался в поле интереса аллергологов на международном уровне. Особенностью локального аллергического ринита, который хотя и соответствует по клинической симптоматике классическому, но отличается отсутствием признаков системной атопии: нет повышения антитела IgE в крови и положительных кожных аллергопроб. С целью оценки уровня срыва толерантности к аллергенам при локальном и классическом аллергическом рините проведены исследования концентраций IL-4, IL-22 и IFN γ в трех биологических жидкостях: крови, носовом секрете и кожном экссудате. Группа обследованных состояла из 82 пациентов в возрасте от 18 до 60 лет с диагностированным аллергическим ринитом. Диагностика была основана на консультации аллерголога-иммунолога с учетом сбора аллергологического анамнеза и проведении видеориноскопии оториноларингологом. Процедура видеориноскопии позволяла выявлять аллергическую природу ринита и исключать больных с неаллергическими формами болезни, но не давала возможности дифференцировать классический и локальный аллергический ринит между собой. В последующем все больные были разделены на основе критериев системной атопии на две подгруппы: 1) с высоким содержанием IgE в крови и положительными кожными аллергопробами ($n = 41$) и 2) достоверно низкой концентрацией IgE и отрицательными аллергопробами ($n = 41$). Сделано заключение, что в 1-й подгруппе преобладали пациенты с классическим аллергическим ринитом, а во 2-й — локальным. Исследование концентраций IL-4, IL-22 и IFN γ в трех биологических жидкостях позволило определить, что в 1-й подгруппе наблюдались повышение относительно контроля содержания IL-4 и IL-22 и снижение IFN γ в крови и кожном экссудате, а во 2-й подгруппе все показатели не отличались от контрольных значений. В назальном секрете колебания концентраций цитокинов в подгруппах были непрезентативными. Результат был интерпретирован как отсутствие срыва толерантности к причинным аллергенам на системном уровне у больных с локальным аллергическим ринитом. Полученные данные могут быть использованы в разработке системы биомаркеров в диагностике этого особенного эндотипа болезни, что позволит избежать диагностических ошибок прошлого, когда он относился к неаллергическим формам ринита, и, пациентам не назначалось адекватное лечение, например аллерген-специфическая иммунотерапия.

Ключевые слова: аллергический ринит, эндотипы, локальный аллергический ринит, срыв толерантности, цитокины, кожный экссудат

Адрес для переписки:

Климов Владимир Васильевич
ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ
634041, Россия, г. Томск, ул. Вершинина, 28, кв. 5.
Тел.: 8 (906) 950-63-35.
E-mail: klimov@mail.tomsknet.ru

Address for correspondence:

Klimov Vladimir V.
Siberian State Medical University
634041, Russian Federation, Tomsk,
Vershinin str., 28, apt. 5.
Phone: 7 (906) 950-63-35.
E-mail: klimov@mail.tomsknet.ru

Образец цитирования:

А.В. Климов, З.В. Салахутдинова, О.А. Найдина,
В.В. Климов, В.С. Свиридова, Н.А. Пронина,
М.И. Слёзкин «Оценка уровня срыва толерантности
к аллергенам при локальном и классическом
аллергическом рините» // Медицинская иммунология,
2022. Т. 24, № 5. С. 967-978.
doi: 10.15789/1563-0625-AOA-2542
© Климов А.В. и соавт., 2022

For citation:

A.V. Klimov, Z.V. Salakhutdinova, O.A. Naidina,
V.V. Klimov, V.S. Sviridova, N.A. Pronina, M.I. Slezkin
“Assessment of allergen tolerance breakdown levels in
local and classical allergic rhinitis”, *Medical Immunology
(Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2022, Vol. 24, no. 5,
pp. 967-978. doi: 10.15789/1563-0625-AOA-2542
DOI: 10.15789/1563-0625-AOA-2542

ASSESSMENT OF ALLERGEN TOLERANCE BREAKDOWN LEVELS IN LOCAL AND CLASSICAL ALLERGIC RHINITIS

Klimov A.V., Salakhutdinova Z.V., Naidina O.A., Klimov V.V., Sviridova V.S., Pronina N.A., Slezkin M.I.

Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation

Abstract. Local allergic rhinitis, a new endotype of allergic rhinitis discerned by researchers of the Spanish Allergy School, is now in the focus of interest of international allergological community. A special feature of local allergic rhinitis, which, being similar to conventional signs of allergic rhinitis, is, however, characterized by absence of systemic atopy manifestations, e.g., an increased total serum IgE content and positive allergic skin tests. In order to assess the level of tolerance breakdown to allergens in local and classical allergic rhinitis, we have studied concentrations of IL-4, IL-22, and IFN γ in three biological fluids, blood, nasal secretions, and skin exudate. The whole study cohort consisted of 82 patients aged 18 to 60 years with established allergic rhinitis. The diagnosis was based on counseling by allergologist/immunologist, including clinical case history and possible inheritance of atopy as well as videorhinoscopy performed by an ENT specialist. The procedure of videorhinoscopy allowed to specify allergic origin of rhinitis and exclude the patients with non-allergic forms of the disease, but it did not enable us to differentiate between the endotypes of classic and local allergic rhinitis. Subsequently, all patients have been divided into two subgroups based on the criteria of systemic atopy: (1) with a high content of serum total IgE and positive skin allergy tests ($n = 41$) and (2) with a significantly lower concentration of IgE and negative allergy tests ($n = 41$). It was concluded that the patients with classic allergic rhinitis prevailed in the 1st subgroup, whereas local rhinitis predominated in the 2nd group. The study of IL-4, IL-22 and IFN γ concentrations in the three biological fluids allowed us to presume that the 1st subgroup was characterized by increased content of IL-4 and IL-22 in blood and skin exudate in comparison with controls, and the 2nd subgroup showed a decrease in IFN γ to control values. The cytokine concentrations in nasal secretions were not representative for the subgroups studied. The result has been interpreted as the absence of tolerance breakdown to causal allergens in the patients with local allergic rhinitis at the systemic level. The obtained data could be used in development of a diagnostic biomarker system for this specific endotype of allergic rhinitis, thus avoiding potential diagnostic errors which occurred in the past, when this endotype was classified as non-allergic form of the disease, thus administering non-adequate treatment, e.g., allergen-specific immunotherapy, which could be prescribed in these cases.

Keywords: *allergic rhinitis, endotypes, local allergic rhinitis, tolerance breakdown, cytokines, skin exudate*

Список сокращений

ЛАР — локальный аллергический ринит; КАР — классический аллергический ринит; Th — хелперные Т-клетки.

LAR — local allergic rhinitis; CAR — classical allergic rhinitis; Th — helper T cells.

Введение

В наше время наблюдается рост атопических аллергических болезней, особенно аллергического ринита, и под воздействием новых, ранее не известных человечеству факторов, наблюдается эволюция этих заболеваний, что проявляется повышением их гетерогенности [1, 3, 32]. В последние годы были идентифицированы принципиально новые формы атопических состояний с локализацией в респираторном тракте, что получило наименование «спектр локальных аллергий дыхательной системы» [27]. Данная группа вклю-

чает локальный аллергический ринит (ЛАР), отличающийся от классического аллергического ринита (КАР) и описанный раньше всех других локальных форм [21], «двойной» аллергический ринит [13], локальную аллергическую астму [7] и локальный аллергический конъюнктивит [34]. Это стало важным событием в аллергологии, оториноларингологии, пульмонологии, офтальмологии и других медицинских специальностях, поскольку случаи патологий, ранее относимые к неаллергическим, стали рассматриваться с адекватных патогенетических позиций и, соответственно, включать принципиально отличающиеся подходы в лечении, например аллерген-специфическую иммунотерапию [22]. В диагностическом аспекте для идентифицированных локальных форм было характерно отсутствие системных диагностических критериев принадлежности болезни к атопической, т. е. низ-

кое содержание в крови общего и специфических IgE, а также отрицательные результаты кожных проб [22, 27]. Иными словами, срыв толерантности к аллергенам, по-видимому, происходил при обострениях локальных и системных атопий на разных уровнях, локальном и системном [16].

Гетерогенность атопических болезней, в том числе аллергического ринита, может быть охарактеризована с помощью описания фенотипов, эндотипов и биомаркеров патологий. Уместно подчеркнуть, что фенотип — это сочетание морфологических, физиологических или биохимических признаков заболевания, без указания на клеточные и молекулярные механизмы. Эндотип представляет собой другой физиологический или патологический подход, который включает и раскрывает клеточные и молекулярные механизмы развития заболевания и ответ пациента на терапию. И фенотип, и эндотип зависят от генотипа и эпигенетических модификаций, а также от факторов окружающей среды [5]. Примерами фенотипов аллергического ринита являются круглогодичный и сезонный аллергический ринит, а примерами эндотипов — КАР и ЛАР. Биомаркер — это специфический биологический показатель, обеспечивающий объективную меру состояния здоровья или болезни. Специфический и чувствительный биомаркер позволяет определить конкретный фенотип и эндотип аллергического ринита, что полезно для мониторинга и прогноза заболевания.

Целью исследования была оценка уровня срыва толерантности к аллергенам при двух эндотипах аллергического ринита на основе исследования содержания ключевых цитокинов хелперных субпопуляций Т-клеток в разных биологических средах.

Материалы и методы

Обследовано 82 пациента с аллергическим ринитом обоего пола в возрасте от 18 до 60 лет, которым были проведены согласно национальным и международным согласительным документам [6, 32] рутинные диагностические процедуры для идентификации аллергического ринита: сбор аллергологического анамнеза, включая уточнение по наследственной отягощенности атопиями, клинический осмотр, кожные аллергопробы, определение содержания общего IgE в крови и видеориноскопия. Видеориноскопия была важнейшим критерием базисной диагностики аллергического ринита, поскольку позволяла в сочетании с консультацией и осмотром аллерголога-иммунолога объективно выявлять аллергическую природу болезни. Процедура проводилась опытным оториноларингологом с использованием эндоскопа с углом визуализации

0° фирмы Karl Storz (Германия), при этом критериями аллергического воспаления были два объективных признака в видеориноскопической картине: отечность и синюшность слизистой в области нижней носовой раковины [32, 35].

Концентрация IgE в крови определялась с помощью иммуноферментного анализа с использованием наборов компании АО «Вектор-Бест» (г. Новосибирск) и выражалась в ЕД/мл. Для скарификационных кожных проб применялись бытовые и пылевые аллергены компаний ОАО «Биомед им. И.И. Мечникова» (Москва) и ФГУП «НПО «Микроген» (Москва).

Данный комплексный подход позволил, с одной стороны, у всех пациентов ($n = 82$) выявить наличие аллергического ринита, а с другой стороны, на основе таких критериев, как содержание IgE и результаты кожных аллергопроб, разделить всех пациентов на две подгруппы: 1-я подгруппа ($n = 41$) с достоверно более высоким содержанием IgE и положительными аллергопробами, и 2-я — с более низким содержанием IgE и отрицательными аллергопробами ($n = 41$). Контрольную группу составили 20 практически здоровых добровольцев в возрасте от 18 до 25 лет с отсутствием аллергических заболеваний и наследственной отягощенности по атопиям.

Нами поставлена задача исследовать концентрации ключевых цитокинов Th2 (IL-4), Th22 (IL-22) и Th1 (IFN γ) в трех биологических жидкостях (крови, назальном секрете и кожном экссудате) в качестве потенциальных биомаркеров, которые могли бы способствовать уточнению вопроса об уровне срыва толерантности к аллергенам при КАР и ЛАР после первичной сенсибилизации. Взятие крови проводилось из вены утром натощак. Забор носового секрета осуществлялся традиционным способом [10].

Получение кожного экссудата проводилось в соответствии с утвержденной медицинской технологией [2]. На передней поверхности предплечья левой руки выбирали участок диаметром 0,5 см, обрабатывали его 70%-ным этанолом; с помощью скальпеля скребущими движениями удаляли поверхностный слой эпидермиса до момента, когда появлялся своеобразный колорит кровяной росы. На данный участок кожи предплечья устанавливали камеру с 0,9%-ным раствором натрия хлорида и фиксировали гипоаллергенным пластырем. Камеру экспонировали в течение 6 часов и по истечении этого времени снимали, а ее содержимое собиралось пипеткой в пробирку. Концентрации IL-4 и IFN γ определялись с помощью иммуноферментного анализа с использованием наборов компании АО «Вектор-Бест» (г. Новосибирск), а IL-22 — компании R&D Systems (США), и выражались для крови в пг/мл,

а для носового секрета и кожного экссудата — в пг/г белка, поскольку осуществлялась стандартизация этих параметров с помощью микробиуретового метода с пересчетом на содержание общего белка в носовом секрете и кожном экссудате.

Все исследования проводились в периоде ремиссии аллергического ринита с учетом концепции «минимального воспаления» [8, 29], согласно которой после клинического дебюта атопической болезни, даже с наступлением ремиссии в соответствующем органе-мишени, сохраняется персистирующее аллергическое воспаление, т. е. происходят IgE-зависимые иммунные ответы при срыве толерантности к аллергенам, но в значительно меньшей степени выраженности, чем при обострении.

Для статистической обработки полученных данных использовался пакет программ IBM SPSS Statistics 26.0 с табличным редактором MS Excel 2013. Переменные в группах не подчинялись нормальному закону распределения, поэтому при статистическом анализе применялись непараметрические критерии. Сравнение независимых выборок на статистическую значимость различий проводилось с помощью критерия Манна–Уитни. Критический уровень достоверности при исследовании принимался равным 0,05.

Результаты

Сбор аллергологического анамнеза позволил выявить отягощенную по атопиям наследственность у пациентов с аллергическим ринитом в

73,7% случаев, что было статистически достоверным ($p < 0,05$). Видеориноскопическая картина, отражающая наличие характерных признаков аллергического воспаления слизистой, как и ожидалось, позволила исключить неаллергические формы ринита [15], но не дала возможности дифференцировать больных в обеих подгруппах между собой и была идентичной у всех пациентов с аллергическим ринитом.

Полученные данные по формированию подгрупп на основе определения концентрации IgE в крови и оценки кожных аллергопроб отражены в таблице 1.

Как видно из таблицы 1, у подавляющего большинства пациентов с аллергическим ринитом в 1-й подгруппе, у которых наблюдалось достоверно более высокое содержание общего IgE в крови по отношению к этому показателю во 2-й подгруппе ($p < 0,05$), отмечались и положительные результаты аллергопроб (95,1%). Можно сделать заключение, что в 1-й подгруппе преобладали пациенты с КАР, а во 2-й — с ЛАР.

Положительные кожные аллергопробы наблюдались только у больных 1-й подгруппы в 95,1% случаев. Спектр сенсibilизации был типичным для аллергического ринита: к аллергенам *Dermatophagoides pteronissinus* — в 29 случаях, шерсти кошек — в 4 случаях, к микст-аллергенам деревьев — в 10 случаях, луговых трав — в 8 случаях, сорных трав — в 7 случаях [11, 18, 26].

Результаты определения содержания IL-4 в крови, назальном секрете и экссудате «кожного

ТАБЛИЦА 1. РАЗДЕЛЕНИЕ ОБЪЕДИНЕННОЙ ГРУППЫ ПАЦИЕНТОВ С АЛЛЕРГИЧЕСКИМ РИНИТОМ НА ПОДГРУППЫ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ СОДЕРЖАНИЯ IgE

TABLE 1. DIVISION OF THE COMBINED ALLERGIC RHINITIS GROUP INTO SUBGROUPS DEPENDING ON IgE CONTENT

Показатель Parameter	Контроль (здоровые) Control (healthy persons) n = 20	Объединенная группа Combined group n = 82	1-я подгруппа 1 st subgroup n = 41	2-я подгруппа 2 nd subgroup n = 41	p
1	2	3	4	5	6
IgE в сыворотке крови (ЕД/мл) Blood serum IgE (IU/mL)	45 (32-99)	106 (46,25-212,00)	209 (132-408)	41 (21,0-61,5)	$p_{2,5} > 0,05$ $p_{3,5} < 0,05$ $p_{4,5} < 0,05$ $p_{2,3} < 0,05$ $p_{2,4} < 0,05$ $p_{3,4} < 0,05$
% положительных аллергопроб Positive allergic skin test percent	0%	47,6% (n = 39)	95,1% (n = 39)	0%	$p_{3,4} < 0,05$

ТАБЛИЦА 2. СОДЕРЖАНИЕ IL-4 В БИОЛОГИЧЕСКИХ ЖИДКОСТЯХ ПРИ ЭНДОТИПАХ АЛЛЕРГИЧЕСКОГО РИНИТА, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

TABLE 2. IL-4 CONTENT IN BIOLOGICAL FLUIDS IN ALLERGIC RHINITIS ENDOTYPES, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

Содержание IL-4 IL-4 content	Контроль (здоровые) Control (healthy persons) n = 20	1-я подгруппа 1 st subgroup n = 41	2-я подгруппа 2 nd subgroup n = 41	p
	1	2	3	
В сыворотке крови (пг/мл) Blood serum (pg/mL)	18 (9-21)	103 (99-120)	16 (12,0-27,8)	p _{1,2} < 0,05 p _{1,3} > 0,05 p _{2,3} < 0,05
В назальном секрете (пг/г) Nasal secretion (pg/g)	0,14 (0,00-0,04)	0,92 (0,2-1,1)	0,53 (0,13-0,90)	p _{1,2} < 0,05 p _{1,3} < 0,05 p _{2,3} > 0,05
В кожном экссудате (пг/г) Skin exudate (pg/g)	0,17 (0,14-0,25)	0,32 (0,23-0,42)	0,19 (0,14-0,23)	p _{1,2} < 0,05 p _{1,3} > 0,05 p _{2,3} < 0,05

ТАБЛИЦА 3. СОДЕРЖАНИЕ IL-22 В БИОЛОГИЧЕСКИХ ЖИДКОСТЯХ ПРИ ЭНДОТИПАХ АЛЛЕРГИЧЕСКОГО РИНИТА, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

TABLE 3. IL-22 CONTENT IN BIOLOGICAL FLUIDS IN ALLERGIC RHINITIS ENDOTYPES, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

Содержание IL-22 IL-22 content	Контроль (здоровые) Control (healthy persons) n = 20	1-я подгруппа 1 st subgroup n = 41	2-я подгруппа 2 nd subgroup n = 41	p
	1	2	3	
В сыворотке крови (пг/мл) Blood serum (pg/mL)	6,61 (3,34-8,31)	18,55 (8,53-48,93)	6,22 (2,91-9,11)	p _{1,2} < 0,05 p _{1,3} > 0,05 p _{2,3} < 0,05
В назальном секрете (пг/г) Nasal secretion (pg/g)	1,57 (1,09-2,05)	1,57 (1,25-1,70)	1,49 (0,98-1,94)	p _{1,2} > 0,05 p _{1,3} > 0,05 p _{2,3} > 0,05
В кожном экссудате (пг/г) Skin exudate (pg/g)	1,64 (1,19-1,83)	1,85 (1,58-2,10)	0,69 (0,32-1,23)	p _{1,2} < 0,05 p _{1,3} > 0,05 p _{2,3} < 0,05

окна» отражены в рисунках 1-3 и обобщающей таблице 2.

На представленных рисунке 1 и в таблице 2 видно, что концентрация IL-4 в крови в 1-й подгруппе статистически значимо отличается от уровня IL-4 по сравнению с пациентами 2-й подгруппы и здоровыми людьми. Как следует из рисунка 2 и таблицы 2, содержание IL-4 в назальном секрете достоверно отличается от контроля по отношению к концентрациям в обеих подгруппах, но не между ними, с тенденцией более высокого значения IL-4 в 1-й подгруппе. Что касается концентрации IL-4 в кожном экссудате, то на представленном рисунке 3 и в таблице 2 вид-

но, что концентрация IL-4 значимо отличается от уровня контроля только в 1-й подгруппе, но не у больных во 2-й подгруппе.

Результаты определения содержания IL-22 в крови, назальном секрете и кожном экссудате показаны на рисунках 4-6 и обобщающей таблице 3.

На представленных рисунке 4 и в таблице 3 видно, что концентрация IL-22 в крови в 1-й подгруппе статистически значимо отличается по сравнению с уровнями IL-22 во 2-й подгруппе и у здоровых людей. Как следует из рисунка 5 и таблицы 3, содержание IL-22 в назальном секрете достоверно не отличается от контроля по от-

ТАБЛИЦА 4. КОНЦЕНТРАЦИЯ $IFN\gamma$ В БИОЛОГИЧЕСКИХ ЖИДКОСТЯХ ПРИ ЭНДОТИПАХ АЛЛЕРГИЧЕСКОГО РИНИТА, Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)

TABLE 4. $IFN\gamma$ CONTENT IN BIOLOGICAL FLUIDS IN ALLERGIC RHINITIS ENDOTYPES, Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)

Содержание $IFN\gamma$ $IFN\gamma$ content	Контроль (здоровые) Control (healthy persons) n = 20	1-я подгруппа 1 st subgroup n = 41	2-я подгруппа 2 nd subgroup n = 41	p
	1	2	3	
В сыворотке крови (пг/мл) Blood serum (pg/mL)	120 (91-181)	30 (13-38)	110,5 (91,75-149,25)	$p_{1,2} < 0,05$ $p_{1,3} > 0,05$ $p_{2,3} < 0,05$
В назальном секрете (пг/г) Nasal secretion (pg/g)	3,38 (3,20-3,89)	1,9 (0,9-2,9)	1,85 (0,70-2,98)	$p_{1,2} < 0,05$ $p_{1,3} < 0,05$ $p_{2,3} > 0,05$
В кожном экссудате (пг/г) Skin exudate (pg/g)	2,63 (2,38-3,10)	0,7 (0,49-0,77)	2,66 (2,46-2,73)	$p_{1,2} < 0,05$ $p_{1,3} > 0,05$ $p_{2,3} < 0,05$

ношению к концентрациям в обеих подгруппах и между ними. Что касается содержания IL-22 в экссудате «кожного окна», то на представленном рисунке 6 и в таблице 3 видно, что концентрация IL-22 статистически значимо отличается от уровня контроля только в 1-й подгруппе, а также между подгруппами.

Результаты определения содержания $IFN\gamma$ в крови, назальном секрете и экссудате «кожного

окна» показаны на рисунках 7-9 и обобщающей таблице 4.

Как видно из представленных рисунка 7 и таблицы 4, концентрация $IFN\gamma$ в крови у больных в 1-й подгруппе достоверно отличается от контроля за счет существенного снижения, почти в 4 раза. Что касается содержания данного ключевого цитокина Th1 в крови у пациентов во 2-й подгруппе, то, наоборот, эта величина близка к кон-

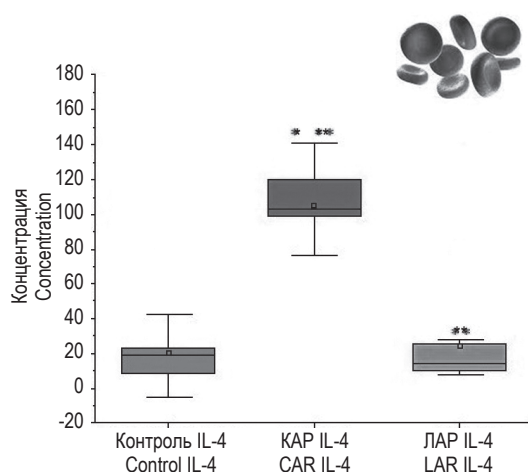


Рисунок 1. Концентрация IL-4 в сыворотке крови при эндотипах аллергического ринита

Примечание. * – достоверность по отношению к контролю, ** – достоверность между подгруппами.

Figure 1. Blood serum IL-4 concentration in allergic rhinitis endotypes

Note. *, statistical reliability in relation to control; **, statistical reliability between subgroups.

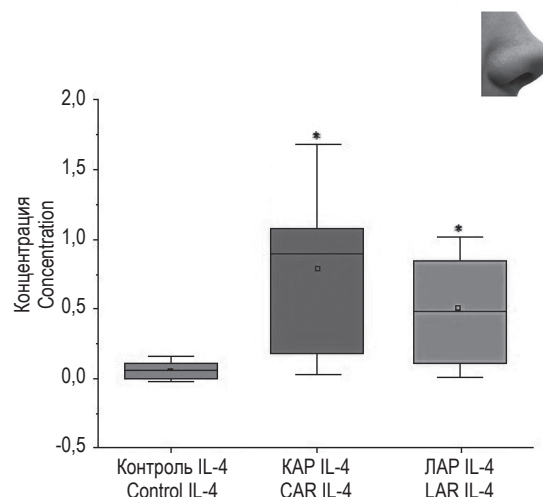


Рисунок 2. Концентрация IL-4 в назальном секрете при эндотипах аллергического ринита

Примечание. * – достоверность по отношению к контролю.

Figure 2. Nasal secretion IL-4 concentration in allergic rhinitis endotypes

Note. *, statistical reliability in relation to control.

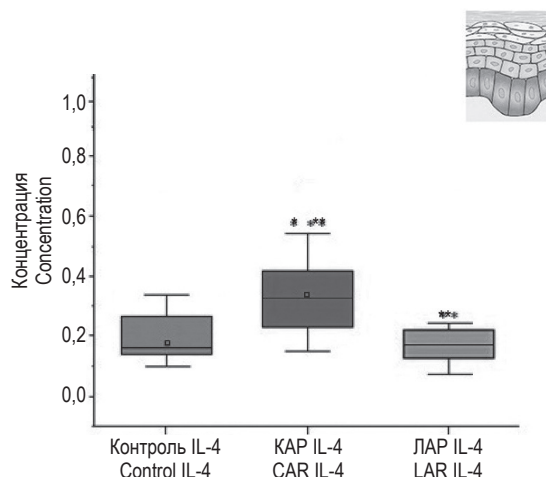


Рисунок 3. Концентрация IL-4 в кожном экссудате при эндотипах аллергического ринита

Примечание. * – достоверность по отношению к контролю, ** – достоверность между подгруппами.

Figure 3. Skin exudate IL-4 concentration in allergic rhinitis endotypes

Note. *, statistical reliability in relation to control; **, statistical reliability between subgroups.

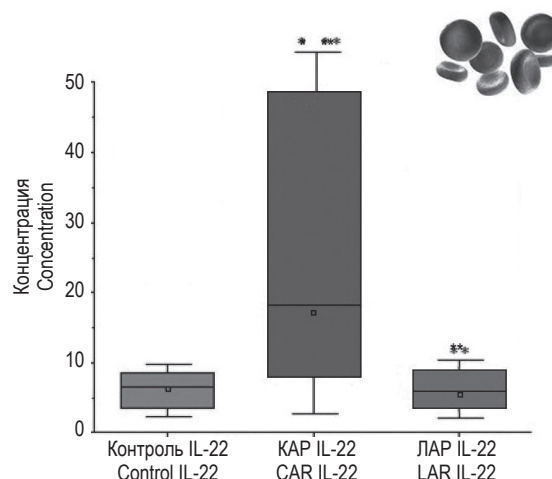


Рисунок 4. Концентрация IL-22 в сыворотке крови при эндотипах аллергического ринита

Примечание. * – достоверность по отношению к контролю, ** – достоверность между подгруппами.

Figure 4. Blood serum IL-22 concentration in allergic rhinitis endotypes

Note. *, statistical reliability in relation to control; **, statistical reliability between subgroups.

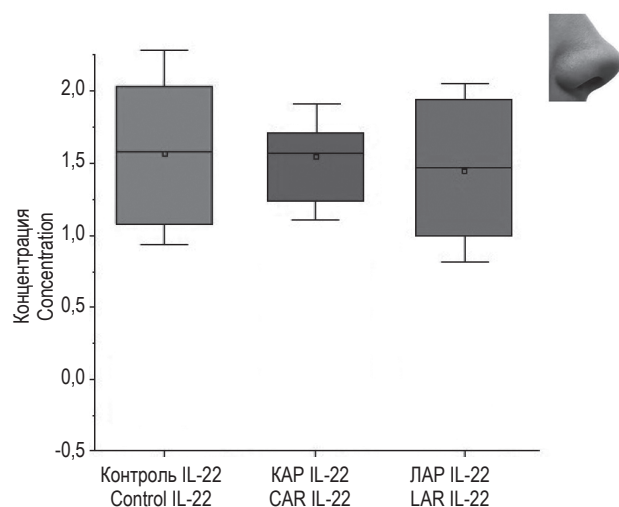


Рисунок 5. Концентрация IL-22 в назальном секрете при эндотипах аллергического ринита

Figure 5. Nasal secretion IL-22 concentration in allergic rhinitis endotypes

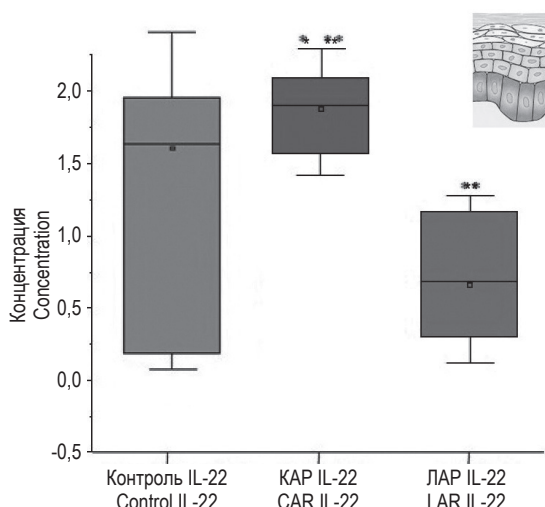


Рисунок 6. Концентрация IL-22 в кожном экссудате при эндотипах аллергического ринита

Примечание. * – достоверность по отношению к контролю, ** – достоверность между подгруппами.

Figure 6. Skin exudate IL-22 concentration in allergic rhinitis endotypes

Note. *, statistical reliability in relation to control; **, statistical reliability between subgroups.

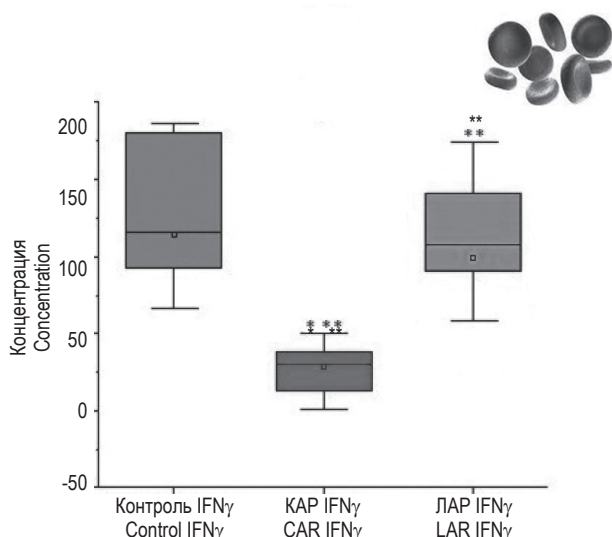


Рисунок 7. Концентрация IFN γ в сыворотке крови при эндотипах аллергического ринита

Примечание. * – достоверность по отношению к контролю, ** – достоверность между подгруппами.

Figure 7. Blood serum IFN γ concentration in allergic rhinitis endotypes

Note. *, statistical reliability in relation to control; **, statistical reliability between subgroups.

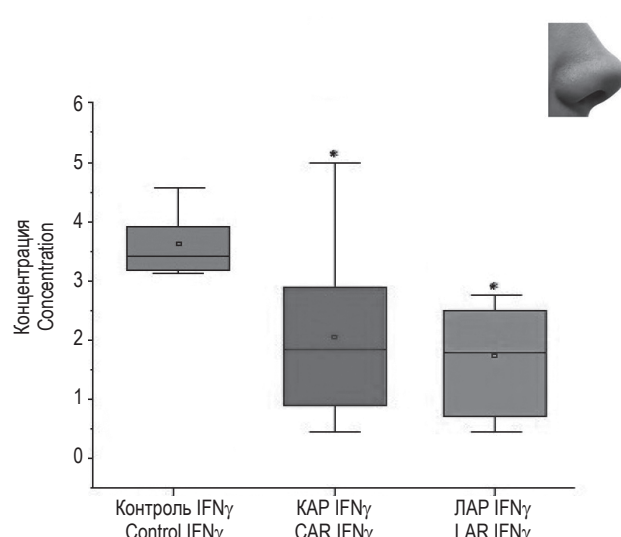


Рисунок 8. Концентрация IFN γ в назальном секрете при эндотипах аллергического ринита

Примечание. * – достоверность по отношению к контролю.

Figure 8. Nasal secretion IFN γ concentration in allergic rhinitis endotypes

Note. *, statistical reliability in relation to control.

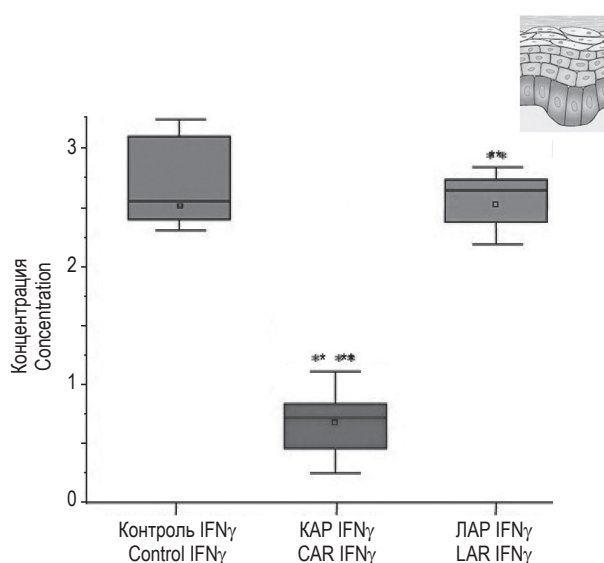


Рисунок 9. Концентрация IFN γ в кожном экссудате при эндотипах аллергического ринита

Примечание. * – достоверность по отношению к контролю, ** – достоверность между подгруппами.

Figure 9. Skin exudate IFN γ concentration in allergic rhinitis endotypes

Note. *, statistical reliability in relation to control; ** statistical reliability between subgroups.

трольной, но статистически значимо превышает содержание IFN γ в 1-й подгруппе. Как следует из рисунка 8 и таблицы 4, содержание IFN γ в носовом секрете в обеих подгруппах аллергического ринита (пациенты с КАР и ЛАР) достоверно ниже контроля и не отличается между собой. По данным рисунка 9 и таблицы 4 отмечено статистически достоверное снижение концентрации IFN γ в экссудате «кожного окна» в 1-й подгруппе по отношению к контролю и уровню IFN γ во 2-й подгруппе.

Обсуждение

Повышение содержания IL-4 в крови является ожидаемым и согласовывается с многократно повторенными исследованиями atopических аллергических болезней в течение многих лет в разных лабораториях [9, 12, 19, 23]. Это обусловлено тем, что при классических atopиях, к числу которых относится КАР (это пациенты 1-й подгруппы), характерна поляризация Th2, а срыв толерантности к причинным аллергенам происходит на системном уровне [28, 31, 33]. У больных во 2-й подгруппе и здоровых не найдено статистически значимых различий в содержании IL-4 в крови, что может быть объяснено отсутствием системного срыва толерантности при локальных эндотипах респираторной atopии, к числу которых относится ЛАР [14, 20]. Интересно, что концентрация IL-22 в целом повторяет особенности,

характерные для IL-4 в крови, что соответствует литературным источникам, по крайней мере, для КАР [24, 25]. Содержание IL-22 в крови во 2-й подгруппе и в контроле при достоверном повышении в 1-й подгруппе иллюстрирует сохранение толерантности к аллергенам при ЛАР на системном уровне (т. е. без нарастания IL-4 и снижения IFN γ), что отражает патогенетическую суть этого atopического заболевания [14, 20].

Слизистая носа — место проникновения аэро-аллергенов, начала сенсибилизации, локального срыва и последующей отмены системной толерантности к аллергенам и главный сайт аллергического воспаления, которое является иммуннопатогенетической основой всех клинических симптомов аллергического ринита [6, 12, 32]. Отсутствие достоверной разницы в повышенном содержании IL-4 в носовом секрете в двух подгруппах, а также отклонений в концентрации IL-22 по отношению к контролю могут быть объяснены тем, что назальный секрет представляет собой биологическую жидкость с постоянными динамическими изменениями, не имеющую устойчивого состава клеточно-молекулярных компонентов, подверженную непрерывным колебаниям параметров [18]. При исследовании экспрессии гена IL-22 в клетках соскоба из нижней носовой раковины, однако, получено повышение данного показателя при аллергическом рините по отношению к контролю [24]. Что касается IFN γ , то обнаружено понижение концентрации IFN γ в обеих подгруппах. Это согласовывается с данными экспериментальных [4] и клинических исследований [17].

Кожа является барьерным органом-мишенью, который сосредоточивает информацию о поддержании или срыве системной аллерген-

ной толерантности. До настоящего времени не описано локальной атопии, ассоциированной с кожей, а atopический дерматит всегда является следствием срыва толерантности к аллергенам на системном уровне [30]. Вместе с тем содержание цитокинов в экссудате «кожного окна», которое исследовано по нашей сертифицированной технологии [2], отражает состояние иммунной системы как на системном, так и локальном уровнях. Точно так же положительные кожные аллергопробы соответствуют наличию сенсибилизации и на системном, и на локальном уровнях, при этом клинических проявлений аллергического процесса в коже при отсутствии atopического дерматита нет, а данное явление может быть объяснено цитотфильным свойством молекул IgE, а также в рамках концепции минимального воспаления [8, 29]. Повышенное содержание IL-4 и IL-22 и пониженное IFN γ в кожном экссудате только в 1-й подгруппе представляется нам очень показательным в отношении больных 2-й подгруппы (ЛАР), у которых нет системных проявлений атопии [14, 20].

Заключение

Сопоставимые с контролем концентрации IL-4, IL-22 и IFN γ в крови и кожном экссудате соответствуют отсутствию срыва толерантности к причинным аллергенам при ЛАР на системном уровне. Они могут служить дифференциально-диагностическими биомаркерами этого эндотипа аллергического ринита в случаях доказанной atopической природы болезни у пациентов, что с высокой вероятностью достигается с помощью видеориноскопии в сочетании с данными аллергологического анамнеза и консультации аллерголога-иммунолога [32].

Список литературы / References

1. Астафьева Н.Г., Кобзев Д.Ю., Гамова И.В., Перфилова И.А., Удовиченко Е.Н., Скучаева Л.В., Михайлова И.Э. Многоликий ринит: современный взгляд на диагностику и алгоритм лечения // Лечащий врач, 2018. Т. 4, № 7. [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://www.lvrach.ru/2018/04/15436957>. [Astafieva N.G., Kobzev D.Yu., Gamova I.V., Perfilova I.A., Udovichenko E.N., Skuchaeva L.V., Mikhailova I.E. Many-sided rhinitis: Current approach to diagnosis and treatment algorithm. *Lechashchiy vrach = Attending Physician*, 2018, Vol. 4, no. 7. [Electronic resource]. Access mode: <https://www.lvrach.ru/2018/04/15436957>. (In Russ.)]
2. Климов В.В., Денисов А.А., Фирсова Е.К., Саликова Т.И., Загрешенко Д.С. Медицинская технология «Способ оценки минимальной воспалительной активности кожи при atopическом дерматите в стадии ремиссии» ФС № 2010/217 от 10.06.2010. [Klimov V.V., Denisov A.A., Firsova E.K., Salikova E.K., Zagreshenko D.S. Medical technology entitled "Method of the skin minimal inflammatory activity assessment in atopic dermatitis at the remission stage". FS No. 2010/217 on 10.06.2010].
3. Agache I., Akdis C.A. Precision medicine and phenotypes, endotypes, genotypes, regiotypes, and theratypes of allergic diseases. *J. Clin. Invest.*, 2019, Vol. 129, no. 4, pp. 1493-1503.
4. Ai S., Lin Y., Zheng J., Zhiung X. Xingbi Gel ameliorates allergic rhinitis by regulating IFN- γ gene promoter methylation in CD4⁺ T cells via the ERK-DNMT pathway. *Front. Surg.*, 2021, Vol. 7, 619053. doi: 10.3389/fsurg.2020.619053.
5. Bellanti J.A. Phenotypic classification of asthma based on a new Type 2-high and Type 2-low endotypic classification: It all began with Rackemann. *J. Prec. Resp. Med.*, 2020, Vol. 3, no. 1, pp. 9-20.

6. Bousquet J., Schunemann H.J., Togias A., Bachert C., Erhola M., Hellings P.W., Klimek L., Pfaar O., Wallace D., Ansotegui I., Agache I., Bedbrook A., Bergmann K.-C., Bewick M., Bonniaud P., Bosnic-Anticevich S., Bossé I., Bouchard J., Boulet L.-P., Brozek J., Brusselle G., Calderon M.A., Canonica W.G., Caraballo L., Cardona V., Casale T., Cecchi L., Chu D.K., Costa E.M., Cruz A.A., Czarlewski W., D'Amato G., Devillier P., Dykewicz M., Ebisawa M., Fauquert J.-L., Fokkens W.J., Fonseca J.A., Fontaine J.-F., Gemicioglu B., van Wijk R.G., Haahtela T., Halken S., Ierodiakonou D., Iinuma T., Ivancevich J.-C., Jutel M., Kaidashev I., Khaitov M., Kalayci O., Tebbe J.K., Kowalski M.L., Kuna P., Kvedariene V., La Grutta S., Larenas-Linnemann D., Lau S., Laune D., Le L., Lieberman P., Carlsen K.C.L., Lourenço O., Marien G., Carreiro-Martins P., Melén E., Menditto E., Neffen H., Mercier G., Mosques R., Mullol J., Muraro A., Namazova L., Novellino E., O'Hehir R., Okamoto Y., Ohta K., Park H.S., Panzner P., Passalacqua G., Pham-Thi N., Price D., Roberts G., Roche N., Rolland C., Rosario N., Ryan D., Samolinski B., Sanchez-Borges M., Scadding G.K., Shamji M.H., Sheikh A., Bom A.-M.T., Toppila-Salmi S., Tsiligianni I., Valentin-Rostan M., Valiulis A., Valovirta E., Ventura M.-T., Walker S., Wasserman S., Yorgancioglu A., Zuberbier T., Allergic Rhinitis and Its Impact on Asthma Working Group Next-generation Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma (ARIA) guidelines for allergic rhinitis based on Grading of Recommendations Assessment, Development and Evaluation (GRADE) and real-world evidence. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2020, Vol. 145, no. 1, pp. 70-80, e3.
7. Campo P., Eguluz-Gracia I., Plaza-Serón M.C., Salas M., Rodríguez M.J., Perez-Sanchez N., González M., Molina A., Mayorga C., Torres M.J., Rondón C. Bronchial asthma triggered by house dust mites in patients with local allergic rhinitis. *Allergy*, 2019, Vol. 74, no. 8, pp. 1502-1510.
8. Canonica G.W., Compalati E. Minimal persistent inflammation in allergic rhinitis: implications for current treatment strategies. *Clin. Exp. Immunol.*, 2009, Vol. 158, no. 3, pp. 260-271.
9. Chai W., Zhang X., Lin M., Chen Z., Wang X., Wang C., Chen A., Wang C., Wang H., Yue H., Gui J. Allergic rhinitis, allergic contact dermatitis and disease comorbidity belong to separate entities with distinct composition of T-cell subsets, cytokines, immunoglobulins and autoantibodies. *Allergy Asthma Clin. Immunol.* 2022, Vol. 18, 10. doi: 10.1186/s13223-022-00646-6.
10. Chawes B.L.K., Edwards M.J., Shamji B., Walker C., Nicholson G.C., Tan A.J., Følsgaard N.V., Bønnelykke K., Bisgaard H., Hansel T.T. A novel method for assessing unchallenged levels of mediators in nasal epithelial lining fluid. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2010, Vol. 125, no. 6, pp. 1387-1389.e3.
11. de Mello J.F. Local allergic rhinitis. *Braz. J. Otorhinolaryngol.*, 2016, Vol. 82, no. 6, pp. 621-622.
12. Drazdauskaitė G., Layhadi J.A., Shamji M.H. Mechanisms of allergen immunotherapy in allergic rhinitis. *Curr. Allergy Asthma Rep.*, 2021, Vol. 21, no. 1, 2. doi: 10.1007/s11882-020-00977-7.
13. Eguluz-Gracia I., Fernandez-Santamaria R., Testera-Montes A., Ariza A., Campo P., Prieto A., Perez-Sanchez N., Salas M., Mayorga C., Torres M.J., Rondon C. Coexistence of nasal reactivity to allergens with and without IgE sensitization in patients with allergic rhinitis. *Allergy*, 2020, Vol. 75, no. 7, pp. 1689-1698.
14. Eguluz-Gracia I., Pérez-Sánchez N., Bogas G., Campo P., Rondón C. How to diagnose and treat local allergic rhinitis: A challenge for clinicians. *J. Clin. Med.*, 2019, Vol. 8, no. 7, pp. 1062-1074.
15. Hellings P.W., Klimek L., Cingi C., Agache I., Akdis C., Bachet C., Bousquet J., Demoly P., Gevaert P., Hox V., Hupin C., Kalogjera L., Manole F., Mösges R., Mullol J., Muluk N.B., Muraro A., Papadopoulos N., Pawankar R., Rondon C., Rundenko M., Seys S.F., Toskala E., Van Gerven L., Zhang L., Zhang N., Fokkens W.J. Non-allergic rhinitis: Position paper of the European Academy of Allergy and Clinical Immunology. *Allergy*, 2017, Vol. 72, no. 11, pp. 1657-1665.
16. Klimov A., Klimov A., Koshkarova N. Autonomous breakdown of the allergen tolerance in the nose: A hypothesis. *Explor. Res. Hypothesis Med.*, 2022. doi: 10.14218/ERHM.2022.00053.
17. König K., Klemens C., Eder K., San Nicolás M., Becker S., Kramer M.F., Gröger M. Cytokine profiles in nasal fluid of patients with seasonal or persistent allergic rhinitis. *Allergy Asthma Clin. Immunol.*, 2015, Vol. 11, 26. doi: 10.1186/s13223-015-0093-x.
18. Kovalhuk L.C.S., Telles E.Q., Lima M.N., Filho N.A.R. Nasal lavage cytology and mucosal histopathological alterations in patients with rhinitis. *Braz. J. Otorhinolaryngol.*, 2020, Vol. 86, no. 4, pp. 434-442.
19. Lambrecht B.N., Hammad H. Allergens and the airway epithelium response: Gateway to allergic sensitization. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2014, Vol. 134, no. 3, pp. 499-507.
20. Maoz-Segal R., Machnes-Maayan D., Veksler-Offengenden I., Frizinsky S., Hajyahia S., Agmon-Levin N. Local allergic rhinitis: An old story but a new entity. Rhinosinusitis. Ed. Gendeh B.S., Turkalj M., IntechOpen, 2019, pp. 1-9.
21. Rondón C., Canto G., Blanca M. Local allergic rhinitis: A new entity, characterization and further studies. *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.*, 2010, Vol. 10, no. 1, pp. 1-7.
22. Rondón C., Campo P., Togias A., Powe D.G., Mullol J., Blanca M. Local allergic rhinitis: concept, pathophysiology, and management. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2012, Vol. 129, pp. 1460-1467.
23. Schoos A.-M.M., Bullens D., Chawes B.L., Costa J., de Vlieger L., DunnGalvin A., Epstein M.M., Garssen J., Hilger C., Knipping K., Kuehn A., Mijakoski D., Munblit D., Nekliudov N.A., Ozdemir C., Patient K., Peroni D., Stoleski S., Stylianou E., Tukaļj M., Verhoeckx K., Zidarn M., van de Veen W. Immunological outcomes of allergen-specific immunotherapy in food allergy. *Front. Immunol.* 2020, Vol. 11, 568598. doi: 10.3389/fimmu.2020.568598.
24. Shahsavan S., Pirayesh A., Samani O.Z., Shirzad H., Zamani M.A., Amani S., Kazemi S.M., Moghni M., Deris F., Bageri N., Salimzadeh L., Tavakoli G., Arjenaki M.G. The relationship between IL-17A and IL-22 expression

and clinical severity in patients with moderate/severe persistent allergic rhinitis. *Am. J. Otolaryngol.*, 2019, Vol. 40, pp. 173-178.

25. Tamasauskienė L., Sitkauskienė B. Systemic and local cytokine profile and risk factors for persistent allergic airway inflammation in patients sensitised to house dust mite allergens. *BMC Pulm. Med.*, 2021, Vol. 21, no. 424, pp. 1-12.

26. Tantilipikorn P., Pinkaew B., Talek K., Assanasen P., Triphoon Suwanwech T.S., Bunnag C. Pattern of allergic sensitization in chronic rhinitis: A 19-year retrospective study. *Asian Pac. J. Allergy Immunol.*, 2021, Vol. 39, no. 3, pp. 156-162.

27. Testera-Montes A., Salas M., Palomares F., Ariza A., Torres M.J., Rondón C., Eguiluz-Gracia I. Local respiratory allergy: From rhinitis phenotype to disease spectrum. *Front. Immunol.*, 2021, Vol. 12, 691964. doi: 10.3389/fimmu.2021.691964.

28. Tyurin Yu.A., Lissovskaya S.A., Fassahov R.S., Mustafin I.G., Shamsutdinov A.F., Shilova M.A., Rizvanov A.A. Cytokine profile of patients with allergic rhinitis caused by pollen, mite, and microbial allergen sensitization. *J. Immunol. Res.*, 2017, Vol. 2017, 3054217. doi: 10.1155/2017/3054217.

29. Velikova T., Naydenova K., Dimitrov V. Mucosal inflammation in allergic rhinitis and bronchial asthma – Two sides of a coin. *Clin. Res. Immunol.*, 2018, Vol. 1, no. 1, pp. 1-2.

30. Wen H.C., Czarnowicki T., Noda S., Malik K., Pavel A.B., Nakajima S., Honda T., Shin J.U., Lee H., Chou M., Estrada Y., Zheng X., Xu H., Krueger J.G., Lee K.-H., Kabashima K., Guttman-Yassky E. Serum from Asian patients with atopic dermatitis is characterized by TH2/TH22 activation, which is highly correlated with nonlesional skin measures. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2018, Vol. 142, pp. 324-328.e311.

31. Williams C.M., Rahman S., Hubeau C., Ma H.L. Cytokine pathways in allergic disease. *Toxicol. Pathol.*, 2012, Vol. 40, no. 2, pp. 205-215.

32. Wise S.K., Lin S.Y., Toskala E., Orlandi R.R., Akdis C.A., Alt J.A., Azar A., Baroody F.M., Bachert C., Canonica G.W., Chacko T., Cingi C., Ciprandi G., Corey J., Cox L.S., Creticos P.S., Custovic A., Damask C., deConde A., DelGaudio J.M., Ebert C.S., Eloy J.A., Flanagan C.E., Fokkens W.J., Franzese C., Gosepath J., Halderman A., Hamilton R.G., Hoffman H.J., Hohlfeld J.M., Houser S.M., Hwang P.H., Incorvaia C., Jarvis D., Khalid A.N., Kilpeläinen M., Kingdom T.T., Krouse H., Larenas-Linnemann D., Laury A.M., Lee S.E., Levy J.M., Luong A.U., Marple B.F., McCoul E.D., McMains K.C., Melén E., Mims J.W., Moscato G., Mullol J., Nelson H.S., Patadia M., Pawankar R., Pfaar O., Platt M.P., Reisacher W., Rondón C., Rudmik L., Ryan M., Sastre J., Schlosser R.J., Settipane R.A., Sharma H.P., Sheikh A., Smith T.L., Tantilipikorn P., Tversky J.R., Veling M.C., Wang D.Y., Westman M., Wickman M., Zacharek M. International consensus statement on allergy and rhinology: Allergic rhinitis. *Int. Forum Allergy Rhinol.*, 2018, Vol. 8, no. 2, pp. 108-352.

33. Wisniewski J., Agrawal R., Woodfolk J.A. Mechanisms of tolerance induction in allergic disease: Integrating current and emerging concepts. *Clin. Exp. Allergy*, 2013, Vol. 43, no. 2, pp. 164-176.

34. Yamana Y., Fukuda K., Ko R., Uchio E. Local allergic conjunctivitis: A phenotype of allergic conjunctivitis. *Int. Ophthalmol.*, 2019, Vol. 39, pp. 2539-2544.

35. Ziade G.K., Karami R.A., Fakhri G.B., Alam E.S., Hamdan A.L., Mourad M.M., Hadi U.M. Reliability assessment of the endoscopic examination in patients with allergic rhinitis. *Allergy Rhinol.*, 2016, Vol. 7, no. 3, pp. 135-138.

Авторы:

Климов А.В. — к.м.н., ассистент кафедры оториноларингологии ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Томск, Россия

Салахутдинова З.В. — аспирант кафедры иммунологии и аллергологии ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Томск, Россия

Найдина О.А. — к.м.н., ассистент кафедры иммунологии и аллергологии ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Томск, Россия

Authors:

Klimov A.V., PhD (Medicine), Assistant Professor, ORL Department, Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation

Salakhutdinova Z.V., Postgraduate Student, Department of Immunology and Allergology, Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation

Naidina O.A., PhD (Medicine), Assistant Professor, Department of Immunology and Allergology, Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation

Климов В.В. — д.м.н., профессор, заведующий кафедрой иммунологии и аллергологии ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Томск, Россия

Свиридова В.С. — к.м.н., доцент кафедры иммунологии и аллергологии ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Томск, Россия

Пронина Н.А. — к.м.н., ассистент кафедры иммунологии и аллергологии ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Томск, Россия

Слёзкин М.И. — ординатор кафедры патологической анатомии ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Томск, Россия

Klimov V.V., PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Department of Immunology and Allergology, Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation

Sviridova V.S., PhD (Medicine), Associate Professor, Department of Immunology and Allergology, Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation

Pronina N.A., PhD (Medicine), Assistant Professor, Department of Immunology and Allergology, Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation

Slezkin M.I., Clinical Resident, Department of Pathological Anatomy, Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation

Поступила 02.07.2022
Принята к печати 29.07.2022

Received 02.07.2022
Accepted 29.07.2022

ВЛИЯНИЕ ВАКЦИНАЦИИ ОТ COVID-19 НА ИММУННЫЙ СТАТУС И ПРОФИЛЬ АУТОАНТИТЕЛ У ЖЕНЩИН РЕПРОДУКТИВНОГО ВОЗРАСТА

Довгань А.А., Драпкина Ю.С., Долгушина Н.В., Менжинская И.В., Инвиева Е.В., Вторушина В.В., Кречетова Л.В., Сухих Г.Т.

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Резюме. В условиях пандемии COVID-19 растет научный интерес к изучению влияния предлагаемой вакцинации на репродуктивное здоровье женщин. Как известно, изменение состояния иммунной системы и активация аутоиммунного ответа могут привести к нарушению репродуктивной функции у женщин и потенциальным осложнениям последующей беременности. Цель – оценить влияние вакцины «Гам-КОВИД-Вак» на показатели иммунного статуса, связь их изменений и специфического иммунного ответа на вакцинацию с динамикой уровня аутоантител у женщин репродуктивного возраста.

В проспективное исследование включили 120 женщин, которым проводилась вакцинация от COVID-19 вакциной «Гам-КОВИД-Вак». Критериями включения в исследование были: возраст от 18 до 49 лет, отсутствие в анамнезе COVID-19, отрицательный результат исследования на SARS-CoV-2 методом ПЦР и отрицательные результаты тестов на антитела классов G и M к SARS-CoV-2 перед вакцинацией, отсутствие беременности и серьезных соматических заболеваний. Обследование пациентов проводилось дважды: непосредственно перед вакцинацией и через 90-100 дней после введения 1-го компонента вакцины. Уровень IgG-антител к SARS-CoV-2 после вакцинации оценивали с помощью ИФА. До и после вакцинации определяли уровни антифосфолипидных, антиядерных, органо-специфических и антигормональных аутоантител, проводили иммунофенотипирование лимфоцитов периферической крови с определением основных субпопуляций (CD3, CD4, CD8, CD19, CD5, CD16, CD56), а также экспрессии активационных маркеров лимфоцитов (HLA-DR, CD25, CD147) с использованием моноклональных антител.

Эффективность и безопасность комбинированной векторной вакцины от COVID-19 были высокими. Специфические IgG-антитела к SARS-CoV-2 продуцировались у 98,3% вакцинированных женщин, не наблюдалось серьезных побочных реакций. После вакцинации отмечалось повышение уровня некоторых аутоантител в пределах референсных диапазонов, только IgM-антитела к фосфатидилэтаноламину (ФЭ) и IgG-антитела к ДНК повысились выше референсных значений. Однако это повышение было транзиторным. После вакцинации наблюдались изменения параметров иммуно-

Адрес для переписки:

Менжинская Ирина Владимировна
ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения РФ
117997, Россия, Москва, ул. Академика Опарина, 4.
Тел.: 8 (495) 438-11-83.
Факс: 8 (495) 438-49-65.
Email: i_menzinskaya@oparina4.ru

Address for correspondence:

Menzhinskaya Irina V.
V. Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology
117997, Russian Federation, Moscow, Acad. Oparin str., 4.
Phone: 7 (495) 438-11-83.
Fax: 7 (495) 438-49-65.
Email: i_menzinskaya@oparina4.ru

Образец цитирования:

А.А. Довгань, Ю.С. Драпкина, Н.В. Долгушина, И.В. Менжинская, Е.В. Инвиева, В.В. Вторушина, Л.В. Кречетова, Г.Т. Сухих «Влияние вакцинации от COVID-19 на иммунный статус и профиль аутоантител у женщин репродуктивного возраста» // Медицинская иммунология, 2022. Т. 24, № 5. С. 979-992. doi: 10.15789/1563-0625-EOC-2515

© Довгань А.А. и соавт., 2022

For citation:

A.A. Dovgan, Yu.S. Drapkina, N.V. Dolgushina, I.V. Menzhinskaya, E.V. Inviyaeva, V.V. Vtorushina, L.V. Krechetova, G.T. Sukhikh "Effect of COVID-19 vaccination on the immune status and autoantibody profile in women of reproductive age", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2022, Vol. 24, no. 5, pp. 979-992. doi: 10.15789/1563-0625-EOC-2515

DOI: 10.15789/1563-0625-EOC-2515

граммы: повышение содержания в периферической крови клеток с фенотипом CD3⁺CD25⁺, CD19⁺ и уменьшение содержания клеток с фенотипом CD56⁺CD16⁺ в пределах референсных диапазонов, снижение показателя CD147⁺/CD3⁺. Между данными изменениями показателей иммунограммы и уровнем некоторых аутоантител была отмечена слабая корреляционная связь. Специфический противовирусный иммунный ответ на вакцинацию не коррелировал с аутоиммунным ответом.

Вакцинация «Гам-КОВИД-Вак» является эффективной, безопасной и не приводит к нарушениям в иммунной системе. Наблюдаемое повышение уровня аутоантител к ФЭ и ДНК носит транзиторный характер. Изменения параметров иммунного статуса в пределах референсных диапазонов могут быть обусловлены вакцинацией и выработкой специфического противовирусного иммунного ответа.

Ключевые слова: SARS-CoV-2, COVID-19, вакцинация от COVID-19, иммунный статус, профиль аутоантител

EFFECT OF COVID-19 VACCINATION ON THE IMMUNE STATUS AND AUTOANTIBODY PROFILE IN WOMEN OF REPRODUCTIVE AGE

Dovgan A.A., Drapkina Yu.S., Dolgushina N.V., Menzhinskaya I.V., Inviyaeva E.V., Vtorushina V.V., Krechetova L.V., Sukhikh G.T.

V. Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology, Moscow, Russian Federation

Abstract. In the context of the COVID-19 pandemic, scientific interest is growing in studying the impact of the proposed vaccination on women's reproductive health. As is known, alterations in the state of the immune system and activation of an autoimmune response can lead to reproductive failure in women and potential complications of subsequent pregnancy. Objective: to evaluate the effect of the "Gam-COVID-Vac" on the immune status parameters, the relationship of their changes and the specific immune response to vaccination with the dynamics of the level of autoantibodies in women of reproductive age.

The prospective study included 120 women who were vaccinated against COVID-19 with the "Gam-COVID-Vac". The criteria for inclusion in the study were: the age from 18 to 49 years, the absence of COVID-19 in the anamnesis, a negative result of a study on SARS-CoV-2 by PCR and negative results of tests for antibodies of classes G and M to SARS-CoV-2 before vaccination, the absence of pregnancy and serious somatic diseases. The patients were examined twice: immediately before vaccination and 90-100 days after the introduction of the 1st component of the vaccine. The level of IgG antibodies to SARS-CoV-2 after vaccination was assessed using ELISA. Before and after vaccination, the levels of antiphospholipid, anti-nuclear, organ-specific and antihormonal autoantibodies were determined, peripheral blood lymphocytes were immunophenotyped to determine the main subpopulations (CD3, CD4, CD8, CD19, CD5, CD16, CD56), as well as the expression of activation markers of lymphocytes (HLA-DR, CD25, CD147) using monoclonal antibodies.

The effectiveness and safety of the combined vector vaccine against COVID-19 were high. Specific IgG antibodies to SARS-CoV-2 were produced in 98.3% of vaccinated women, no serious adverse reactions were observed. After vaccination, there was an increase in the level of some autoantibodies within the reference ranges, only IgM antibodies to phosphatidylethanolamine (PE) and IgG antibodies to DNA increased above the reference values. However, this increase was transient. After vaccination, the following changes in the parameters of the immunogram were observed: an increase in the content of cells with CD3⁺CD25⁺, CD19⁺ phenotype in peripheral blood and a decrease in the content of cells with CD56⁺CD16⁺ phenotype within the reference ranges, a decrease in CD147⁺/CD3⁺. Weak correlations were noted between these changes in immunogram parameters and the levels of some autoantibodies. The specific antiviral immune response to vaccination did not correlate with the autoimmune response.

Vaccination with "Gam-COVID-Vac" is effective and safe and does not lead to disorders in the immune system. The observed increase in the level of autoantibodies to PE and DNA is transient. Changes in the parameters of the immune status within the reference ranges may be due to vaccination and the development of a specific antiviral immune response.

Keywords: SARS-CoV-2, COVID-19, COVID-19 vaccination, immune status, autoantibody profile

Работа выполнена в рамках прикладного научного исследования № АААА-А20-120111790057-6.

Введение

COVID-19 («Coronavirus disease 2019») является тяжелой острой респираторной вирусной инфекцией, вызываемой РНК-вирусом SARS-CoV-2, распространение которой в мире за 2 года приобрело характер пандемии, охватившей более 508 миллионов человек [35]. Однако, как показали экспериментальные исследования, вирус SARS-CoV-2 может поражать не только пневмоциты, клетки эндотелия сосудов, миокарда и слизистой кишечника, но и другие клетки, на которых представлены специфические рецепторы, а именно ангиотензин превращающий фермент (ACE2), TMPRSS2 и CD147, включая клетки яичников, эндометрия и плаценты [14, 32, 33]. Вследствие этого у женщин могут наблюдаться нарушения репродуктивной функции, связанные с развитием инфицированных или анеуплоидных ооцитов со сниженным потенциалом к оплодотворению, нарушениями овуляции и имплантации эмбрионов [1].

Наиболее эффективным методом борьбы с COVID-19 является вакцинопрофилактика. В настоящее время в мире находят применение более 20 вакцин от COVID-19, около 150 вакцин проходят клинические испытания [36]. Комбинированная векторная вакцина для профилактики коронавирусной инфекции, вызываемой вирусом SARS-CoV-2 («Гам-КОВИД-Вак» («Спутник V»); НИЦ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи, Москва), стала первой в мире зарегистрированной вакциной от COVID-19, одобренной Министерством здравоохранения Российской Федерации [15]. По данным мета-анализа, обобщающего результаты исследования эффективности и безопасности отечественной вакцины «Гам-КОВИД-Вак», вакцинация имеет высокую эффективность в отношении профилактики симптоматического COVID-19 (97,8%) и COVID-19 тяжелого течения (100%) [18]. По результатам другого исследования, специфические антитела вырабатываются у 99% пациентов, вакцинированных «Гам-КОВИД-Вак» [12].

Несмотря на доказанную эффективность вакцины «Гам-КОВИД-Вак», важным остается вопрос безопасности вакцинации в отношении репродуктивного здоровья мужчин и женщин. До пандемии COVID-19 действие вакцин на репродуктивную систему мало изучалось, проводились единичные исследования, оценивающие влияние

разных вакцин на фертильность и репродуктивные исходы у животных [19, 30] и человека [21, 34]. В условиях массовой вакцинопрофилактики населения научный интерес к изучению влияния вакцин от COVID-19 на репродуктивное здоровье значительно возрос. К настоящему времени опубликованы результаты нескольких исследований, выполненных на небольших выборках пациентов, которые не подтвердили негативное влияние вакцинации от COVID-19 на сперматогенез у мужчин, гормональный профиль и исходы программ вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ) у женщин [2, 3, 4, 9, 20].

Одним из возможных механизмов нарушения репродуктивной функции под действием вакцинации может быть развитие аутоиммунного процесса с вовлечением гонад, других эндокринных органов или антифосфолипидного синдрома (АФС) [6]. Избыточный аутоиммунный ответ был описан, главным образом, при применении вакцин, содержащих адъюванты, которые используются для стимулирования иммунной системы и повышения эффективности вакцинации [22, 24]. Эффект адъювантов достигается через разные механизмы воздействия на врожденный и адаптивный иммунный ответ, некоторые из них способны стимулировать гуморальный иммунный ответ Th2-типа. Имеются данные, полученные на животных моделях и в единичных клинических исследованиях, о потенциальном негативном влиянии адъювантных вакцин на репродуктивную функцию, опосредованном аутоиммунными механизмами.

Так как развитие аутоиммунных реакций связано с нарушениями функции иммунной системы и изменением цитокинового статуса в сторону преобладания провоспалительных цитокинов, исследование иммунного статуса до и после вакцинации позволяет выявить изменения, которые могут способствовать развитию аутоиммунных процессов у предрасположенных людей. Для оценки иммунного статуса, отражающего содержание, состав и функциональную активность иммунных клеток периферической крови, проводят иммунофенотипирование лейкоцитов [28], которое заключается в определении экспрессируемых поверхностных и цитоплазматических маркеров дифференциации (CD-антигенов), уникальных для разных типов и субпопуляций клеток и стадий развития.

Результаты предварительного исследования, полученные на небольшой выборке и опубликованные в 2021 году, впервые показали, что отечественная комбинированная векторная вакцина

«Гам-КОВИД-Вак» не оказывает негативного влияния на параметры овариального резерва и уровень антифосфолипидных антител (аФЛ) у женщин репродуктивного возраста [2]. Для более полной оценки воздействия вакцинации от COVID-19 на иммунную систему было проведено настоящее исследование.

Цель исследования — оценить влияние вакцины «Гам-КОВИД-Вак» на показатели иммунного статуса, связь их изменений и специфического иммунного ответа на вакцинацию с динамикой уровня аутоантител у женщин репродуктивного возраста.

Материалы и методы

В проспективное интервенционное исследование было включено 120 женщин, которым была проведена вакцинация от SARS-CoV-2, вакциной «Гам-КОВИД-Вак» («Спутник V»). Все пациентки, включенные в исследование, подписали информированное добровольное согласие на участие в исследовании. Критериями включения в исследование были возраст от 18 до 49 лет, сохраненная менструальная функция, отрицательный результат исследования на РНК SARS-CoV-2 методом ПЦР и отрицательные результаты тестов на антитела IgM и IgG к SARS-CoV-2 (перед вакцинацией), отсутствие в анамнезе заболевания COVID-19, отсутствие контакта с заболевшими COVID-19 в течение не менее 14 дней, со слов пациентки, до начала исследования. Критериями невключения были противопоказания к вакцинации, согласно инструкции к препарату, беременность и период лактации, острые воспалительные и инфекционные заболевания, ревматические болезни, онкологические заболевания любой локализации, гормональная терапия, влияющая на менструальный цикл, иммуномодулирующая терапия, вакцинация от других инфекций в течение 3 месяцев до включения в исследование. Критериями исключения выступали заболевание COVID-19 в период вакцинации, серьезные побочные проявления после иммунизации (ПППИ), требующие отмены введения 2-го компонента вакцины, отказ пациентки от дальнейшей вакцинации.

Вакцинация пациенток проводилась в специально оборудованном прививочном кабинете, согласно временным методическим рекомендациям Минздрава России «Порядок проведения вакцинации взрослого населения против COVID-19». Перед каждым этапом вакцинации все участницы исследования были осмотрены врачом, им была

выполнена термометрия, измерение сатурации, частоты сердечных сокращений (ЧСС), артериального давления (АД), проведена аускультация дыхательной и сердечно-сосудистой системы, а также осмотр зева. Подготовка вакцины к использованию осуществлялась в строгом соответствии с официальной инструкцией к препарату. Обследование пациенток проводилось дважды: перед вакцинацией и через 90-100 дней после введения 1-го компонента вакцины.

Идентификация SARS-CoV-2 в мазке из ротоглотки проводилась с помощью «Набора реагентов для выявления РНК коронавирусов SARS-CoV-2 и подобных SARS-CoV методом обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (ОТ-ПЦР) (SARS-CoV-2/SARS-CoV)» (ООО НПО «ДНК-Технология», Россия).

До вакцинации определение антител классов М и G к SARS-CoV-2 проводили с помощью иммунохроматографического теста «ХЕМАТест анти-SARS-CoV-2» производства ООО «ХЕМА» (Россия). Через 90-100 дней после введения 1-го компонента вакцины у пациенток, включенных в исследование, была выполнена количественная оценка уровня антител класса G к SARS-CoV-2 с помощью набора «ДС-ИФА-АНТИ-SARS-CoV-2-G(S)» производства НПО «Диагностические системы» (Россия).

В исследовании до и после вакцинации с использованием ИФА определяли профиль аутоиммунных антител в сыворотке крови у 120 женщин: критериальных аФЛ класса М и G (к кардиолипину (аКЛ), 2-гликопротеину-I (a 2-ГП-I)), не-критериальных аФЛ (к аннексину V (aAn V), фосфатидилсерину (аФС) с использованием наборов ORGENTEC Diagnostika GmbH (Германия), антител к фосфатидилэтаноламину (аФЭ) и комплексу фосфатидилсерин/протромбин (аФС/ПТ) с помощью наборов AESKU Diagnostics (Германия); антител класса G к тиреоглобулину (aТГ) и тиреопероксидазе (aТПО) (ORGENTEC Diagnostika), рецептору ТТГ (aРТТГ) (Medipan GmbH, Германия); антинуклеарных антител класса G (АНА), антител к двухспиральной ДНК (aДНК), рибонуклеопротеину (aRNP-70), цитоплазматическим антигенам SSA(RO) (aRo/SSA) и SSB(La) (aLa/SSB) (ORGENTEC Diagnostika GmbH); антиовариальных антител (АОА) (DRG, Германия), антитрофобластических антител (АТА) и антител к зоне пеллюцида (aЗР) (QAYEE-BIO for Life Science, Китай); антител к гормонам ФСГ (аФСГ) и прогестерону (аПГ) с использованием реагентов ООО ХЕМА (Россия).

У пациенток также были проанализированы параметры иммунограммы в крови, взятой из периферической вены локтевого сгиба, как до вакцинации, так и через 90–100 дней после вакцинации. Проводили оценку клеточного состава (иммунофенотипирование) лимфоцитов с фенотипами CD3⁺, CD3⁺CD4⁺, CD3⁺CD8⁺, CD19⁺, CD19⁺CD5⁺, CD3⁺CD56⁺CD16⁺, CD3⁺CD56⁺CD16⁺, CD56⁺, а также экспрессию маркеров активации CD3⁺HLA-DR⁺, CD3⁺HLA-DR⁺, CD3⁺CD25⁺, CD25⁺, CD3⁺CD147⁺, CD19⁺CD147⁺. Фенотипирование лимфоцитов периферической крови осуществлялось на проточном цитофлуориметре Gallios (Beckman Coulter, США) с использованием моноклональных антител, меченных флуоресцеина изотиоцианатом (FITC), фикоэритрином (PE) или аллофикоцианином (APC), против антигенов CD3(FITC), CD4(PE), CD5(PE), CD8(PE), CD16⁺CD56(PE), CD19(FITC), CD56(PE), CD25(FITC), HLA-DR(FITC), CD147(APC) (Becton Dickinson и eBioscience, США).

Исследование было одобрено комиссией по этике биомедицинских исследований ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России.

Статистическая обработка результатов исследования осуществлялась с помощью таблиц Microsoft Excel и пакетов прикладных программ MedCalc v. 12, Statistica v. 10. Нормальность распределения количественных данных в выборках определяли с использованием тестов Колмогорова–Смирнова, Шапиро–Уилка. Качественные данные оценивали путем вычисления долей (%). Связанные бинарные данные в одной группе до и после вмешательства сравнивали с помощью критерия Мак-Немара. При нормальном распределении данные представляли средним арифметическим и стандартным отклонением ($M \pm SD$). При отклонении от нормального распределения определяли медианные значения с интерквартильным размахом — $Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})$, применяли методы непараметрической статистики, результаты измерений до и после вакцинации в одной группе сравнивали с использованием критерия знаков (Sign-теста). Различия считали статистически значимыми при уровне значимости $p < 0,05$.

Результаты

Все включенные в исследование женщины соответствовали критериям включения, средний возраст женщин составлял $33,3 \pm 7,7$ года, средний индекс массы тела — $23,1 (20,1-25,0)$ кг/м².

Распространенность вредных привычек среди женщин была невысокой: курение по 1 пачке в день отмечалось у 3 (2,5%) женщин, употребление алкоголя более 1 раза в неделю — у 11 (9,2%) женщин. Из гинекологических заболеваний у женщин наиболее часто диагностировалась миома матки (у 13 (10,8%) женщин), а также наружный и внутренний генитальный эндометриоз (у 12 (10%) женщин). Из соматических заболеваний у женщин наиболее часто отмечались аллергические заболевания (у 36 (30%)), хронические заболевания желудочно-кишечного тракта (у 26 (21,7%)) и ЛОР-органов (у 18 (15%)).

Вакцинация переносилась женщинами хорошо, не было отмечено ни одного серьезного поствакцинального побочного проявления после иммунизации (ПППИ). Наиболее часто наблюдалась лихорадка (после введения 1-го компонента у 48 (40%), 2-го компонента у 46 (38,3%), реже системные реакции в виде головной боли и миалгии (соответственно, у 26 (21,7%) и 30 (25%)) и местные реакции, такие как боль, отек и краснота (соответственно, у 20 (16,7%) и 32 (26,7%) женщин). ПППИ выявлялись одинаково часто после введения 1-го и 2-го компонента вакцины (у 53 (44,2%) и 49 (40,8%) женщин; $p = 0,158$), однако местные реакции чаще наблюдались после 2-го компонента ($p = 0,011$). Реакции на введение компонентов вакцины были кратковременными (1–2 дня).

Специфические IgG-антитела к SARS-CoV-2 были выявлены в сыворотке крови у 98,3% вакцинированных женщин, только у 2 (1,7%) пациенток уровень антител не достиг порогового значения позитивности. При определении IgG-антител к SARS-CoV-2 у большинства женщин были получены высокие значения индекса позитивности в ИФА, средний показатель индекса позитивности составлял 9,6 (4,8–11,6). В течение всего периода наблюдений не было зафиксировано ни одного случая заболевания COVID-19.

При исследовании профиля аутоантител в сыворотке крови женщин позитивность хотя бы на один вид аутоантител до вакцинации была выявлена у 85 (70,8%) женщин, после вакцинации — у 90 (75%). Позитивность на 2 и более вида аутоантител до вакцинации наблюдалась у 46 (38,3%) женщин, после вакцинации — у 55 (45,8%).

Исходно аФЛ с уровнем выше референсных значений (РЗ) были найдены у 30 (25%) женщин, после вакцинации повышенный уровень аФЛ отмечался у 28 (23,3%) женщин. Анти-ФЭ IgM-антитела после вакцинации выявлялись значимо чаще (у 20 (16,7%) женщин), чем до вакцинации

ТАБЛИЦА 1. УРОВЕНЬ АУТОАНТИТЕЛ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ У ЖЕНЩИН ДО И ПОСЛЕ ВАКЦИНАЦИИ ОТ COVID-19, Ме ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)
TABLE 1. LEVEL OF AUTOANTIBODIES IN THE BLOOD SERUM OF WOMEN BEFORE AND AFTER VACCINATION AGAINST COVID-19, Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)

Вид антител Type of antibodies	Единицы измерения Units of measurement	Референсные значения Reference values	До вакцинации Before vaccination	После вакцинации After vaccination	Значение p Value of p
аКЛ IgM aCL IgM	MPL-Ед/мл MPL-U/mL	< 7	2,2 (1,4-3,5)	2,3 (1,7-3,1)	0,575
аКЛ IgG aCL IgG	GPL-Ед/мл GPL-U/mL	< 10	2,9 (2,0-4,1)	2,4 (1,8-3,3)	< 0,001
аβ2-ГП-1 IgM aβ2-GP-I IgM	Ед/мл U/mL	< 5	2,6 (1,7-3,5)	2,3 (1,7-3,2)	0,022
аβ2-ГП-1 IgG aβ2-GP-I IgG	Ед/мл U/mL	< 5	1,8 (1,3-2,9)	1,7 (1,3-2,3)	0,003
аФС IgM aPS IgM	Ед/мл U/mL	< 10	2,5 (1,8-3,4)	2,5 (1,9-3,2)	0,630
аФС IgG aPS IgG	Ед/мл U/mL	< 10	2,6 (2,0-3,4)	3,5 (2,8-4,6)	< 0,001
аФЭ IgM aPE IgM	Ед/мл U/ml	< 12	5,2 (2,6-10,4)	6,1 (3,4-13,4)	< 0,001
аФЭ IgG aPE IgG	Ед/мл U/mL	< 12	1,0 (1,0-1,3)	1,5 (1,2-2,1)	< 0,001
аАн V IgM aAn V IgM	Ед/мл U/mL	< 5	2,9 (2,2-4,1)	3,4 (2,6-4,4)	< 0,001
аАн V IgG aAn V IgG	Ед/мл U/mL	< 5	2,3 (1,7-3,0)	4,0 (2,2-4,8)	< 0,001
аФС/ПТ IgM aPS/PT IgM	Ед/мл U/mL	< 12	1,9 (1,3-2,8)	1,9 (1,3-3,2)	0,949
аФС/ПТ IgG aPS/PT IgG	Ед/мл U/mL	< 12	2,3 (1,7-3,3)	2,8 (1,9-3,7)	0,002
АНА IgG ANA IgG	ИП PI	< 1	0,5 (0,4-0,7)	0,45 (0,40-0,65)	< 0,001
аSS-A IgG	МЕ/мл IU/mL	< 15	3,3 (2,6-5,3)	3,0 (2,6-4,3)	0,032
аSS-B IgG	МЕ/мл IU/mL	< 15	3,2 (2,1-4,8)	3,3 (2,3-5,1)	0,038
аДНК IgG aDNA IgG	МЕ/мл IU/mL	< 20	11,8 (9,3-14,7)	15,3 (12,8-18,1)	< 0,001
аRNP-70 IgG	Ед/мл U/mL	< 25	4,1 (2,8-5,6)	2,3 (1,7-3,1)	< 0,001
аТПО IgG aTPO IgG	МЕ/мл IU/mL	< 50	12,2 (8,7-18,7)	12,4 (9,5-18,9)	1,00
аРТТГ IgG aTSHR IgG	МЕ/л IU/L	≤ 1	0,5 (0,3-0,6)	0,3 (0,2-0,5)	< 0,001
аТГ IgG aTG IgG	МЕ/мл IU/mL	< 100	19,4 (15,0-28,5)	20,7 (14,8-31,5)	0,227
аЗР IgG	нг/мл ng/mL	< 250	156 (126,5-183,5)	157 (133,7-218,2)	0,114
аТБ IgG aTB IgG	нг/мл ng/mL	< 150	101,7 (84-117)	127,2 (106-137)	< 0,001
аОВ IgG aOV IgG	Ед/мл U/mL	< 10	4,0 (3,3-5,1)	4,8 (4,0-5,7)	< 0,001
аПГ IgM aPG IgM	ед. ОП un. of OD	< 0,4	0,28 (0,22-0,40)	0,29 (0,23-0,35)	0,302
аПГ IgG aPG IgG	ед. ОП un. of OD	< 0,4	0,28 (0,20-0,37)	0,33 (0,25-0,44)	0,002
аФСГ IgM aFSH IgM	ед. ОП un. of OD	< 0,4	0,29 (0,20-0,38)	0,25 (0,19-0,30)	< 0,001
аФСГ IgG aFSH IgG	ед. ОП un. of OD	< 0,4	0,27 (0,20-0,34)	0,29 (0,23-0,35)	0,575

Примечание. Sign тест; ИП – индекс позитивности; ОП – оптическая плотность.
Note. Sign test; PI, positivity index; OD, optical density.

ТАБЛИЦА 2. ПАРАМЕТРЫ ИММУНОГРАММЫ У ЖЕНЩИН ДО И ПОСЛЕ ВАКЦИНАЦИИ ОТ COVID-19, Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)

TABLE 2. IMMUNOGRAM PARAMETERS IN WOMEN BEFORE AND AFTER VACCINATION AGAINST COVID-19, Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)

Параметры Parameters	До вакцинации Before vaccination	После вакцинации After vaccination	Значение p Value of p
Лейкоциты, $\times 10^9$ Leukocytes, $\times 10^9$	6,27 (5,31-7,57)	6,28 (5,37-7,24)	0,231
Лимфоциты, % Lymphocytes, %	31,6 (27,3-38,1)	32,9 (28,1-37,9)	0,519
Лимфоциты, абс. Lymphocytes, abs.	1,98 (1,73-2,37)	1,97 (1,69-2,29)	0,852
CD3 ⁺ (абс.) CD3 ⁺ (abs.)	1,47 (1,20-1,74)	1,46 (1,24-1,69)	0,782
CD3 ⁺ (%)	73,9 (69,0-77,4)	74,7 (70,3-78,0)	0,027
CD3 ⁺ CD4 ⁺ (абс.) CD3 ⁺ CD4 ⁺ (abs.)	0,86 (0,69-1,04)	0,88 (0,71-1,02)	0,355
CD3 ⁺ CD4 ⁺ (%)	42,5 (39,0-47,9)	44,2 (39,5-48,5)	0,007
CD3 ⁺ CD8 ⁺ (абс.) CD3 ⁺ CD8 ⁺ (abs.)	0,51 (0,41-0,66)	0,50 (0,41-0,65)	0,782
CD3 ⁺ CD8 ⁺ (%)	25,8 (22,5-30,3)	26,5 (22,7-30,9)	0,267
Соотношение CD3 ⁺ CD4 ⁺ /CD3 ⁺ CD8 ⁺ CD3 ⁺ CD4 ⁺ /CD3 ⁺ CD8 ⁺ ratio	1,66 (1,35-2,08)	1,66 (1,34-2,16)	0,582
CD19 ⁺ (абс.) CD19 ⁺ (abs.)	0,20 (0,14-0,27)	0,20 (0,16-0,27)	0,05
CD19 ⁺ (%)	9,7 (8,0-13,5)	10,8 (8,1-13,9)	0,009
CD19 ⁺ CD5 ⁺ (абс.) CD19 ⁺ CD5 ⁺ (abs.)	0,03 (0,01-0,04)	0,02 (0,01-0,03)	0,121
CD19 ⁺ CD5 ⁺ (%)	1,3 (0,80-1,80)	1,2 (0,7-1,7)	0,195
CD3 ⁺ CD56 ⁺ CD16 ⁺ (абс.) CD3 ⁺ CD56 ⁺ CD16 ⁺ (abs.)	0,22 (0,14-0,29)	0,17 (0,12-0,25)	< 0,001
CD3 ⁺ CD56 ⁺ CD16 ⁺ (%)	10,5 (7,6-14,5)	8,85 (6,2-12,7)	< 0,001
CD3 ⁺ CD56 ⁺ CD16 ⁺ (абс.) CD3 ⁺ CD56 ⁺ CD16 ⁺ (abs.)	0,04 (0,03-0,08)	0,04 (0,02-0,06)	< 0,001
CD3 ⁺ CD56 ⁺ CD16 ⁺ (%)	2,4 (1,2-3,8)	1,7 (0,9-2,8)	< 0,001
CD3 ⁺ CD56 ⁺ (абс.) CD3 ⁺ CD56 ⁺ (abs.)	0,08 (0,04-0,13)	0,07 (0,04-0,10)	0,003
CD3 ⁺ CD56 ⁺ (%)	4,3 (2,2-6,1)	3,5 (2,0-5,4)	0,007
CD56 ⁺ (абс.) CD56 ⁺ (abs.)	0,32 (0,24-0,48)	0,28 (0,21-0,41)	0,004
CD56 ⁺ (%)	17,7 (13,3-22,3)	15,0 (11,5-20,3)	< 0,001
CD3 ⁺ HLA-DR ⁺ (абс.) CD3 ⁺ HLA-DR ⁺ (abs.)	0,05 (0,03-0,07)	0,04 (0,03-0,06)	0,311
CD3 ⁺ HLA-DR ⁺ (%)	2,3 (1,6-3,1)	2,30 (1,5-3,0)	0,451
CD3 ⁺ HLA-DR ⁺ (абс.) CD3 ⁺ HLA-DR ⁺ (abs.)	0,24 (0,19-0,32)	0,24 (0,19-0,30)	0,782
CD3 ⁺ HLA-DR ⁺ (%)	12,5 (10,3-15,0)	12,7 (10,0-15,1)	0,782
CD3 ⁺ CD25 ⁺ (абс.) CD3 ⁺ CD25 ⁺ (abs.)	0,08 (0,04-0,12)	0,13 (0,10-0,17)	< 0,001
CD3 ⁺ CD25 ⁺ (%)	4,2 (2,1-6,0)	6,5 (5,1-8,3)	< 0,001
CD25 ⁺ (абс.) CD25 ⁺ (abs.)	0,09 (0,05-0,13)	0,16 (0,12-0,21)	< 0,001
CD25 ⁺ (%)	4,8 (2,4-6,9)	7,9 (6,2-10,2)	< 0,001
CD147/CD3, MFI	4,03 (3,68-4,33)	3,75 (3,38-4,11)	0,009
CD147/CD19, MFI	3,27 (3,0-3,6)	3,06 (2,80-3,50)	0,239

Примечание. Sign тест; MFI – средняя интенсивность флуоресценции.

Note. Sign test; MFI, mean fluorescence intensity.

(у 15 (12,5%) женщин) ($p = 0,043$). У 7 (5,8%) женщин повышенный уровень аФЛ был впервые выявлен после вакцинации, у 9 (7,5%) женщин исходно повышенный уровень аФЛ после вакцинации нормализовался. После вакцинации значительно снизились средние показатели уровня кристаллических аФЛ (IgG аКЛ, IgM и IgG а 2-ГП-I) и повысились средние показатели уровня некристаллических аФЛ, а именно антител (М, G) к ФЭ и аннексину V, IgG-антител к ФС и комплексу ФС/ПТ (табл. 1).

Кроме аФЛ, в сыворотке крови женщин определяли содержание аутоантител другой специфичности, включая органоспецифические (к антигенам щитовидной железы, яичников, трофобласта, зоне пеллюцида), антитела к ядерным антигенам и гормонам, до и после вакцинации (табл. 1). После вакцинации наблюдалось разнонаправленное изменение уровня аутоантител разной специфичности в пределах референсных значений: значительно снизились средние показатели уровня IgG-антител к РТТГ, SS-A, RNP-70, АНА, IgM-антител к ФСГ, в то же время повысились средние уровни антиовариальных антител, IgG-антител к ТБ, ПГ, SS-B. IgG-антитела к двуспиральной ДНК были единственным видом аутоантител, повышение которых выявлялось после вакцинации значительно чаще (у 18 (15%) женщин), чем до вакцинации (у 4 (3,3%) женщин) ($p = 0,003$).

Повторное исследование содержания антител к ФЭ и ДНК у серопозитивных женщин, выполненное через 3 месяца, показало нормализацию уровня данных антител, что подтвердило транзиторный характер их повышения после вакцинации.

У женщин, включенных в исследование, было проведено иммунофенотипирование лимфоцитов периферической крови и проанализирован субпопуляционный состав лимфоцитов до и после вакцинации (табл. 2).

При сравнении показателей иммунограммы у женщин до и после вакцинации отмечались следующие изменения: повышение относительного содержания Т-лимфоцитов ($CD3^+$) и Т-хелперов ($CD3^+CD4^+$), повышение абсолютного и относительного содержания активированных Т-лимфоцитов с фенотипом $CD3^+CD25^+$ и В-лимфоцитов ($CD19^+$), снижение абсолютного и относительного содержания субпопуляций клеток-натуральных киллеров (NK-клеток, $CD3^-CD56^+CD16^+$) и натуральных киллеров/Т-лимфоцитов (NKT-клеток, $CD3^+CD56^+CD16^+$, $CD3^+CD56^+$), а также снижение экспрессии ре-

цептора CD147 на Т-лимфоцитах ($CD3^+$). Однако все изменения содержания клеток не выходили за рамки референсных диапазонов. Особо следует отметить, что у вакцинированных женщин не наблюдалось повышения абсолютного и относительного содержания В1-лимфоцитов ($CD19^+CD5^+$), продуцирующих аутоантитела. При этом были выявлены слабые прямые или обратные корреляционные связи между уровнем некоторых аутоантител и показателями иммунограммы, включая содержание В-лимфоцитов, В1-лимфоцитов, активированных Т-лимфоцитов, NK- и NKT-клеток. Проведенный сравнительный анализ иммунограмм, полученных у женщин с возросшим после вакцинации числом позитивных тестов на аутоантитела ($n = 12$) и у женщин с неизменившимся или снизившимся показателем позитивности ($n = 108$), не выявил статистически значимых различий между параметрами иммунограмм и дельтами этих параметров до и после вакцинации в этих группах.

При исследовании возможной связи между уровнями специфических противовирусных антител и аутоиммунных антител значимых корреляционных связей не было выявлено, что свидетельствует об отсутствии влияния специфического противовирусного иммунного ответа на усиление аутоиммунного ответа у женщин.

Таким образом, проведенный анализ показал изменения параметров иммунограммы у женщин после вакцинации по сравнению с исходными в виде повышения содержания активированных Т-лимфоцитов, В-лимфоцитов и снижения содержания NK- и NKT-клеток, при этом отмечались слабые корреляционные связи данных изменений с уровнем ряда аутоантител. Выявлено снижение у вакцинированных женщин экспрессии рецепторов CD147 на Т-лимфоцитах. Кроме этого, показано, что специфический противовирусный иммунный ответ на вакцинацию не коррелировал с аутоиммунным ответом.

Обсуждение

Результаты экспериментов и ряда клинических исследований показали, что вакцинация потенциально может стать причиной аутоиммунного/воспалительного синдрома, индуцированного адъювантами (англ. Autoimmune / Inflammatory Syndrome Induced by Adjuvants (ASIA)), проявлениями которого являются ревматические заболевания, а также СКВ и АФС, которые в свою очередь могут привести к нарушению репродуктивной функции [8, 16]. Введение в организм

адъювантов, являющихся необходимым компонентом вакцин, усиливающим иммунный ответ на антиген, способствует стимуляции образования аутоантител на фоне вакцинации [31]. Кроме того, показано, что молекулярная мимикрия, обусловленная гомологией экзогенных и собственных антигенов, является одним из важных механизмов, ответственных, в частности, за развитие АФС [29].

Следует отметить, что данное исследование является первым, посвященным изучению влияния иммунизации отечественной вакциной «Гам-КОВИД-Вак» на иммунный статус и аутоиммунный ответ у женщин репродуктивного возраста. По опубликованным в 2021 году предварительным данным, полученным на небольшой выборке женщин, вакцинация не оказывает негативного влияния на показатели овариального резерва, а также на уровень аФЛ [2]. Исследование было продолжено на большей группе женщин репродуктивного возраста, соответствующих критериям включения, при этом специальные методы исследования предусматривали определение у женщин не только профиля аутоантител, но и иммунного статуса до и после вакцинации.

Как известно, Т-лимфоциты являются наиболее быстро реагирующими на воспалительный процесс иммунокомпетентными клетками. Поэтому оценка их содержания в периферической крови является одним из наиболее информативных показателей состояния иммунной системы [26]. Учитывая, что изменения иммунного статуса и иммунный ответ на вакцинацию могут ассоциироваться с развитием аутоиммунного ответа, параметры иммунограммы у женщин до и после вакцинации и содержание противовирусных специфических антител анализировались в сравнении с динамикой изменения уровня аутоантител.

Результаты исследования показали, что специфический противовирусный иммунный ответ на вакцинацию не был связан с аутоиммунным ответом, что косвенно свидетельствовало об отсутствии влияния вакцинации на развитие аутоиммунных реакций, способных вызвать нарушение репродуктивной функции у женщин. Высокая эффективность вакцины «Гам-КОВИД-Вак» подтверждалась образованием специфических противовирусных антител класса G к SARS-CoV-2 у 98,3% пациенток и полученными высокими показателями индекса позитивности в ИФА.

При анализировании параметров иммунного статуса у женщин до и после вакцинации были

выявлены наиболее выраженные изменения, такие как повышение абсолютного и относительного содержания активированных Т-лимфоцитов и В-лимфоцитов, снижение содержания NK- и NKT-клеток, снижение экспрессии рецепторов CD147 на Т-лимфоцитах.

Следует отметить, что антиген CD25, представляющий собой цепь рецептора IL-2, является маркером ранней активации лимфоцитов, экспрессируется на Т-лимфоцитах и регуляторных Т-лимфоцитах, отражает способность лимфоцитов к пролиферации и дифференцировке, характеризует функциональное состояние активированных Т-лимфоцитов (CD3⁺CD25⁺). В клинической практике часто определяют содержание субпопуляции активированных Т-лимфоцитов с фенотипом CD3⁺CD25⁺ в периферической крови. С одной стороны, повышение их количества, а также общей популяции лимфоцитов с фенотипом CD25⁺ может свидетельствовать о ранней стадии воспалительного процесса любой природы [11], а с другой стороны, о формировании минорной субпопуляции регуляторных Т-лимфоцитов с естественной регуляторной функцией, экспрессирующих транскрипционный фактор Foxp3, и о затухании (супрессии) воспалительного процесса. Учитывая, что исследование проводилось через 90 дней после введения 1-го компонента вакцины, повышение содержания Т-лимфоцитов с фенотипом CD25⁺ может указывать на формирование субпопуляции супрессорных Т-лимфоцитов, способствующих снижению интенсивности воспалительного процесса, вызванного вакцинацией.

Поскольку вакцинация вызывает в организме процесс, аналогичный вирусному инфекционному процессу, то уменьшение в периферической крови вакцинированных через два-три месяца после вакцинации содержания субпопуляций с естественной киллерной активностью (с фенотипом CD56⁺CD16⁺) может свидетельствовать о снижении поствакцинальной реакции организма.

Обращает на себя внимание выявленное снижение экспрессии CD147 на лимфоцитах CD3⁺ после вакцинации, что является положительным трендом. CD147 является рецептором, трансмембранным гликопротеином, принадлежащим к суперсемейству иммуноглобулинов, и экспрессируется как на клетках эпителиального барьера, так и на иммунных клетках Т-клеточной линии [13, 25]. Установлено, что CD147 облегчает инвазию SARS-CoV-2 в клетки хозяина, а также вирусов атипичной пневмонии, кори, HIV-1 и

малярийного плазмодия. Измененная экспрессия этих рецепторов, связанная с возрастом, полом, ожирением и курением или заболеваниями, в частности бронхиальной астмой, хроническими обструктивными заболеваниями легких, может способствовать заболеваемости и тяжести COVID-19. В связи с этим снижение экспрессии CD147 имеет важное значение для защиты клеток хозяина от проникновения SARS-CoV-2.

В эксперименте на культуре клеток почки человека показано, что антитела к CD147 способны блокировать распространение вируса между клетками, а при концентрации антител 3 мкг/мл удается достичь практически стопроцентной остановки распространения вируса между клетками. Препарат гуманизированных моноклональных антител против CD147 (меплазумаб), блокирующих инфекцию SARS-CoV-2 *in vitro*, уже прошел клинические испытания на пациентах с пневмонией, ассоциированной с COVID-19 [5].

Следует отметить, что у значительной части женщин после вакцинации отмечалось повышение уровня антител к ФЭ и ДНК, которое носило транзиторный характер, так как при повторном исследовании через 3 месяца уровень этих антител нормализовался. При этом в периферической крови не наблюдалось изменения содержания (абсолютного и относительного) субпопуляции В1-лимфоцитов ($CD5^+CD19^+$), продуцирующих поликлональные аутоантитела к собственным антигенам, что также может свидетельствовать о транзиторном характере повышения уровня аутоантител. Повышение антител к ФЭ, роль которых в патогенезе АФС до конца не установлена, может быть следствием любого инфекционно-воспалительного процесса, развивающегося в том числе при вакцинации или активации очагов хронической инфекции в организме.

По данным обзора Toplak N. и соавт (2015), у здоровых людей наблюдалась индукция образования аутоантител в ответ на вакцинацию от гепатита А и В, гриппа, при этом выявлялось транзиторное повышение антинуклеарных и антифосфолипидных антител, однако ни у одного вакцинированного в течение периода наблюдения не было зафиксировано развитие аутоиммунного заболевания. Предполагается, что транзиторное повышение некоторых аутоантител может быть связано с неспецифической активацией Т-лимфоцитов в ответ на вакцинацию [33].

Образованию аутоантител может способствовать предрасположенность женщин репродуктивного возраста к развитию аутоиммунных реакций, которая отчасти обусловлена иммуно-

стимулирующим действием женских половых гормонов, прежде всего эстрогенов и пролактина [17, 23]. Как известно, эстрогены стимулируют быстрое созревание Т- и В-лимфоцитов [10], способствуют экстрамедуллярному гемопоэзу, избеганию негативной селекции аутореактивных Т- и В-лимфоцитов, развивающихся вне костного мозга, и их накоплению, выживанию аутореактивных В-лимфоцитов на периферии [27].

Кроме того, вакцинация вызывает развитие воспалительного процесса, сопровождающегося повышенной продукцией Т-хелперами цитокинов и других сигнальных молекул, необходимых для стимуляции специфических В-лимфоцитов, отвечающих на эпитопы вирусных антигенов. При выраженном поствакцинальном иммунном ответе повышенный выброс цитокинов и других сигнальных молекул и появление детрита разрушенных собственных клеток может приводить к активации в периферических лимфоузлах В-клеток, специфических как к вирусным белкам, так и к собственным белкам или их комплексам с фосфолипидами и нуклеиновыми кислотами, т. е. возможна стимуляция аутореактивных В-клеток. Важно отметить, что при нормальном иммунном ответе могут включиться механизмы эпитопного распространения с расширением специфичности иммунного ответа, вовлечением собственных эпитопов, высвобожденных в результате повреждения клеток или воспаления, а также поликлональной активации В-лимфоцитов, вовлекающей аутореактивные клоны [22].

В процессе вакцинации могут активироваться клоны Т- и В-лимфоцитов, перекрестно реагирующих с белками SARS-CoV-2 и различными тканевыми антигенами, например, антигенами соединительной ткани, сердечно-сосудистой и нервной системы, желудочно-кишечного тракта. Такой же эффект может наблюдаться в поствакцинальном периоде других инфекционных заболеваний, которые рассматриваются как триггеры аутоиммунных процессов, поскольку микробные и вирусные антигены могут вызывать перекрестные иммунные реакции с собственными антигенами организма. Механизм молекулярной мимикрии, действующий при сходстве антигенных компонентов вакцины и специфических белков человека, может запустить в организме аутоиммунные реакции [7]. Однако для развития аутоиммунного заболевания необходимо наличие у вакцинированного генетической предрасположенности.

Таким образом, изменения в иммунной системе у вакцинированных женщин носили транзиторный характер и не приводили к запуску аутоиммунных реакций, способных повлиять на репродуктивную функцию женщин. Полученные данные свидетельствуют о высокой эффективности вакцины и безопасности «Гам-КОВИД-Вак» для репродуктивного здоровья женщин и целесообразности проведения вакцинации для предупреждения негативного влияния COVID-19 на репродуктивную функцию женщин.

Заключение

Впервые проведено исследование влияния отечественной комбинированной векторной вакцины «Гам-КОВИД-Вак» на иммунный статус и профиль аутоиммунных антител у женщин репродуктивного возраста. Продемонстрирована высокая эффективность и безопасность вакцинации, образование достаточного количества специфических противовирусных антител практически у всех вакцинированных женщин, снижение

экспрессии клеточного рецептора CD147, способствующего проникновению вируса в клетки хозяина, а также отсутствие влияния специфического противовирусного иммунного ответа на аутоиммунный ответ. Выявленное после вакцинации повышение абсолютного и относительного содержания в периферической крови активированных Т-лимфоцитов, В-лимфоцитов и снижение содержания НК- и НКТ-клеток в пределах референсных диапазонов может быть следствием самой вакцинации и выработки специфического противовирусного иммунного ответа. Транзиторный характер подъема уровня аутоантител к ФЭ и двухспиральной ДНК подтверждается отсутствием повышения содержания В1-лимфоцитов в периферической крови. Таким образом, выявленные изменения параметров иммунной системы после вакцинации отмечались в пределах референсных диапазонов и носили транзиторный характер, не наблюдалось запуска аутоиммунных реакций, способных повлиять на репродуктивное здоровье женщин.

Список литературы / References

1. Долгушин Г.О., Романов А.Ю. Влияние SARS-COV-2 на репродукцию человека // Акушерство и гинекология, 2020. № 11. С. 6-12. [Dolgushin G.O., Romanov A.Yu. The influence of SARS-COV-2 on human reproduction. *Akusherstvo i ginekologiya = Obstetrics and Gynecology*, 2020, no. 11, pp. 6-12. (In Russ.)]
2. Долгушина Н.В., Драпкина Ю.С., Кречетова Л.В., Иванец Т.Ю., Менжинская И.В., Гус А.И., Байрамова Г.Р., Сухих Г.Т. Вакцина Гам-КОВИД-Вак (Спутник V) не оказывает негативного влияния на овариальный резерв у женщин репродуктивного возраста // Акушерство и гинекология, 2021. № 7. С. 81-86. [Dolgushina N.V., Drapkina Yu.S., Krechetova L.V., Ivanets T.Yu., Menzhinskaya I.V., Gus A.I., Bayramova G.R., Sukhikh G.T. The Gum-COVID-Vac vaccine (Sputnik V) does not have a negative effect on the ovarian reserve in women of reproductive age. *Akusherstvo i ginekologiya = Obstetrics and Gynecology*, 2021, Vol. 7, pp. 81-86. (In Russ.)]
3. Драпкина Ю.С., Долгушина Н.В., Шатылко Т.В., Николаева М.А., Менжинская И.В., Иванец Т.Ю., Кречетова Л.В., Красный А.М., Гамидов С.И., Байрамова Г.Р., Сухих Г.Т. Вакцина Гам-КОВИД-Вак (Спутник V) не оказывает негативного влияния на сперматогенез у мужчин // Акушерство и гинекология, 2021. № 7. С. 88-93. [Drapkina Yu.S., Dolgushina N.V., Shatylo T.V., Nikolaeva M.A., Menzhinskaya I.V., Ivanets T. Yu., Krechetova L.V., Krasny A.M., Gamidov S.I., Bayramova G.R., Sukhikh G.T. The Gum-COVID-Vac vaccine (Sputnik V) does not have a negative effect on spermatogenesis in men. *Akusherstvo i ginekologiya = Obstetrics and Gynecology*, 2021, no. 7, pp. 88-93. (In Russ.)]
4. Bentov Y., Beharier O., Moav-Zafir A., Kabessa M., Godin M., Greenfield C.S., Ketzinel-Gilad M., Broder E.A., Holzer H.E.G., Wolf D., Oiknine-Djian E., Barghouti I., Goldman-Wohl D., Yagel S., Walfisch A., Klement A.H. Ovarian follicular function is not altered by SARS-CoV-2 infection or BNT162b2 mRNA COVID-19 vaccination. *Hum. Reprod.*, 2021, Vol. 36, no. 9, pp. 2506-2513.
5. Bian H., Zheng Z.H., Wei D., Wen A., Zhang Z., Lian J.Q., Kang W.Z., Hao C.Q., Wang J., Xie R.H., Dong K., Xia J.L., Miao J.L., Kang W., Li G., Zhang D., Zhang M., Sun X.X., Ding L., Zhang K., Jia J., Ding J., Li Z., Jia Y., Liu L.N., Zhang Z., Gao Z.W., Du H., Yao N., Wang Q., Wang K., Geng J.J., Wang B., Guo T., Chen R., Zhu Y.M., Wang L.J., He Q., Yao R.R., Shi Y., Yang X.M., Zhou J.S., Ma Y.N., Wang Y.T., Liang X., Huo F., Wang Z., Zhang Y., Yang X., Zhang Y., Gao L.H., Wang L., Chen X.C., Tang H., Liu S.S., Wang Q.Y., Chen Z.N., Zhu P. Safety and efficacy of meplazumab in healthy volunteers and COVID-19 patients: a randomized phase 1 and an exploratory phase 2 trial. *Signal Transduct. Target Ther.*, 2021, Vol. 6, no. 1, 194. doi: 10.1038/s41392-021-00603-6.
6. Carp H.J.A., Selmi C., Shoenfeld Y. The autoimmune bases of infertility and pregnancy loss. *J. Autoimmun.*, 2012, Vol. 38, no. 2-3, pp. J266-J274.

7. Chen Y., Xu Z., Wang P., Li X.M., Shuai Z.W., Ye D.Q., Pan H.F. New-onset autoimmune phenomena post-COVID-19 vaccination. *Immunology*, 2022, Vol. 165, no. 4, pp. 386-401.
8. Cruz-Tapias P., Blank M., Anaya J.M., Shoenfeld Y. Infections and vaccines in the etiology of antiphospholipid syndrome. *Curr. Opin. Rheumatol.*, 2012, Vol. 24, no. 4, pp. 389-393.
9. Gonzalez D.C., Nassau D.E., Khodamoradi K., Ibrahim E., Blachman-Braun R., Ory J., Ramasamy R. Sperm parameters before and after COVID-19 mRNA vaccination. *JAMA*, 2021, Vol. 326, no. 3, pp. 273-274.
10. Hill L., Jeganathan V., Chinnasamy P., Grimaldi C., Diamond B. Differential roles of estrogen receptors α and β in Control of B-Cell maturation and selection. *Mol. Med.*, 2011, Vol. 17, no. 3-4, 211. doi: 10.2119/molmed.2010.00172.
11. Hori S., Nomura T., Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science*, 2003, Vol. 299, no. 5609, pp. 1057-1061.
12. Jones I., Roy P. Sputnik V COVID-19 vaccine candidate appears safe and effective. *Lancet*, 2021, Vol. 397, no. 10275, pp. 642-643.
13. Li K., Nowak R.A. The role of basigin in reproduction. *Reproduction*, 2020, Vol. 159, no. 2, pp. R97-R109.
14. Li M.-Y., Li L., Zhang Y., Wang X.-S. Expression of the SARS-CoV-2 cell receptor gene ACE2 in a wide variety of human tissues. *Infect. Dis. Poverty*, 2020, Vol. 9, no. 1, 45. doi: 10.1186/s40249-020-00662-x.
15. Logunov D.Y., Dolzhikova I.V., Shcheblyakov D.V., Tukhvatulin A.I., Zubkova O.V., Dzharullaeva A.S., Kovyrshina A.V., Lubenets N.L., Grousova D.M., Erokhova A.S., Botikov A.G., Izhaeva F.M., Popova O., Ozharovskaya T.A., Esmagambetov I.B., Favorskaya I.A., Zrelkin D.I., Voronina D.V., Shcherbinin D.N., Semikhin A.S., Simakova Y.V., Tokarskaya E.A., Egorova D.A., Shmarov M.M., Nikitenko N.A., Gushchin V.A., Smolyarchuk E.A., Zyryanov S.K., Borisevich S.V., Naroditsky B.S., Gintsburg A.L., Gam-COVID-Vac Vaccine Trial Group Safety and efficacy of an rAd26 and rAd5 vector-based heterologous prime-boost COVID-19 vaccine: an interim analysis of a randomised controlled phase 3 trial in Russia. *Lancet*, 2021, Vol. 397, no. 10275, pp. 671-681.
16. Meroni P.L. Autoimmune or auto-inflammatory syndrome induced by adjuvants (ASIA): old truths and a new syndrome? *J. Autoimmun.*, 2011, Vol. 36, no. 1, pp. 1-3.
17. Moulton V.R. Sex hormones in acquired immunity and autoimmune disease. *Front. Immunol.*, 2018, Vol. 9, 2279. doi: 10.3389/fimmu.2018.02279.
18. Nogrady B. Mounting evidence suggests Sputnik COVID vaccine is safe and effective. *Nature*, 2021, Vol. 595, no. 7867, pp. 339-340.
19. Nusinovici S., Seegers H., Joly A., Beaudeau F., Fourichon C. A side effect of decreased fertility associated with vaccination against bluetongue virus serotype 8 in Holstein dairy cows. *Prev. Vet. Med.*, 2011, Vol. 101, no. 1-2, pp. 42-50.
20. Orvieto R., Noach-Hirsh M., Segev-Zahav A., Haas J., Nahum R., Aizer A. Does mRNA SARS-CoV-2 vaccine influence patients' performance during IVF-ET cycle? *Reprod. Biol. Endocrinol.*, 2021, Vol. 19, no. 1, 69. doi: 10.1186/s12958-021-00757-6.
21. Panagiotou O.A., Befano B.L., Gonzalez P., Rodríguez A.C., Herrero R., Schiller J.T., Kreimer A.R., Schiffman M., Hildesheim A., Wilcox A.J., Wacholder S., Costa Rica HPV Vaccine Trial (CVT) Group (see end of manuscript for full list of investigators) Effect of bivalent human papillomavirus vaccination on pregnancy outcomes: long term observational follow-up in the Costa Rica HPV Vaccine Trial. *BMJ*, 2015, Vol. 351, h4358. doi: 10.1136/bmj.h4358.
22. Pellegrino P., Clementi E., Radice S. On vaccine's adjuvants and autoimmunity: Current evidence and future perspectives. *Autoimmun. Rev.*, 2015, Vol. 14, no. 10, pp. 880-888.
23. Pennell L.M., Galligan C.L., Fish E.N. Sex affects immunity. *J. Autoimmun.*, 2012, Vol. 38, no. 2-3, pp. J282-J291.
24. Perricone C., Colafrancesco S., Mazar R.D., Soriano A., Agmon-Levin N., Shoenfeld Y. Autoimmune/inflammatory syndrome induced by adjuvants (ASIA) 2013: Unveiling the pathogenic, clinical and diagnostic aspects. *J. Autoimmun.*, 2013, Vol. 47, pp. 1-16.
25. Radzikowska U., Ding M., Tan G., Zhakparov D., Peng Y., Wawrzyniak P., Wang M., Li S., Morita H., Altunbulakli C., Reiger M., Neumann A.U., Lunjani N., Traidl-Hoffmann C., Nadeau K.C., O'Mahony L., Akdis C., Sokolowska M. Distribution of ACE2, CD147, CD26, and other SARS-CoV-2 associated molecules in tissues and immune cells in health and in asthma, COPD, obesity, hypertension, and COVID-19 risk factors. *Allergy*, 2020, Vol. 75, no. 11, pp. 2829-2845.
26. Read K.A., Powell M.D., Sreekumar B.K., Oestreich K.J. *In vitro* Differentiation of Effector CD4⁺ T Helper Cell Subsets. *Methods Mol. Biol.*, 2019, Vol. 1960, pp. 75-84.

27. Recalde G., Moreno-Sosa T., Yúdica F., Quintero C.A., Sánchez M.B., Jahn G.A., Kalergis A.M., Mackern-Oberti J.P. Contribution of sex steroids and prolactin to the modulation of T and B cells during autoimmunity. *Autoimmun. Rev.*, 2018, Vol. 17, no. 5, pp. 504-512.
28. Sattler S. The role of the immune system beyond the fight against infection. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 2017, Vol. 1003, pp. 3-14.
29. Sciascia S., Radin M., Bazzan M., Montaruli B., Cosseddu D., Norbiato C., Bertero M.T., Carignola R., Bacco B., Cassarino S.G., Roccatello D. Antiphospholipid Antibodies and infection: non nova sed nove. *Front. Immunol.*, 2021, Vol. 12, 687534. doi: 10.3389/fimmu.2021.687534.
30. Segal L., Wilby O.K., Willoughby C.R., Veenstra S., Deschamps M. Evaluation of the intramuscular administration of Cervarix™ vaccine on fertility, pre- and post-natal development in rats. *Reprod. Toxicol.*, 2011, Vol. 31, no. 1, pp. 111-120.
31. Shoenfeld Y., Agmon-Levin N. "ASIA" – autoimmune/ inflammatory syndrome induced by adjuvants. *J. Autoimmun.*, 2011, Vol. 36, no. 1, pp. 4-8.
32. Stanley K.E., Thomas E., Leaver M., Wells D. Coronavirus disease-19 and fertility: viral host entry protein expression in male and female reproductive tissues. *Fertil. Steril.*, 2020, Vol. 114, no. 1, pp. 33-43.
33. Toplak N., Avčin T. Autoantibodies induced by vaccine. In: *Vaccines and Autoimmunity*. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc; 2015, pp. 93-102.
34. Wacholder S., Chen B.E., Wilcox A., Maccones G., Gonzalez P., Befano B., Hildesheim A., Rodriguez A.C., Solomon D., Herrero R., Schiffman M., CVT group. Risk of miscarriage with bivalent vaccine against human papillomavirus (HPV) types 16 and 18: pooled analysis of two randomised controlled trials. *BMJ*, 2010, Vol. 340, c712. doi: 10.1136/bmj.c712.
35. WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard. Available at: <https://covid19.who.int/>.
36. WHO. Status of COVID-19 Vaccines within WHO EUL/PQ evaluation process. Available at: https://extranet.who.int/pqweb/sites/default/files/documents/Status_COVID_VAX_02April2022.pdf.

Авторы:

Довгань А.А. — аспирант ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Драпкина Ю.С. — к.м.н., врач — акушер-гинеколог ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Долгушина Н.В. — д.м.н., профессор, заместитель директора — руководитель департамента организации научной деятельности ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Менжинская И.В. — д.м.н., ведущий научный сотрудник ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Authors:

Dovgan A.A., Postgraduate Student, V. Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology, Moscow, Russian Federation

Drapkina Yu.S., PhD (Medicine), Obstetrician-Gynecologist, V. Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology, Moscow, Russian Federation

Dolgushina N.V., PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Department of Organization of Scientific Activities, Deputy Director, V. Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology, Moscow, Russian Federation

Menzhinskaya I.V., PhD, MD (Medicine), Leading Research Associate, V. Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology, Moscow, Russian Federation

Инвиева Е.В. — к.м.н., старший научный сотрудник ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Вторушина В.В. — к.м.н., врач клинической лабораторной диагностики ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Кречетова Л.В. — д.м.н., заведующая лабораторией клинической иммунологии ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Сухих Г.Т. — д.м.н., профессор, академик РАН, директор ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Inviyeva E.V., PhD (Medicine), Senior Research Associate, V. Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology, Moscow, Russian Federation

Vtorushina V.V., PhD (Medicine), Doctor of Clinical Laboratory Diagnostics, V. Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology, Moscow, Russian Federation

Krechetova L.V., PhD, MD (Medicine), Head, Laboratory of Clinical Immunology, V. Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology, Moscow, Russian Federation

Sukhikh G.T., PhD, MD (Medicine), Professor, Full Member, Russian Academy of Sciences, Director, V. Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology, Moscow, Russian Federation

Поступила 12.05.2022
Принята к печати 22.05.2022

Received 12.05.2022
Accepted 22.05.2022

ТРАНСФОРМИРУЮЩИЙ ФАКТОР РОСТА $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) У ПАЦИЕНТОВ С ЭНДОКРИННОЙ ОФТАЛЬМОПАТИЕЙ И БОЛЕЗНЬЮ ГРЕЙВСА – ПРЕДИКТОР ЭФФЕКТИВНОСТИ ЛЕЧЕНИЯ?

Свириденко Н.Ю., Бессмертная Е.Г., Беловалова И.М.,
Шеремета М.С., Бабаева Д.М., Малышева Н.М., Трошина Е.А.,
Мельниченко Г.А.

ФГБУ «Научный медицинский исследовательский центр эндокринологии» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Резюме. Существующие терапевтические подходы к лечению эндокринной офтальмопатии (ЭОП) основываются на неспецифической иммуносупрессии глюкокортикоидами (ГК) и лучевой терапии орбит. При этом часть пациентов остаются резистентными к лечению. В предыдущем исследовании мы выявили высокие уровни солибилизированных рецепторов цитокинов: sTNF α -R1, sTNF α -R2, sIL-2R и цитокина TGF- $\beta 1$ у пациентов с длительно существующей нелеченой ЭОП и болезнью Грейвса (БГ) в состоянии эутиреоза. Уровень TGF- $\beta 1$ был значимо выше у пациентов с ЭОП по сравнению со здоровыми лицами и повышался с увеличением длительности ЭОП, что свидетельствовало об активации регуляторного звена иммунной системы, направленной на супрессию аутоиммунного процесса.

Целью настоящей работы явилось исследование динамики TGF- $\beta 1$ и рецепторов цитокинов: sTNF α -R1, sTNF α -R2, sIL-2R на фоне проведения иммуносупрессивной терапии высокими дозами ГК как возможных предикторов эффективности лечения.

В исследование были включены 49 пациентов (98 орбит) с БГ в состоянии эутиреоза и субклинического тиреотоксикоза и ЭОП в активной фазе, не получавших ранее лечения по поводу ЭОП. Определены концентрации цитокина TGF- $\beta 1$, sTNF α -R1 и sTNF α -R2, sIL-2R, антител к рецептору тиреотропного гормона (рТТГ), свободных фракций тироксина (свТ4) и трийодтиронина (свТ3), ТТГ в сыворотке крови. Выполнено ультразвуковое исследование щитовидной железы (УЗИ ЩЖ), мультиспиральная компьютерная томография (МСКТ) / магнитно-резонансная томография (МРТ) орбит. Пациентам была назначена иммуносупрессивная терапия высокими дозами ГК (метилпреднизолоном) в режиме пульс-терапии, в стандартной дозировке 4500–8000 мг с учетом тяжести и активности клинических проявлений ЭОП. Обследование проводилось через 3, 6, 12 месяцев от начала лечения.

Через 3 и 6 месяцев от начала введения ГК резистентными к лечению оставались более 30% пациентов. У пациентов с положительной динамикой ЭОП уровень TGF- $\beta 1$ существенно не изменился. У пациентов, резистентных к лечению ГК, уровень TGF- $\beta 1$ достоверно снизился по сравнению с

Адрес для переписки:

Свириденко Наталья Юрьевна
ФГБУ «Научный медицинский исследовательский центр
эндокринологии» Министерства здравоохранения РФ,
117036, Россия, Москва, ул. Дм. Ульянова, 11.
Тел./факс: 8 (916) 435-54-93.
E-mail: natsvir@inbox.ru

Address for correspondence:

Sviridenko Natalya Yu.
Medical Research Centre of Endocrinology
117036, Russian Federation, Moscow, D. Ulyanov str., 11.
Phone: 7 (916) 435-54-93.
E-mail: natsvir@inbox.ru

Образец цитирования:

Н.Ю. Свириденко, Е.Г. Бессмертная, И.М. Беловалова,
М.С. Шеремета, Д.М. Бабаева, Н.М. Малышева,
Е.А. Трошина, Г.А. Мельниченко «Трансформирующий
фактор роста $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) у пациентов с эндокринной
офтальмопатией и болезнью Грейвса – предиктор
эффективности лечения?» // Медицинская
иммунология, 2022. Т. 24, № 5. С. 993–1006.
doi: 10.15789/1563-0625-TGF-2514
© Свириденко Н.Ю. и соавт., 2022

For citation:

N.Yu. Sviridenko, E.G. Bessmertnaya, I.M. Belovalova,
M.S. Sheremeta, D.M. Babaeva, N.M. Malysheva,
E.A. Troshina, G.A. Melnichenko “Transforming growth factor
 $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) in patients with endocrine ophthalmopathy and
Graves’ disease: A predictor of treatment efficiency?”, *Medical
Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2022,
Vol. 24, no. 5, pp. 993–1006.
doi: 10.15789/1563-0625-TGF-2514
DOI: 10.15789/1563-0625-TGF-2514

пациентами с положительной динамикой. Уровень sTNFR1, sTNF α -R2 существенно не изменился. Достоверных отличий уровней антител к рТТГ, тиреоидных гормонов у пациентов резистентных к лечению ГК и с положительной динамикой не отмечено.

Иммуносупрессивная терапия высокими дозами метилпреднизолона в режиме пульс-терапии показала высокую эффективность и хорошую переносимость, при этом часть пациентов остаются резистентными к лечению. Более низкие показатели цитокина TGF- β 1 исходно и в процессе лечения позволяют использовать TGF- β 1 в качестве биомаркера активности процесса, эффективности лечения и прогноза заболевания. Активация TGF- β 1, как фактора роста фибробластов, может способствовать развитию фиброза, косоглазия и диплопии.

Ключевые слова: болезнь Грейвса, эндокринная офтальмопатия, цитокины, антитела, глюкокортикоиды

TRANSFORMING GROWTH FACTOR β 1 (TGF- β 1) IN PATIENTS WITH ENDOCRINE OPHTHALMOPATHY AND GRAVES' DISEASE: A PREDICTOR OF TREATMENT EFFICIENCY?

Sviridenko N.Yu., Bessmertnaya E.G., Belovalova I.M.,
Sheremeta M.S., Babaeva D.M., Malysheva N.M., Troshina E.A.,
Melnichenko G.A.

Medical Research Centre of Endocrinology, Moscow, Russian Federation

Abstract. Current therapeutic approaches to the treatment of endocrine ophthalmopathy (EOP) are based on nonspecific immunosuppression with glucocorticosteroids (GCs) and radiation therapy of the eye orbits. However, some patients exhibit resistance to the treatment. In a previous study, we have detected high levels of soluble cytokine receptors: sTNF α -R1, sTNF α -R2, sIL-2R, and the TGF- β 1 cytokine in euthyroid patients with long-lasting non-treated EOP and Graves' disease (GD). TGF- β 1 level was significantly higher in the patients with EOP compared to healthy individuals, and increased with prolonged EOP duration, thus suggesting activation of the factors regulating immune system which promote suppression of the autoimmune process. The aim of this work was to study the dynamics of TGF- β 1 and cytokine receptors: sTNF α -R1, sTNF α -R2, sIL-2R in the course of immunosuppressive therapy with high doses of GCs, as possible predictors of treatment efficacy. The study included 49 patients (98 eye orbits) with GD of euthyroid state and subclinical thyrotoxicosis, and the persons with EOP in active phase, who had not previously treatment for EOP. Concentrations of TGF- β 1 cytokine, sTNF α -R1 and sTNF α -R2, sIL-2R, antibodies to the thyroid-stimulating hormone receptor (rTSH), free fractions of thyroxine (fT4) and triiodothyronine (fT3), TSH in blood serum were determined in blood serum. Ultrasound examination of the thyroid gland (ultrasound of the thyroid gland), multi-layer computed tomography (MSCT)/magnetic resonance imaging (MRI) of the orbits were also performed. The patients were administered immunosuppressive therapy with high doses of GCs (methylprednisolone) in the course of pulse therapy, at a standard dosage of 4500-8000 mg, taking into account the severity and activity of the EOP clinical manifestations. The examination was carried out 3, 6, 12 months after starting the treatment. 3 and 6 months after the GC administration, more than 30% of patients remained resistant to treatment. The levels of TGF- β 1 did not change significantly in the patients with positive EOP dynamics. In the patients resistant to GC treatment, the level of TGF- β 1 was significantly decreased compared with patients who showed positive clinical dynamics. The level of sNFR1 and sNFaR2 did not change significantly. There were no significant differences in the levels of antibodies to rTSH, thyroid hormones in the patients resistant to GC treatment and with positive dynamics.

Immunosuppressive therapy with high-dose of methylprednisolone in pulse therapy regimen showed high efficacy and good tolerability, while some patients remain resistant to treatment. Lower levels of TGF- β 1 cytokine at initial time and during the treatment allow usage of TGF- β 1 levels as a biomarker of the activity of the process, treatment efficiency, and prognosis of the disease. Activation of TGF- β 1, a fibroblast growth factor, may contribute to the development of fibrosis, strabismus, and diplopia.

Keywords: Graves' disease, endocrine ophthalmopathy, cytokines, antibodies, glucocorticoids

Данная работа выполнена в соответствии с планом государственного задания. Регистрационный номер АААА-А20-120011790180-4. Эпидемиологические и молекулярно-клеточные характеристики опухолевых, аутоиммунных и йододефицитных тиреопатий, как основа профилактики осложнений и персонализации лечения.

Введение

В настоящее время орбитальные фибробласты рассматриваются как основная мишень для аутоиммунной атаки при ЭОП [8, 9, 10, 11, 12, 13, 14]. Под действием про- и противовоспалительных цитокинов орбитальные фибробласты взаимодействуют с активированными аутореактивными иммунными клетками, присутствующими в орбите. Результатом является продукция гликозаминогликанов (ГАГ), пролиферация и дифференцировка орбитальных фибробластов в миофибробласты и адипоциты, секреция цитокинов и хемокинов, развитие фиброза, особенно на поздних стадиях заболевания [25]. Существующие терапевтические подходы к лечению ЭОП основываются на неспецифической иммуносупрессии глюкокортикоидами (ГК) и лучевой терапии орбит. При этом часть пациентов остаются резистентными к лечению.

В предыдущем исследовании [1] мы выявили высокие уровни солибилизованных рецепторов цитокинов: sTNF α -R1, sTNF α -R2, sIL-2R и цитокина TGF- β 1 у пациентов с длительно существующей нелеченой ЭОП и болезнью Грейвса (БГ) в состоянии эутиреоза.

Уровень TGF- β 1 был значимо выше у пациентов с ЭОП по сравнению со здоровыми лицами ($p = 0,0001$) и повышался с увеличением длительности ЭОП ($p = 0,041$, $p \leq 0,05$), что свидетельствовало об активации регуляторного звена иммунной системы, направленной на супрессию аутоиммунного процесса.

Целью настоящей работы явилось исследование динамики TGF- β 1 и растворимых рецепторов цитокинов: sTNF α -R1, sTNF α -R2, sIL-2R на фоне проведения иммуносупрессивной терапии высокими дозами ГК как возможных предикторов эффективности лечения.

Материалы и методы

Дизайн исследования

Проведено обсервационное, одноцентровое, проспективное, контролируемое исследование.

Критерии соответствия

В исследование были включены пациенты с БГ и ЭОП, верифицированными по междуна-

родным стандартам диагностики [9]. Объектом исследования являлся пациент и его глаза. Учитывая то, что у одного и того же пациента глаза имеют разную степень выраженности клинических симптомов ЭОП, обработка результатов исследования проводилась отдельно для каждого глаза (шкала клинической активности — CAS) и каждой орбиты — МСКТ/МРТ. Тяжесть и активность ЭОП оценивались по наиболее пораженному глазу. Критериями исключения были пациенты, получавшие ранее системную глюкокортикоидную или лучевую терапию орбит, имевшие сопутствующие аутоиммунные заболевания, сопутствующие хронические инфекционные заболевания, перенесенные вирусные заболевания в течение последних 3 месяцев, беременные и кормящие женщины.

Условия проведения

Исследование проводилось в ФГБУ «НМИЦ эндокринологии» Минздрава РФ в отделе терапевтической эндокринологии.

Продолжительность исследования

Включение пациентов в исследование проведено в 2020–2021 гг.

Описание медицинского вмешательства

Всем пациентам проводились общеклиническое обследование со сбором анамнеза, физикальное обследование, определение уровня ТТГ, свТ4, свТ3, антител к рТТГ, УЗИ ЩЖ с применением цветовой доплерографии. Всем пациентам было выполнено стандартное офтальмологическое исследование на базе отделения диабетической ретинопатии и офтальмохирургии ФГБУ «НМИЦ эндокринологии» Минздрава России (ЭНЦ) (зав. отд. д.м.н. Липатов Д.В.): визометрия, определение уровня внутриглазного давления, биомикроскопия переднего отдела глаза, экзофтальмометрия, компьютерная периметрия, биомикроскопия хрусталика и стекловидного тела с помощью щелевой лампы, обратная и прямая офтальмоскопия; визуализация орбит — МСКТ/МРТ. Диагноз ЭОП верифицировали соответственно рекомендациям EUGOGO [9, 27]. Тяжесть ЭОП оценивалась по классификации NOSPECS [9, 27]. Активность ЭОП оценивалась по шкале клинической активности CAS [9, 27].

Основной исход исследования

Проводилось оценка клинических симптомов, определение антител к рТТГ, цитокинов и их растворимых рецепторов в динамике пульс-терапии метилпреднизолоном.

Анализ в подгруппах

Для проведения исследования были сформированы группы до лечения и в разные сроки про-

ведения пульс-терапии метилпреднизолоном (3, 6, 12 месяцев)

Методы регистрации исходов

Содержание TGF- β 1 в образцах сыворотки определяли с помощью коммерческих наборов фирмы BenderMedSystems GmbH (Австрия), sTNF α -R2 — наборами R&Dsystems (США-Канада). Все вышеуказанные исследования выполняли методом иммуноферментного анализа, измерение оптической плотности проводили на счетчике 1420 Multilabel Counter VICTOR2 (Perkin Elmer). Оценку функции ЩЖ — уровень ТТГ, свТЗ, свТ4 — определяли методом усиленной хемилюминесценции на автоматическом анализаторе Architect (Abbott Diagnostics, США). Референсные значения для базального ТТГ 0,25–3,5 мМЕ/л, свТ4 9,0–20,0 пмоль/л, свТЗ 2,5–5,5 пмоль/л. Антитела к рТТГ (референсные значения 0,00–1,75 МЕ/л) определяли методом электрохемилюминесцентного анализа на иммунохимическом автоматическом анализаторе Cobas 6000 (Roche Diagnostics, Германия). Лабораторные исследования проводили на базе клинико-диагностической лаборатории ФГБУ «НМИЦ эндокринологии» МЗ РФ (зав. лаб., к.м.н. Никанкина Л.В.).

УЗИ ЩЖ выполнено на ультразвуковом сканере Toshiba Aplio 790 датчиком переменной частоты 7,5–10 МГц с применением цветовой доплерографии на базе отделения ультразвуковой диагностики ЭНЦ (зав., к.м.н. Солдатова Т.В.). МСКТ и МРТ орбит проводились в отделе лучевой диагностики ЭНЦ (зав. д.м.н. Воронцов А.В.) на 64-срезовом компьютерном томографе Optima CT660 (GE Healthcare) и магнитно-резонансном томографе Optima MR450w 1.5T (GE Healthcare) со сканированием в автоматическом режиме. Принимая во внимание возможность разной выраженности патологического процесса в обеих орбитах, каждую орбиту оценивали отдельно в 3 проекциях: аксиальной, корональной, сагиттальной [6].

Этическая экспертиза

Работа одобрена локальным Этическим комитетом при ФГБУ «НМИЦ эндокринологии» Минздрава РФ. Протокол заседания локального этического комитета № 17 от 27.09.2018 г.

Статистический анализ

Статистическая обработка данных выполнена на персональном компьютере с использованием пакета программ статистического анализа данных Statistica 6.13 (StatSoft Inc., США) и приложения Microsoft Excel for Windows. Для количественных признаков рассчитывались: средние, минимальные и максимальные значения, стандартные от-

клонения (полученные результаты представлены в виде $M \pm SD$, где M — среднее арифметическое значение, SD — стандартное отклонение), либо медиана и квартили — $Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})$. Анализ межгрупповых различий при нормальном распределении признака проводился с использованием t-критерия Стьюдента. Для сравнения независимых выборок при распределении признака, отличавшегося от нормального, использовался критерий Манна–Уитни–Уилкоксона. Критический уровень значимости при проверке статистических гипотез принимался равным 0,05 ($p < 0,05$).

Результаты

Участники исследования

В исследование были включены 49 пациента (98 орбит), в активной фазе ЭОП и БГ, верифицированные по международным стандартам диагностики, не получавшие ранее лечения по поводу ЭОП. Средний возраст составил $48,8 \pm 12,3$ года в диапазоне от 25 до 70 лет, 38 женщин, 14 мужчин. До поступления в отделение пациенты уже принимали тиреостатики и имели показатели эутиреоза и субклинического тиреотоксикоза. В хронологическом порядке у 30,8% пациентов симптомы ЭОП и БГ развились одновременно, у 11,5% — ЭОП манифестировала первой, до появления симптомов тиреотоксикоза, у 57,7% — первой манифестировала БГ, промежуток до появления симптомов ЭОП варьировал от 2 до 72 мес. Продолжительность ЭОП до поступления в отделение в среднем составила $8,8 \pm 1,5$ мес. и варьировала от 1 до 48 мес. Длительность лечения тиреотоксикоза до госпитализации составила $16,1 \pm 2,3$ мес. (от 1 до 60 мес.). Средний показатель CAS ($M \pm SD$) составил $4,07 \pm 0,8$ баллов. Легкую степень имели 4,6%, среднюю 62,8%, тяжелую 32,6%. На снижение зрения жаловались 53,5%, оптическую нейропатию имели 30,2% пациентов. Отмечался высокий уровень диплопии (60%) и косоглазия (41,4%) с максимальным ограничением движения глазодвигательных мышц (ГДМ) от 0 до 35° у 65%. У 44,4% отмечался апикальный синдром по данным МСКТ/МРТ. Клиническая и офтальмологическая характеристики пациентов с эндокринной офтальмопатией и БГ до и на фоне проведения пульс-терапии метилпреднизолоном представлены в таблице 1.

Основные результаты исследования

По результатам исследования назначена пульс-терапия ГК (метилпреднизолоном) в стандартной дозе 4500–8000 мг с учетом тяжести и активности клинических проявлений ЭОП [9].

ТАБЛИЦА 1. КЛИНИЧЕСКАЯ И ОФТАЛЬМОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКИ ПАЦИЕНТОВ С ЭНДОКРИННОЙ ОФТАЛЬМОПАТИЕЙ И БГ ДО И ЧЕРЕЗ 3, 6, 12 МЕСЯЦЕВ ОТ НАЧАЛА ПРОВЕДЕНИЯ ПУЛЬС-ТЕРАПИИ МЕТИЛПРЕДНИЗОЛОНОМ

TABLE 1. CLINICAL AND OPHTHALMOLOGICAL CHARACTERISTICS OF PATIENTS WITH ENDOCRINE OPHTHALMOPATHY AND GRAVES' DISEASE PRIOR TO METHYLPREDNISOLONE PULSE THERAPY AND 3, 6, AND 12 MONTHS FOLLOWING THE START DATE THEREOF

	Время (мес.) Time (months)			
	0	3	6	12
Количество пациентов / глаз Patients/eyes seen	49/98	32/64	26/52	21/42
CAS (M±SD)	4,07±0,80	1,66±1,23 p = 0,000 (0 мес.)* (0 months)*	2,1±1,4 p = 0,002 (0 мес.)* (0 months)*	0,7±0,3 p = 0,000 (0 мес.)* (0 months)*
Тяжесть легкая /средняя /тяжелая в % Severity mild/moderate/high, %	4,6/62,8/32,6	6,25/81,25/12,5	3,8/76,9/19,2	14,3/61,9/23,8
ИМТ BMI	24,9±5,3	26,2±5,8	28,4±4,3	36,9±23,7
Глазные симптомы Ocular symptoms				
Боли Pains	48,8%	12,9%	7,7%	0%
Краснота век Red eyelids	27,9%	9,7%	11,5%	0%
Краснота конъюнктивы Red conjunctiva	90,7%	64,5%	50%	33,3%
Отек Oedema	93%	35,5%	47,4%	38,1%
Хемоз Chemosis	79%	32,3%	22%	14,3%
Краснота слез. мясца, плики Red caruncula lacrimalis, red plica	39,6%	21,0%	16,6%	4,8%
Лагофталм Lagophthalmos (M±SD)	37,8% 2,1±0,8	16,6% 1,5±0,8	16,6% 1,75±0,28	14,2% 1,0±0,5
Диплопия /косоглазие Diplopia/strabismus	60%/41,4%	54,2%/34,8%	44,4%/22,2%	47,6%/28,6

Таблица 1 (продолжение)
Table 1 (continued)

	Время (мес.) Time (months)			
	0	3	6	12
Движение (максимальное ограничение 0-35°) Movement (maximum limitation 0-35°)	22,7%	14,3%	11,1%	23,8%
Снижение зрения / оптическая нейропатия Sight deterioration / optical neuropathy	53,5%/30,2%	13,3%/12,9%	11,1%/11,1%	9,5%/9,5%
Апикальный синдром (МСКТ) Apical syndrome (multi-slice spiral CT)	44,2%	33,3%	29,6%	14,2%
Ширина глазной щели мм Eye fissure width, mm (M±SD)	10,8±2,5	9,95±1,40	9,67±1,29	10,60±1,16
Экзофтальмометрия Exophthalmometry (M±SD)	21,10±2,86	20,6±2,6	21,2±3,7	21,80±3,86
Внутриглазное давление Intraocular pressure (M±SD)	22,7±7,7	19,00±4,24	19,1±3,2	20,50±3,68
Доза (мг) метилпреднизолона Methylprednisolone dose, mg (M±SD)		6241,4±1418,1	6813,9±2397,3	7478,1±2316,8
Эффект есть / отсутствует Effect: positive / none		21/11 чел. 21/11 patients 65,6%/34,4%	17/9 чел. 17/9 patients 65,4%/34,6%	21 чел. 100% – неактивная фаза 21 patients 100% – inactive phase
Оперативное лечение Orbital bone decompression		2 чел. – костная декомпрессия 2 patients had bone decompression	1 чел. – костная декомпрессия 1 patient had bone decompression	5 чел. – реконструктивная хирургия 5 patients had replacement surgery
Щитовидная железа Thyroid gland				
Антитела к рТТГ, МЕ/л TSHR antibodies, IU/L	14,0±13,3	5,08±6,58 p = 0,000, p < 0,001 (0 мес.)* (0 months)*	8,06±11,10 p = 0,002, p < 0,05 (0 мес.)* (0 months)*	8,60±14,46 p = 0,045, p < 0,05 (0 мес.)* (0 months)*
ТТГ, мМЕ/л TSH, mIU/L (M±SD)	1,8±3,3	2,9±1,8 p = 0,345 (0 мес.)* (0 months)*	1,60±1,45 p = 0,394 (0 мес.)* (0 months)*	2,27±1,93 p = 0,324 (0 мес.)* (0 months)*

Таблица 1 (окончание)
Table 1 (continued)

	Время (мес.) Time (months)			
	0	3	6	12
свТ4 пмоль/л Free T4, pmol/L (M±SD)	12,1±3,1	10,6±3,8 p = 0,463 (0 мес.)* (0 months)*	13,49±2,86 p = 0,247 (0 мес.)* (0 months)*	12,96±2,14 p = 0,893 (0 мес.)* (0 months)*
свТ3, пмоль/л Free T3, pmol/L (M±SD)	5,47±2,77	3,93±1,00 p = 0,020, p < 0,05 (0 мес.)* (0 months)*	4,7±1,0 p = 0,091 (0 мес.)* (0 months)*	4,24±0,80 p = 0,089 (0 мес.)* (0 months)*
Цитокины Cytokines				
TGF-β1, пг/мл Me (Q _{0,25} -Q _{0,75}) TGF-β1, pg/mL Me (Q _{0,25} -Q _{0,75})	20642,0 17416,2:31750,1	19854,1 13808,7:31064,5 p = 0,569 (0 мес.)* (0 months)*	22563,5 14709,1:28056,5 p = 0,602 (0 мес.)* (0 months)*	20434,0 16916,0:25573,0 p = 0,495, (0 мес.)* (0 months)*
sTNFα-R1, пг/мл Me (Q _{0,25} -Q _{0,75}) sTNFα-R1, pg/mL Me (Q _{0,25} -Q _{0,75})	1403,5 993,5:1880,1	1253,8 1013,3:1738,6 p = 0,207 (0 мес.)* (0 months)*	1434,7 1077,7:1930,6 p = 0,949 (0 мес.)* (0 months)*	1014,0 866,0:1706,8 p = 0,091 (0 мес.)* (0 months)*
sTNFα-R2, пг/мл Me (Q _{0,25} -Q _{0,75}) sTNFα-R2, pg/mL Me (Q _{0,25} -Q _{0,75})	2889,5 2172,3:3136,2	2517,4 2151,4:2972,1 p = 0,426 (0 мес.)* (0 months)*	2713,9 2289,5:3032,0 p = 0,810 (0 мес.)* (0 months)*	2595,7 2084:3107,8 p = 0,689 (0 мес.)* (0 months)*
sIL-2R, пг/мл Me (Q _{0,25} -Q _{0,75}) (M±SD) sIL-2R, pg/mL Me (Q _{0,25} -Q _{0,75}) (M±SD)	198,9 90,5:280,9	119,5 77,5:216,6 p = 0,014 (0 мес.)* (0 months)*	129,0 77,5:213,6 p = 0,003 (0 мес.)* (0 months)*	156,5 88,3:242,3 p = 0,231 (0 мес.)* (0 months)*

Примечание. В скобках (*) 0 мес. – сравнение с исходными данными.

Note. In parentheses (*) 0 months, comparison with the original data.

Исследования проведены через 3, 6, 12 месяцев от начала проведения пульс-терапии ГК. Сравнительный анализ проводился только в группе пациентов, продолжающих наблюдение. Эффективность лечения оценивалась по клиническим данным с учетом CAS и NOSPECS. При ухудшении течения ЭОП пульс-терапия была продолжена в суммарной дозе 7478,1±2316,8 мг к 12 месяцам наблюдения (с максимальной дозой 11 000 мг у одной пациентки, направленной на костную декомпрессию в связи с прогрессированием ЭОП).

Через 3 месяца отмечена положительная динамика большинства глазных симптомов, снижение активности по CAS, улучшение зрения, снижение уровня антител к рТТГ, снижение внутриглазно-

го давления, величины лагофталма, улучшение подвижности глазных яблок. В меньшей степени изменились показатели экзофтальмометрии, диплопии и косоглазия. Двое пациентов, в связи с нарастанием симптомов оптической нейропатии были направлены на костную декомпрессию орбит. При анализе цитокинов и их рецепторов достоверного изменения уровня TGF-β1, sTNF R1, sTNFα R2 не отмечено. Уровень sIL-2R достоверно снизился через 3 и 6 месяцев лечения.

Мы проанализировали уровень цитокинов у пациентов с положительной динамикой глазных симптомов после проведения пульс терапии ГК (22 пац.) и у пациентов без динамики или с ухудшением ЭОП (10 пац.) (табл. 2).

ТАБЛИЦА 2. ДИНАМИКА ЦИТОКИНОВ TGF- β 1, sTNF-R1, sTNF α -R2, sIL-2R ЧЕРЕЗ 3 МЕСЯЦА ЛЕЧЕНИЯ МЕТИЛПРЕДНИЗОЛОНОМ

TABLE 2. CHANGES IN TGF- β 1, sTNF α -R1, sTNF α -R2, AND sIL-2R LEVELS AFTER 3 MONTHS OF TREATMENT WITH METHYLPREDNISOLONE

	Положительная динамика 22 пациента Improvements n = 22		Нет динамики, ухудшение 10 пациентов No improvements, deterioration n = 10	
Время (мес.) Time (months)	0 мес. 0 months	3 мес. 3 months	0 мес. 0 months	3 мес. 3 months
TGF- β 1, пг/мл Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$) TGF- β 1, pg/mL Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)	23454,3 17707,5:36000	23899,5 15723,1:31392,2 p = 0,485 (0 мес. +)* (0 months +)*	19336,7 13637,2:23742,3 p = 0,085 (0 мес. +)* (0 months +)*	13888,5 12700,0:16322,7 p = 0,036, p < 0,05 (3 мес. +)** (3 months +)**
sTNF α -R1, пг/мл Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$) sTNF α -R1, pg/mL Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)	1485,5 972,5:1747,8	1386,7 1013,3:1738,6 p = 0,375 (0 мес. +)* (0 months +)*	1674,8 1186,7:2573,9 p = 0,256 (0 мес. +)* (0 months +)*	1425,5 1216,3:1990,95 p = 0,173 (3 мес. +)** (3 months +)**
sTNF α -R2, пг/мл Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$) sTNF α -R2, pg/mL Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)	2941,1 2415,2:3150,3	2679,5 2381,1:3175,9 p = 0,426 (0 мес. +)* (0 months +)*	2684,7 2060,2:3150,3 p = 0,426 (0 мес. +)* (0 months +)*	2724,5 2381,1:3175,9 p = 0,507 (3 мес. +)** (3 months +)**
sIL-2R, пг/мл Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$) sIL-2R, pg/mL Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)	192,9 102,9:2614,7	129,0 77,5:213,1,6 p = 0,025 (0 мес. +)* (0 months +)*	168,8 86,8:321,1 p = 0,432, (0 мес. +)* (0 months +)*	144,3 70,9:284,9 p = 0,239 (3 мес. +)** (3 months +)*

Примечание. В скобках (*) 0 мес. + – сравнение с исходными данными пациентов с положительной динамикой ЭОП; (**) 3 мес. + – сравнение с данными пациентов с положительной динамикой ЭОП через 3 месяца.

Note. In parentheses (*) 0 months +, comparison with the initial data of patients with positive dynamics of EOP; (**) 3 months +, comparison with the data of patients with positive dynamics of EOP after 3 months.

У пациентов с положительной динамикой ЭОП уровень TGF- β 1 через 3 месяца существенно не изменился. У пациентов, резистентных к лечению ГК, уровень TGF- β 1 достоверно снизился по сравнению с пациентами с положительной динамикой – 13888,5 и 23454,3 соответственно (p = 0,036 p < 0,05). Уровень TGF- β 1 до лечения у пациентов, резистентных к лечению ГК, был ниже, по сравнению с пациентами, ответившими на лечение – 19336,7 и 23454,3 соответственно, но не достигал уровня статистической достоверности. Уровень солибилизованных рецепторов цитокинов: sTNF-R1, sTNF α -R2 существенно не изменился. Уровень sIL-2R у пациентов с положительной динамикой достоверно снизился. Достоверных отличий уровней антител к рТТГ, тиреоидных гормонов не отмечено.

Мы также проанализировали уровень цитокинов у пациентов с положительной динамикой глазных симптомов через 6 месяцев после проведения пульс терапии ГК (17 пац.) и у пациентов без динамики или с ухудшением ЭОП (9 пац.) (табл. 3). Через 6 месяцев продолжали снижаться основные симптомы активности ЭОП, но сохранялась величина лагофталма, ширины глазной щели, показатели экзофтальмометрии, внутриглазного давления, диплопии и косоглазия, апикальный синдром по данным МСКТ орбит. Пациенты продолжали принимать тиреостатики и находились в состоянии эутиреоза.

У пациентов, резистентных к лечению ГК, уровень TGF- β 1 также был достоверно ниже через 6 месяцев, по сравнению с пациентами с положительной динамикой. Уровень TGF- β 1 до

ТАБЛИЦА 3. ДИНАМИКИ ЦИТОКИНОВ TGF- β 1, sTNF-R1, sTNF α -R2, sIL-2R ЧЕРЕЗ 6 МЕСЯЦЕВ ЛЕЧЕНИЯ МЕТИЛПРЕДНИЗОЛОНОМ

TABLE 3. CHANGES IN TGF- β 1, sTNF α -R1, sTNF α -R2, AND sIL-2R LEVELS AFTER 6 MONTHS OF TREATMENT WITH METHYLPREDNISOLONE

	Положительная динамика 17 пациента Improvements n = 17		Нет динамики, ухудшение 9 пациентов No improvements, deterioration n = 9	
Время (мес.) Time (months)	0 мес. 0 months	6 мес. 6 months	0 мес. 0 months	6 мес. 6 months
TGF- β 1, пг/мл Me (Q _{0,25} -Q _{0,75}) TGF- β 1, pg/mL Me (Q _{0,25} -Q _{0,75})	27938,1 14244,6:37931,1	27660,6 23618,1:34700,0 p = 0,794 (0 мес. +)* (0 months +)*	19034,3 12637,2:23742,3 p = 0,085 (0 мес. +)* (0 months +)*	16717,0 12034,4:211154 p = 0,020, p < 0,05 (6 мес. +)** (6 months +)**
sTNF α -R1, пг/мл Me (Q _{0,25} -Q _{0,75}) sTNF α -R1, pg/mL Me (Q _{0,25} -Q _{0,75})	1576,4 972,4:1943,7	1359,5 1077,7:1757,2 p = 0,981 (0 мес. +)* (0 months +)*	1563,0 1216,3:1623,4 p = 0,5939 (0 мес. +)* (0 months +)*	1728,9 1258,5:1936,6 p = 0,374 (6 мес. +)** (6 months +)**
sTNF α -R2, пг/мл Me (Q _{0,25} -Q _{0,75}) sTNF α -R2, pg/mL Me (Q _{0,25} -Q _{0,75})	2855,7 2142,6:3150,2	2515,3 2289,5:2884,8 p = 0,434 (0 мес. +)* (0 months +)*	2232,2 1952,6:2696,9 p = 0,678 (0 мес. +)* (0 months +)*	3032,5 2371,5:3518,9 p = 0,260 (6 мес. +)** (6 months +)**
sIL-2R, пг/мл Me (Q _{0,25} -Q _{0,75}) sIL-2R, pg/mL Me (Q _{0,25} -Q _{0,75})	133,4 85,0:247,8	111,5 81,4:154,5 p = 0,285, (0 мес. +)* (0 months +)*	170,1 81,1:300,1 p = 0,326, (0 мес. +)* (0 months +)*	194,6 108,1:300,2 p = 0,400 (6 мес. +)** (6 months +)**

Примечание. В скобках (*) 0 мес. + – сравнение с исходными данными пациентов с положительной динамикой ЭОП; (**) 6 мес. + – сравнение с данными пациентов с положительной динамикой ЭОП через 6 месяцев.

Note. In parentheses (*) 0 months +, comparison with the initial data of patients with positive dynamics of EOP; (**) 6 months +, comparison with the data of patients with positive dynamics of EOP after 6 months.

ТАБЛИЦА 4. ПОБОЧНЫЕ ЭФФЕКТЫ ТЕРАПИИ МЕТИЛПРЕДНИЗОЛОНОМ

TABLE 4. SIDE EFFECTS OF TREATMENT WITH METHYLPREDNISOLONE

Побочные эффекты Side effect	Частота развития, % Frequency, %
Прибавка в весе / Weight gain	33,3%
Нарушение углеводного обмена / Carbohydrate metabolism disorder	33,3%
Кушингоид / Cushingoid	14,3%
Артериальная гипертензия / Arterial hypertension	13,8%
Желудочно-кишечные расстройства / Abdominal disorders	19,0%
Повышение трансаминаз / Higher levels of transaminases	9,5%
Инфекции мочевых путей / Urinary tract infections	4,8%
Депрессия / Depression	4,8%
Бессонница / Insomnia	9,5%

лечения у пациентов, резистентных к лечению ГК, был ниже, по сравнению с пациентами, ответившими на лечение, но не достигал уровня статистической достоверности. Уровень солибилизированных рецепторов цитокинов: sTNF-R1, sTNF α -R2 существенно не изменился. Уровень sIL-2R также снизился через 6 месяцев по сравнению с исходным уровнем, но не достигал статистической достоверности. Достоверных отличий уровней антител к рТТГ, тиреоидных гормонов не отмечено.

Через 12 месяцев все наблюдаемые пациенты были в неактивной фазе: CAS = 0,7 $\pm$ 0,3 и продолжали принимать тиреостатические препараты. Выявлялись отдельные симптомы ЭОП: отеки век, краснота конъюнктивы, сохранялся лагофталм, диплопия, косоглазие, что требовало направления на хирургическую коррекцию косоглазия, коррекцию ретракции век. Достоверных отличий уровней цитокина TGF- β 1 и солибилизированных рецепторов цитокинов: sTNF-R1, sTNF α -R2, sIL-2R по сравнению с исходным не выявлено.

В процессе лечения не было зарегистрировано серьезных побочных эффектов (табл. 4). Наиболее распространенными нежелательными явлениями были: увеличение веса, гипергликемия, у одного пациента развился стероидный сахарный диабет, желудочно-кишечный дискомфорт, повышение трансаминаз, нарушение сна.

Обсуждение

В настоящее время высокие дозы внутривенных ГК в режиме пульс-терапии являются выбором первой линии для лечения пациентов с ЭОП средней и тяжелой степени в активной фазе [16]. Эффективность лечения оценивается по клиническим данным и визуализирующим методам исследования орбит. В нашем предыдущем исследовании [1] мы оценили цитокиновый профиль у пациентов с БГ в состоянии эутиреоза на фоне приема тиреостатических препаратов и длительно существующей, нелеченой ЭОП. Сывороточные уровни sTNF α -R2, sTNF α -R1, sIL-2R и цитокина TGF- β 1 были значимо выше у лиц с ЭОП по сравнению с контрольной группой. С увеличением продолжительности ЭОП повышались концентрации sTNFR α 2 и TGF- β 1. В отдаленные сроки нелеченой ЭОП наблюдалась более высокая частота диплопии и косоглазия. Целью настоящего исследования явилась оценка влияния высокодозной внутривенной пульс-терапии метилпреднизолоном на уровни цитокина TGF- β 1, солибилизированных рецепторов цитокинов:

sTNF α -R2, sTNF α -R1, sIL-2R у пациентов с активной ЭОП и оценка возможности их использования в качестве биомаркеров для прогноза заболевания.

TGF- β 1 — это многофункциональный цитокин. Его функции зависят от особенностей органов и тканей. Основными направлениями его деятельности являются: регуляция пролиферации, роста, дифференцировки клеток; иммуномодулирующее действие; индукция фиброза и образование рубцов [2, 7]. TGF- β 1 участвует в подавлении иммунного ответа. Он ингибирует пролиферацию, дифференцировку и активность клеток, участвующих в гуморальных и клеточных реакциях, снижает экспрессию молекул главного комплекса гистосовместимости (МНС), клеточную цитотоксичность, выработку антител, подавляет секрецию цитокинов, участвует в ангиогенезе [3, 23]. В последние годы появилось значительное количество работ о спектре заболеваний в иммунопатогенезе которых участвует TGF- β 1 [4, 20, 26]. Например, показано, что определение уровня TGF- β 1 в сыворотке и спинномозговой жидкости при множественном склерозе имеет большое значение для мониторинга ремиссии и активной фазы заболевания [13]. Изучение динамики TGF- β 1 при ИБС, в том числе после аорто-коронарного шунтирования, имеет фундаментальное и практическое значение с позиций поиска средств для целенаправленного воздействия на процессы воспаления, связанные с атеросклерозом [11, 21]. Основным источником TGF- β 1 являются моноциты и макрофаги, содержащие его постоянно, но секретирующие только при активации воспаления. TGF- β могут продуцировать и другие клетки, такие как фибробласты, эндотелиоциты, нейтрофилы, эозинофилы, тучные клетки (мастоциты), гладкомышечные клетки, а также клетки многих видов злокачественных опухолей [12, 19].

Орбитальные фибробласты продуцируют TGF- β 1, который стимулирует выработку гликозаминогликанов, а также дифференцировку орбитальных фибробластов в миофибробласты [5], что определяет развитие фиброза, особенно на поздних стадиях заболевания. С другой стороны, TGF- β 1 подавляет экспрессию рТТГ на фибробластах и супрессирует иммунный ответ [17].

Ограничением многих исследований влияния терапии ГК на цитокиновый профиль является некомпенсированный тиреотоксикоз. В нашем исследовании пациенты принимали тиреостатики и поступали в состоянии эутиреоза и субклинического тиреотоксикоза, что отражалось на результатах исследования и снижало влияние

тиреотоксикоза на определение цитокинов/рецепторов. У пациентов резистентных к лечению ГК выявлен достоверно более низкий уровень TGF- β 1 на фоне высокодозной внутривенной пульс-терапии метилпреднизолоном через 3 и через 6 месяцев от начала лечения. В неактивную фазу ЭОП уровень TGF- β 1 приближался к исходному. Солюбилизованные рецепторы цитокинов: sTNF α -R2, sTNF α -R1 в процессе лечения существенно не менялись. Уровень sIL-2R на фоне пульс-терапии снижался, достигая статистической значимости через 3 и 6 месяцев лечения, что определяет супрессивный эффект ГК на данный цитокин.

Положительная роль TGF- β 1 как противовоспалительного цитокина с одной стороны может привести при длительном его воздействии к пролиферации фибробластов, повышенному синтезу коллагена и, как следствие, последующему фиброзированию тканей, развитию косоглазия, диплопии [15]. Почти у половины пациентов в нашем исследовании сохранялись диплопия (47,6%) и косоглазие (28,6%).

Заключение

ЭОП – аутоиммунное заболевание, осложняющее течение БГ. Глюкокортикоидная терапия является методом выбора лечения ЭОП, благода-

ря ее противовоспалительному и иммуносупрессивному действию [10, 18, 22, 24]. Частота положительного ответа на лечение наблюдается не у всех пациентов. В нашем исследовании через 3 и 6 месяцев от начала введения ГК резистентными к лечению оставались более 30% пациентов. У пациентов с отсутствием эффекта на фоне пульс-терапии ГК отмечались более низкие показатели цитокина TGF- β 1 исходно и в процессе лечения. Цитокины, регулирующие воспаление, потенциально могут быть биомаркерами для оценки активности ЭОП и прогноза эффективности лечения. По нашим данным трансформирующий фактор роста β 1 (TGF- β 1) является предиктором эффективности лечения у пациентов с ЭОП и БГ в состоянии эутиреоза. С другой стороны, результатом активации TGF- β 1, как фактора роста фибробластов, является пролиферация фибробластов и, как следствие, последующий фиброз тканей, что способствует развитию косоглазия и диплопии. Участвуя в патогенезе ЭОП TGF- β 1 способствует превращению активной фазы в неактивную (т. е. в фазу фиброза).

Изучение динамики TGF- β 1 у пациентов с ЭОП имеет большое значение для понимания иммунопатогенеза ЭОП и возможности использования TGF- β 1 как предиктора эффективности лечения и прогноза заболевания.

Список литературы / References

1. Свириденко Н.Ю., Бессмертная Е.Г., Беловалова И.М., Михеенков А.А., Шеремета М.С., Никанкина Л.В., Малышева Н.М. Аутоантитела, иммуноглобулины и цитокиновый профиль у пациентов с болезнью Грейвса и эндокринной офтальмопатией // Проблемы эндокринологии, 2020. Т. 66, № 5. С. 15-23. [Sviridenko N.Yu., Bessmertnaya E.G., Belovalova I.M., Mikheenkova A.A., Sheremeta M.S., Nikankina L.V., Malysheva N.M. Autoantibodies, immunoglobulins and cytokine profile in patients with graves' disease and graves' orbitopathy. *Problemy endokrinologii = Problems of Endocrinology*, 2020, Vol. 66, no. 5, pp. 15-23. (In Russ.)]
2. Симбирцев А.С. Цитокины в патогенезе инфекционных и неинфекционных заболеваний человека // Медицинский академический журнал, 2013. Т. 1, № 3. С. 18-41. [Simbirtsev A.S. Cytokines in the pathogenesis of infectious and noninfectious human diseases. *Meditinskiy akademicheskiy zhurnal = Medical Academic Journal*, 2013, Vol. 1, no. 3, pp. 18-41. (In Russ.)]
3. Симбирцев А.С. Цитокины в патогенезе и лечении заболеваний человека. СПб.: Фолиант, 2018. 512 с. [Simbirtsev A.S. Cytokines in the pathogenesis and treatment of human diseases]. St. Petersburg: Foliant, 2018. 512 p.
4. Стагниева И.В., Бойко Н.В., Гукасян Е.Л., Бачурина А.С. Цитокины в диагностике воспалительных заболеваний верхних дыхательных путей // Российская ринология, 2017. Т. 25, № 4. С. 43-47. [Stagnieva I.V., Boiko N.V., Gukasyan E.L., Bachurina A.S. The role of cytokines in the diagnostics of inflammatory diseases of the upper respiratory tract. *Rossiyskaya rinologiya = Russian Rhinology*, 2017, Vol. 25, no. 4, pp. 43-47. (In Russ.)]
5. Таскина Е.С., Харинцева С.В. Морфофункциональная характеристика и иммунологическая регуляция функции орбитальных фибробластов при эндокринной офтальмопатии // Клиническая и экспериментальная тиреидология, 2018. Т. 14, № 4. С. 183-191. [Taskina E.S., Kharintseva S.V. Morphofunctional characteristics and immunological regulation of the orbital fibroblasts function in endocrine ophthalmopathy.

Klinicheskaya i eksperimentalnaya tireoidologiya = Clinical and Experimental Thyroidology, 2018, Vol. 14, no. 4, pp. 183-191. (In Russ.)]

6. Чепурина А.А., Свириденко Н.Ю., Ремизов О.В., Беловалова И.М.. Визуализирующие методы исследования в диагностике эндокринной офтальмопатии // Медицинская визуализация, 2012. № 1. С. 36-44. [Chepurina A.A., Sviridenko N.Y., Remizov O.V., Belovalova I.M. Imaging Methods in the Diagnosis of Thyroid-Associated Orbitopathy. *Meditsinskaya vizualizatsiya = Medical Visualization*, 2012, no. 1, pp. 36-44. (In Russ.)]

7. Ярилин А.А. Иммунология. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2010. 752 с. [Yarilin A.A. Immunologia]. Moscow: GEOTAR-Media, 2010. 752 p.

8. Bahn R.S. Graves' Ophthalmopathy. *N. Engl. J. Med.*, 2010, Vol. 362, no. 8, pp. 726-738.

9. Bartalena L., Baldeschi L., Boboridis K., Eckstein A., Kahaly G.J., Marcocci C., Perros P., Salvi M., Wiersinga W.M. European Thyroid Association/European Group on Graves' Orbitopathy Guidelines for the Management of Graves' Orbitopathy. *Eur. Thyroid J.*, 2016, no. 5, pp. 9-26.

10. Bartalena L., Veronesi G., Krassas G.E., Wiersinga W.M., Marcocci C., Marinò M., Salvi M., Daumerie C., Bournaud C., Stah M., Sassi L., Azzolini C., Boboridis K.G., Mourits M.P., Soeters M.R., Baldeschi L., Nardi M., Currò N., Boschi A., Bernard M., von Arx G., Perros P., Kahaly G.J. Does early response to intravenous glucocorticoids predict the final outcome in patients with moderate-to-severe and active Graves' orbitopathy? *J. Endocrinol. Invest.*, 2017, Vol. 40, no. 5, pp. 547-553.

11. Bertoli-Avella A.M., Gillis E., Morisaki H., Verhagen J.M.A., de Graaf B.M., van de Beek G., Gallo E., Kruithof B.P.T., Venselaar H., Myers L.A., Laga S., Doyle A.J., Oswald G., van Cappellen G.W.A., Yamanaka I., van der Helm R.M., Beverloo B., de Klein A., Pardo L., Lammens M., Evers C., Devriendt K., Dumoulein M., Timmermans J., Bruggenwirth H.T., Verheijen F., Rodrigus I., Baynam G., Kempers M., Saenen J., van Craenenbroeck E.M., Minatoya K., Matsukawa R., Tsukube T., Kubo N., Hofstra R., Goumans M.J., Bekkers J.A., Roos-Hesselink J.W., van de Laar I.M.B.H., Dietz H.C., van Laer L., Morisaki T., Wessels M.W., Loeys B.L. Mutations in a TGF-beta ligand, TGFβ3, cause syndromic aortic aneurysms and dissections. *J. Am. Coll. Cardiol.*, 2015, Vol. 65, no. 13, pp. 1324-1336.

12. Brier B., Moses H.L. TGF-beta and cancer. Cytokine growth factor. *Reviews*, 2006, Vol. 17, pp. 29-40.

13. Duffy S.S., Keating B.A., Moalem-Taylor G. Adoptive Transfer of regulatory T cells as a promising immunotherapy for the treatment of multiple sclerosis. *Front. Neurosci.*, 2019, Vol. 13, 1107. doi: 10.3389/fnins.2019.01107.

14. Dik W.A., Virakul S., van Steensel L. Current perspectives on the role of orbital fibroblasts in the pathogenesis of Graves' ophthalmopathy. *Exp. Eye Res.*, 2016, Vol. 142, pp. 83-91.

15. Efstratios K., Evangelos S., Marek R., Djuro M., George M. The role of transforming growth factor beta in thyroid autoimmunity: current knowledge and future perspectives. *Rev. Endocr. Metab. Disord.*, 2021. doi: 10.1007/s11154-021-09685-7.

16. Kahaly G., Bartalena L., Hegedüs L., Leenhardt L., Poppe K., Pearce S.H. 2018 European Thyroid Association Guideline for the Management of Graves' Hyperthyroidism. *Eur. Thyroid J.*, 2018, Vol. 7, no. 4, pp. 167-186.

17. Kajdaniuk D., Marek B., Niedziółka-Zielonka D., Foltyn W., Nowak M., Siemińska L., Borgiel-Marek H., Głogowska-Szeląg J., Ostrowska Z., Drożdż L., Kos-Kudła B. Transforming growth factor β1 (TGFβ1) and vascular endothelial growth factor (VEGF) in the blood of healthy people and patients with Graves' orbitopathy – a new mechanism of glucocorticoids action? *Endocrinol. Pol.*, 2014, Vol. 65, no. 5, pp. 348-356.

18. Kardalas E., Maraka S., Papagianni M., Paltoglou G., Siristatidis C., Mastorakos G. TGF-β Physiology as a novel therapeutic target regarding autoimmune thyroid diseases: where do we stand and what to expect. *Medicina*, 2021, Vol. 57, no. 6, pp. 621-635.

19. Lebrun J. The dual role of TGFβ in human cancer: from tumor suppression to cancer metastasis. *ISRN Mol. Biol.*, 2012, Vol. 2012, 381428. doi: 10.5402/2012/381428.

20. Marek A., Brodzicki J., Liberek A., Korzon M. TGF-β (transforming growth factor-β) in chronic inflammatory conditions – a new diagnostic and prognostic marker? *Med. Sci. Monit.*, 2002, Vol. 8, no. 7, pp. 145-151.

21. Marković M., Ignjatović S., Dajak M., Majkić-Singh N. Placental growth factor as short-term predicting biomarker in acute coronary syndrome patients with non-ST elevation myocardial infarction. *South Med. J.*, 2010, Vol. 103, no. 10, pp. 982-987.

22. Myśliwiec J., Kretowski A., Stepień A., Kinalska I. Serum Levels of Soluble TNFα Receptors (sTNFR1 and sTNFR2) during corticosteroid treatment in patients with graves' ophthalmopathy. *Immunol. Invest.*, 2004, Vol. 33, no. 1, pp. 61-68.

23. Pohlert D., Brenmoehl J., Löffler I., Müller C.K., Leipner C., Schultze-Mosgau S., Stallmach A., Kinne R.W., Wolf G. TGF-beta and fibrosis in different organs – molecular pathwayimprints. *Biochim. Biophys. Acta*, 2009, Vol. 1792, no. 8, pp.746-756.

24. Salvi M., Campi I. Medical treatment of graves' orbitopathy. *Horm. Metab. Res.*, 2015, Vol. 47, no. 10, pp. 779-788.
25. Smith T.J., Hoa N. Immunoglobulins from patients with Graves' disease induce hyaluronan synthesis in their orbital fibroblasts through the self-antigen, insulin-like growth factor-I receptor. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 2004, Vol. 89, no. 10, pp. 5076-5080.
26. Takeda N., Hara H., Fujiwara T., Kanaya T., Maemura S., Komuro I. TGF- β Signaling-Related Genes and Thoracic Aortic – Aneurysms and Dissections. *Int. J. Mol. Sci.*, 2018, Vol. 19, no. 7, 2125. doi: 10.3390/ijms19072125.
27. Wiersinga W.M., Perros P., Kahaly G.J., Mourits M.P., Baldeschi L., Boboridis K., Boschi A., Dickinson A.J., Kendall-Taylor P., Krassas G.E., Lane C.M., Lazarus J.H., Marcocci C., Marino M., Nardi M., Neoh C., Orgiazzi J., Pinchera A., Pitz S., Prummel M.F., Sartini M.S., Stahl M., von Arx G. Clinical assessment of patients with Graves' Orbitopathy: The European Group on Graves' Orbitopathy (EUGOGO) recommendations to generalists, specialists and clinical researchers. *Eur. J. Endocrinol.*, 2006, Vol. 155, no. 3, pp. 387-389.

Авторы:

Свириденко Н.Ю. — д.м.н., профессор, заместитель директора института клинической эндокринологии по лечебной работе, главный научный сотрудник отдела терапевтической эндокринологии ФГБУ «Научный медицинский исследовательский центр эндокринологии» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Бессмертная Е.Г. — к.м.н., ведущий научный сотрудник отделения диабетической ретинопатии и офтальмохирургии ФГБУ «Научный медицинский исследовательский центр эндокринологии» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Беловалова И.М. — к.м.н., доцент кафедры института высшего и дополнительного профессионального образования ФГБУ «Научный медицинский исследовательский центр эндокринологии» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Шеремета М.С. — к.м.н., заведующая отделом радионуклидной диагностики и терапии ФГБУ «Научный медицинский исследовательский центр эндокринологии» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Authors:

Sviridenko N.Yu., MD, PhD (Medicine), Professor, Deputy Director for Clinics, Chief Research Associate, Department of Therapeutic Endocrinology, Medical Research Centre of Endocrinology, Moscow, Russian Federation

Bessmertnaya E.G., PhD (Medicine), Leading Research Associate, Department of BDabetic Retinopathy and Eye Surgery, Medical Research Centre of Endocrinology, Moscow, Russian Federation

Belovalova I.M., PhD (Medicine), Associate Professor, Institute of Higher and Additional Education, Medical Research Centre of Endocrinology, Moscow, Russian Federation

Sheremeta M.S., PhD (Medicine), Head, Department of Radionuclide Diagnostics and Therapy, Medical Research Centre of Endocrinology, Moscow, Russian Federation

Бабеева Д.М. — врач-рентгенолог отделения КТ и МРТ ФГБУ «Научный медицинский исследовательский центр эндокринологии» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Мальшиева Н.М. — к.б.н., ведущий научный сотрудник клинико-диагностической лаборатории ФГБУ «Научный медицинский исследовательский центр эндокринологии» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Трошина Е.А. — д.м.н., профессор, член-корр. РАН, директор Института клинической эндокринологии ФГБУ «Научный медицинский исследовательский центр эндокринологии» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Мельниченко Г.А. — д.м.н., академик РАН, профессор, заместитель директора по науке ФГБУ «Научный медицинский исследовательский центр эндокринологии» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Babaeva D.M., Clinical Radiologist, Computer Tomography and MRI Department, Medical Research Centre of Endocrinology, Moscow, Russian Federation

Malysheva N.M., PhD (Biology). Leading Research Associate, Clinical Diagnostic Laboratory, Medical Research Centre of Endocrinology, Moscow, Russian Federation

Troshina E.A., PhD, MD (Medicine), Professor, Corresponding Member, Russian Academy of Sciences, Director, Institute of Clinical Endocrinology, Medical Research Centre of Endocrinology, Moscow, Russian Federation

Melnichenko G.A., PhD, MD (Medicine), Full Member of Russian Academy of Sciences, Deputy Director for Research, Medical Research Centre of Endocrinology, Moscow, Russian Federation

Поступила 08.05.2022

Отправлена на доработку 22.05.2022

Принята к печати 24.06.2022

Received 08.05.2022

Revision received 22.05.2022

Accepted 24.06.2022

ИЗМЕНЕНИЕ ФЕНОТИПА Т- И В-ЛИМФОЦИТОВ ПРИ ЛЕЧЕНИИ РАДИОАКТИВНЫМ ЙОДОМ ПАЦИЕНТОВ С БОЛЕЗНЬЮ ГРЕЙВСА

Савченко А.А.^{1,2}, Дудина М.А.², Догадин С.А.², Борисов А.Г.^{1,2},
Кудрявцев И.В.^{3,4}, Фомина Д.В.², Беленюк В.Д.¹

¹ Научно-исследовательский институт медицинских проблем Севера — обособленное подразделение ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук», г. Красноярск, Россия

² ФГБОУ ВО «Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого» Министерства здравоохранения РФ, г. Красноярск, Россия

³ ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

⁴ ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Резюме. Целью исследования явилось изучение особенностей субпопуляционного состава Т- и В-лимфоцитов и их взаимосвязей в динамике лечения радиоактивным йодом больных с болезнью Грейвса (БГ). Обследовано 36 женщин с верифицированным диагнозом БГ. Определение содержания тиреоидных гормонов осуществлялось методом иммунорадиометрического анализа. Уровень аутоантител к рецептору тиреотропного гормона (рТТГ) оценивался иммуноферментным методом. На основании комплексного предтерапевтического обследования всем пациентам назначалась фиксированная активность ¹³¹I от 400 до 700 МБк перорально. В качестве контроля обследовано 56 практически здоровых женщин. Исследование фенотипа Т- и В-лимфоцитов проводили методом проточной цитометрии с использованием прямой иммунофлуоресценции цельной крови. Установлено, что до момента лечения радиоактивным йодом у больных выявляется высокий уровень функциональной активности клеток, который определяется экспрессией CD25-антигена на Т-лимфоцитах и CD23-антигена на В-лимфоцитах. Высокий уровень функциональной активности клеток адаптивного иммунитета у больных с БГ проявляется на фоне повышенного уровня аутоантител к рТТГ. С помощью корреляционного анализа обнаружено, что у больных с БГ в период предтерапевтического обследования состояние тиреоидного статуса определяет стимуляцию функциональной активности Т- и В-лимфоцитов и, соответственно, повышает уровень аутоиммунных процессов. Через 1 месяц после проведения радиойодтерапии (РЙТ) у больных с БГ на фоне транзиторного гипертиреоза (при сохранении повышенной концентрации аутоантител к рТТГ) количество активированных Т-лимфоцитов (включая Т-хелперы и цитотоксические Т-клетки) снижается до контрольных значений. Однако у больных сохраняется низкий уровень в крови цитотоксических Т-лимфоцитов и значительно повышается содержание Treg. При исследовании фенотипа В-лимфоцитов крови у больных с БГ через 1 месяц после РЙТ также обнаружено снижение количества В-клеток и активированных В-клеток

Адрес для переписки:

Кудрявцев Игорь Владимирович
ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины»
197376, Россия, Санкт-Петербург,
ул. Акад. Павлова, 12.
Тел.: 8 (812) 234-29-29.
E-mail: igorek1981@yandex.ru

Address for correspondence:

Kudryavtsev Igor V.
Institute of Experimental Medicine
197376, Russian Federation, St. Petersburg,
Acad. Pavlov str., 12.
Phone: 7 (812) 234-29-29.
E-mail: igorek1981@yandex.ru

Образец цитирования:

А.А. Савченко, М.А. Дудина, С.А. Догадин, А.Г. Борисов, И.В. Кудрявцев, Д.В. Фомина, В.Д. Беленюк
«Изменение фенотипа Т- и В-лимфоцитов при лечении радиоактивным йодом пациентов с болезнью Грейвса» // Медицинская иммунология, 2022. Т. 24, № 5. С. 1007-1016.
doi: 10.15789/1563-0625-CIT-2530
© Савченко А.А. и соавт., 2022

For citation:

A.A. Savchenko, M.A. Dudina, S.A. Dogadin, A.G. Borisov, I.V. Kudryavtsev, D.V. Fomina, V.D. Belenyuk
“Changes in the T and B lymphocyte subset profiles upon treatment of patients with Graves’ disease with radioactive iodine”, Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2022, Vol. 24, no. 5, pp. 1007-1016.
doi: 10.15789/1563-0625-CIT-2530
DOI: 10.15789/1563-0625-CIT-2530

памяти до уровня контрольного диапазона. При этом выявляется повышение уровней наивных В-лимфоцитов и В2-клеток, а также снижение количества активированных В1-лимфоцитов. Все изменения в субпопуляционном составе Т- и В-клеток и в их фенотипе развиваются на фоне полной потери взаимосвязей между исследуемыми показателями, что характеризует потерю тиреоидного контроля иммунных процессов и кооперативного взаимодействия клеток при развитии иммунного ответа. В целом, изменения фенотипа Т- и В-лимфоцитов в крови у больных с БГ через 1 месяц после лечения радиоактивным йодом отражают тенденцию к снижению функциональной активности клеток адаптивного иммунитета, что может реализовываться и в ингибировании аутоиммунных процессов.

Ключевые слова: Т-лимфоциты, В-лимфоциты, фенотип, субпопуляции, радиойодтерапия, аутоантитела, болезнь Грейвса

CHANGES IN THE T AND B LYMPHOCYTE SUBSET PROFILES UPON TREATMENT OF PATIENTS WITH GRAVES' DISEASE WITH RADIOACTIVE IODINE

Savchenko A.A.^{a, b}, Dudina M.A.^b, Dogadin S.A.^b, Borisov A.G.^{a, b},
Kudryavtsev I.V.^{c, d}, Fomina D.V.^b, Belenyuk V.D.^a

^a Research Institute of Medical Problems of the North, Krasnoyarsk Science Center, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Krasnoyarsk, Russian Federation

^b Krasnoyarsk State V. Voino-Yasenetsky Medical University, Krasnoyarsk, Russian Federation

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

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

Abstract. The aim of the present study was to evaluate the subpopulation profile of T and B lymphocytes, and their relationships during therapy of the patients with Graves' disease (GD) treated by means of radioactive iodine. We have examined 36 women with verified diagnosis of GD. The contents of thyroid hormones were determined by immunoradiometric analysis. The levels of thyroid-stimulating hormone receptor autoantibodies (rTSH) were evaluated by enzyme-linked immunosorbent assay. On the basis of comprehensive pre-therapeutic examination, all patients were exposed to the fixed-activity therapy with radioactive iodine-131 at a dose of 400 to 700 MBq administered orally in isotonic aqueous solution of sodium iodide. 56 practically healthy women were examined as a control group. The phenotype of T and B cells in whole blood was studied by flow cytometry using direct immunofluorescence. It was shown that the patients, prior to treatment with radioactive iodine, had high levels of cellular functional activity, as determined by expression of CD25 antigen on T cells and CD23-antigen on B lymphocytes. Higher functional activity of the cells responsive for adaptive immunity in the patients with GD manifests in the presence of increased levels of autoantibodies to rTSH. By means of correlation analysis, we found that the patients with GD examined before the therapy had the thyroid status may determine the functional stimulation of T and B cells, thus increasing the levels of autoimmune processes. One month after radioiodine therapy (RIT), the GD patients, along with transient hyperthyroidism with increased concentration of autoantibodies to rTSH, showed a reduction of activated T lymphocyte contents (including T helpers and cytotoxic T cells) to control values. However, the level of cytotoxic T lymphocytes in the blood remained low, and the content of Treg cells was significantly increased in the patients. Decreased contents of B cells activated memory B cell to the control levels were found in patients with GD over 1 month after RIT when studying the phenotype of blood B lymphocytes. In this case, increased levels of naive B lymphocytes and B2 cells were detected, as well as decreased numbers of activated B1 lymphocytes. The observed changes in the subpopulation composition of T and B cells, and in their phenotype developed against the background of complete absence of relationships between the studied parameters, thus suggesting loss of thyroid control of immune processes and cooperative cell interaction during the development of the immune response. Generally, the phenotypic changes of T and B lymphocyte subsets in the blood of patients with GD through 1 month after treatment with radioactive iodine may reflect a trend for decreased functional activity of adaptive cellular immunity which may also account for inhibition of autoimmune processes.

Keywords: T lymphocytes, B lymphocytes, phenotype, subsets, radioiodine therapy, autoantibodies, Graves' disease

Introduction

Graves' disease (GD) is an autoimmune disease of the thyroid gland that develops as a result of the production of autoantibodies to the thyroid-stimulating hormone receptor (TSHR) [4, 21, 25]. The pathogenesis of GD is based on the appearance of class G thyroid-stimulating immunoglobulins (LATS factors: long-acting thyroid stimulator) in the body which interact with TSHR on the thyrocyte membrane and activate the hypersecretion of thyroxine (T_4) and triiodothyronine (T_3) [9]. This immunopathogenetic process leads to the onset of thyrotoxicosis syndrome.

The development of manifest hyperthyroidism in GD is appropriately realized in a change in the state of the immune system. Moreover, the relationships between the parameters of the immune system and the concentration of thyroid hormones in patients with GD are determined not only by the intensity of autoimmune processes but also by the direct influence of thyroid-stimulating hormone (TSH) and thyroid hormones. These thyroid influences on the functional activity of the immune system cells are realized through specific receptors that are expressed both on the outer cytoplasmic membrane and inside the cells [8, 12, 19]. We found earlier that the number of regulatory T cells (Treg) was decreased in the blood of patients with GD while the content of B1 cells was increased [20]. The results of the study by Zhang D. et al. (2019) showed that the blood of GD patients contained a reduced number of Treg with a low level of functional activity [26]. A decrease in the number of B lymphocytes producing IL-10 was also found in the blood of GD patients which in the framework of immunopathogenesis associated with an increase in the concentration of autoantibodies to TSHR [10]. It should be borne in mind that drug treatment with thyreostatic drugs (is the first line of the therapy for GD) can modulate the functional state of the immune system cells. The consequence of this may be a change in the direction of the autoimmune process both in the direction of the development of remission of the disease and relapse of GD.

Radioiodine therapy (RIT) for GD is based on the ability to capture and accumulate radioactive iodine by the cells of the thyroid gland. β -Particles are formed during the decay of the isotope of iodine causing the destruction of thyrocytes and subsequent development of post-radiation hypothyroidism [2]. The compensatory increase in TSH level occurs through a negative feedback mechanism. However, some researchers noted the concentration of autoantibodies to TSHR and/or thyroid peroxidase in the blood serum of GD patients even increased in the first month of RIT [15, 18]. It was assumed that the RIT causes damage to the DNA of thyrocytes as well as the release of new thyroid autoantigens which further stimulate the reactivity of the immune system

including the activity of autoimmune process. So, it was shown in the Du W. et al. study (2017) that GD patients 1 week after RIT had a high concentration of IL-6 and CXCL-10 in the blood, the levels of which then decreased but even after 18 months remained elevated relative to the control values [5]. Direct effects of radioactive iodine on the immune system have also been found. For example, it was found that the level of apoptosis of blood leukocytes was increased during RIT [14]. The C t -Bigas S. et al. (2016) study was showed that damage to Treg and invariant NKT cells was observed in GD patients [3]. The authors believed that these results characterized the mechanisms of activation of autoimmune processes during RIT. There is evidence that the ability of T and B lymphocytes to cooperatively interact during the immune response may be impaired when treated GD patients with iodine-131 (^{131}I) [18]. In this regard, the mechanisms of the immune interaction of T and B cells in GD patients during RIT should be determined.

Thus, **the aim of this study** was to investigate the features of the subset composition of T and B cells and their relationships in the dynamics of treatment with radioactive iodine in patients with GD.

Materials and methods

Study participants

36 women (average age was 42.13 ± 15.35) with a verified diagnosis of GD were included in this study: of which 10 women (27.7%) were with overt hyperthyroidism and 26 women (72.2%) were with relapse of the disease. Median thyroid volume was 20.41 ml (15.70-27.55). All patients at the time of inclusion in the study received drug treatment with thiamazole according to the standard scheme (median duration of treatment was 12 months, range: 9-14 months), the drug was canceled 14 days before RIT. The diagnosis of hyperthyroidism and the selection of patients for RIT was carried out according to the federal clinical guidelines for the management of patients with GD [24]. The RIT was carried out on the basis of the department of radionuclide therapy of the FMBA of Russia in Krasnoyarsk. All patients had a fixed ^{131}I activity of 400 to 700 MBq orally in the form of an isotonic aqueous solution of sodium iodide on the basis of a comprehensive pre-therapeutic examination. The examination of patients with GD was repeated 1 month after RIT. A fifty-six apparently healthy women of the same age were examined as a control group. All women in the control group didn't have a history of thyroid diseases in themselves and their blood relatives and also didn't have structural changes in the thyroid gland during ultrasound examination. The exclusion criteria from the control group were pregnancy and lactation. All studies were carried out with the informed consent of the patients and in accordance with the Declaration of Helsinki of

the World Association “Ethical principles of scientific medical research involving human” as amended in 2013 and “Rules of clinical practice in the Russian Federation” approved by the Order of the Ministry of Health of Russia of 19.06.2003 (No. 266).

Assessment of thyroid status and determination of the concentration of autoantibodies to TSHR

The concentration of thyroid hormones in the blood serum was determined by the method of immunoradiometric analysis using standard “Immunotech S.A.S.” (Czech Republic) test kits in the hormonal laboratory of the endocrinological center of the Krasnoyarsk Regional Clinical Hospital. The reference values for TSH were 0.17–4.05 mU/L, for free T₄ (fT₄) were 11.5–23.0 pmol/L, for free T₃ (fT₃) were 2.0–5.7 pmol/L. The level of autoantibodies to TSHR (TSHR-AB) was assessed by the enzyme immunoassay using the “Medizym T.R.A.” (“Medipan GmbH”, Germany) test kit. The recommended cut-off point for the TSHR-AB level was 1.5 mU/L.

Flow cytometry

The study of the phenotype of T and B lymphocytes was carried out by flow cytometry using direct immunofluorescence of whole peripheral blood and monoclonal antibodies labeled with FITC (fluorescein isothiocyanate), PE (phycoerythrin), ECD (phycoerythrin-Texas Red-X), PC5 (phycoerythrin-cyanin 5), PC7 (phycoerythrin-cyanin 7), AA700 (alexa fluor 700) and AA750 (alexa fluor 750) in the following panels: CD8-FITC/CD127-PE/CD25-PC5/CD4-PC7/CD3-AA700/CD45-AA750 и CD5-FITC/CD23-PE/CD19-ECD/CD45-PC5/CD27-PC7. The distribution of antibodies along the fluorescence channels was carried out in accordance with the principles of forming panels for multicolor cytometric studies [13]. Sample preparation was performed according to the standard procedure [22]. The analysis of stained cells was carried out on a Navios flow cytometer (Beckman Coulter, USA) of the Krasnoyarsk Regional Center of Research Equipment of Federal Research Center “Krasnoyarsk Science Center SB RAS”. The processing of the obtained cytometric results was carried out using the Navios Software v. 1.2 and Kaluza v. 2.1.1 (Beckman Coulter, USA) programs. At least 50,000 lymphocytes were analyzed in each sample.

Statistical analysis

Statistical description was performed by counting the median (Me) and the inter-quarter span in the form of 25 and 75 percentiles ($Q_{0.25}$ – $Q_{0.75}$). The significance of differences between the indices of independent samples was assessed by the nonparametric Mann–Whitney U test. The significance of the differences in indicators of GD patients before and after RIT was determined by the Wilcoxon matched pairs test. The Spearman rank correlation coefficients

were calculated to characterize the strength of the relationship between the studied indicators. Statistical analysis was performed in an application package Statistica 8.0 (StatSoft Inc., 2007).

Results

Study of thyroid status and the level of TSHR-AB

The functional state of the pituitary-thyroid system of GD patients before RIT corresponded to subclinical hyperthyroidism with a persistent high level of TSHR-AB (Figure 1). The state of subclinical thyrotoxicosis was confirmed by a low level of TSH and normal fT₄ concentration, respectively: in GD Me = 0.01 mU/L ($Q_{0.25}$ = 0.005; $Q_{0.75}$ = 0.04) and Me = 15.25 pmol/L ($Q_{0.25}$ = 11.97; $Q_{0.75}$ = 19.81), in control group Me = 1.17 mU/L ($Q_{0.25}$ = 0.88; $Q_{0.75}$ = 1.54), $p < 0.001$) and Me = 15.25 pmol/L ($Q_{0.25}$ = 11.97; $Q_{0.75}$ = 19.81). The level of fT₃ before RIT corresponded to the reference range of normal values, but remained significantly increased relative to the values established in control group: in GD Me = 4.25 pmol/L ($Q_{0.25}$ = 3.05; $Q_{0.75}$ = 5.51), in control group Me = 1.82 pmol/L ($Q_{0.25}$ = 1.49; $Q_{0.75}$ = 2.18), $p < 0.001$.

An increase in the concentration of TSH to control values was observed in patients 1 month after RIT while the content of TSHR-AB remained almost at the initial level. Also, the concentration of fT₃ in GD patients increased 1 month after therapy (in patients – Me = 6.27 pmol/L, $Q_{0.25}$ = 5.59, $Q_{0.75}$ = 6.42; in persons of the control group – Me = 1.82 pmol/L, $Q_{0.25}$ = 1.49, $Q_{0.75}$ = 2.18; $p < 0.001$), while the level of fT₄ during this period of the examination corresponded to the reference range.

Features of the subpopulation composition of T and B lymphocytes in GD patients before and after RIT

An increase in the percentage of CD3⁺CD25⁺, CD3⁺CD4⁺, CD3⁺CD4⁺CD25⁺ and CD3⁺CD8⁺CD25⁺ cells but with a decrease in the amount of CD3⁺CD8⁺ lymphocytes relative to the control values was found in GD patients before RIT (Table 1). The percentage of CD3⁺CD25⁺, CD3⁺CD4⁺CD25⁺ and CD3⁺CD8⁺CD25⁺ lymphocytes in patients 1 month after RIT decreased to the control range. The relative number of CD3⁺CD8⁺ cells remained almost at the initial level. At the same time, an increase in the number of CD3⁺CD4⁺CD127^{Low}CD25^{High} cells in the peripheral blood was found in GD patients 1 month after RIT.

Changes in the phenotypic composition of blood B lymphocytes were also detected in GD patients before treatment with radioactive iodine: a decrease in the percentage of CD19⁺ cells and an increase in the relative number of CD19⁺CD27⁺CD23⁺ lymphocytes (Table 2). CD19⁺ and CD19⁺CD27⁺CD23⁺ cell levels were normalized 1 month after therapy. However, additional changes in the phenotypic composition

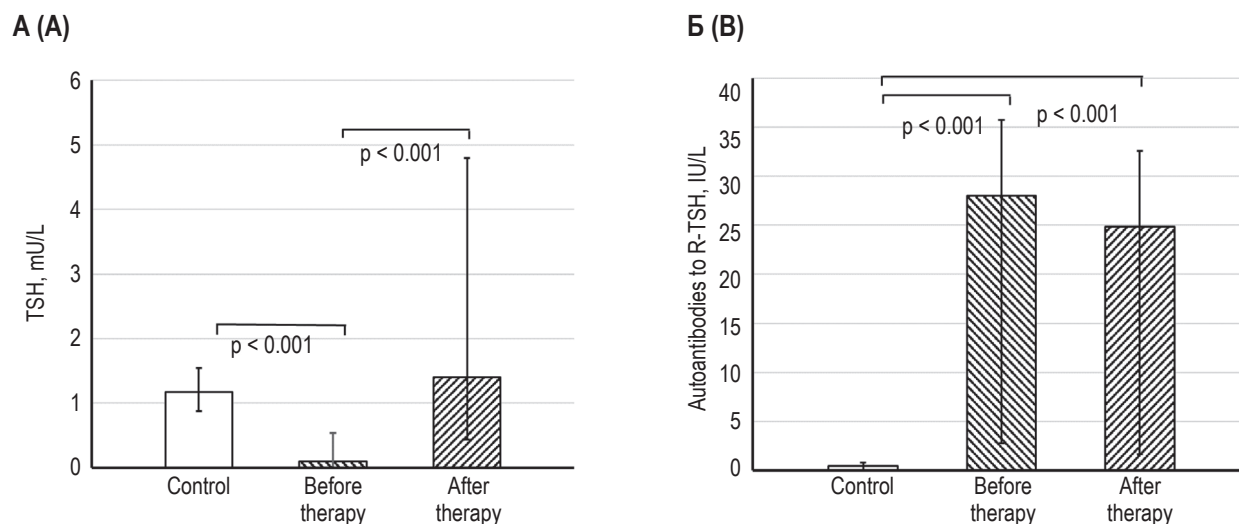


Figure 1. Concentration of TSH (A) and autoantibodies to TSH receptor (B) in the blood serum before and after radioiodine therapy of patients with Graves' disease

TABLE 1. PHENOTYPE OF T LYMPHOCYTES IN THE BLOOD OF PATIENTS WITH GRAVES' DISEASE BEFORE AND AFTER 1 MONTH OF RADIOIODINE THERAPY, Me ($Q_{0.25}$ - $Q_{0.75}$)

Parameters	Control n = 56		Patients with Graves' disease n = 36			
			Before radioiodine therapy		1 month after radioiodine therapy	
	1		2		3	
	Me	$Q_{0.25}$ - $Q_{0.75}$	Me	$Q_{0.25}$ - $Q_{0.75}$	Me	$Q_{0.25}$ - $Q_{0.75}$
T lymphocytes, $10^9/L$	1.51	1.19-1.65	1.71	1.24-2.26	1.14	0.78-1.49
					$p_2 = 0.029$	
CD3 ⁺ , %	72.0	68.3-76.0	74.6	71.0-77.1	66.3	63.6-76.7
CD3 ⁺ CD25 ⁺ , %	0.21	0.03-1.20	1.42	1.21-1.94	0.19	0.09-0.70
			$p_1 < 0.001$		$p_2 < 0.001$	
CD3 ⁺ CD4 ⁺ , %	41.4	37.8-46.1	47.2	39.9-54.1	43.4	38.9-51.1
			$p_1 = 0.045$			
CD3 ⁺ CD8 ⁺ , %	30.0	26.2-35.0	24.5	18.3-28.5	19.3	12.8-29.9
			$p_1 = 0.024$		$p_1 = 0.017$	
CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD25 ⁺ , %	0.12	0.03-0.48	0.84	0.64-0.94	0.32	0.08-0.57
			$p_1 = 0.005$		$p_2 = 0.002$	
CD3 ⁺ CD8 ⁺ CD25 ⁺ , %	0.06	0.03-0.17	0.31	0.29-0.45	0.05	0.03-0.08
			$p_1 = 0.036$		$p_2 = 0.034$	
CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD8 ⁺ , %	0.38	0.30-0.85	0.51	0.38-0.98	0.55	0.38-1.08
CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD127 ^{Low} C-D25 ^{High} , %	1.8	0.9-2.8	2.3	1.8-3.5	4.7	2.7-5.9
					$p_1 = 0.004$ $p_2 = 0.048$	

Note. p_1 , statistical significant differences with the control group; p_2 , -/- with parameters of the patients before radioiodine therapy.

TABLE 2. PHENOTYPE OF B LYMPHOCYTES IN THE BLOOD OF PATIENTS WITH GRAVES' DISEASE BEFORE AND AFTER 1 MONTH OF RADIOIODINE THERAPY, Me ($Q_{0.25}$ - $Q_{0.75}$)

Parameters	Control n = 56		Patients with Graves' disease n = 36			
			Before radioiodine therapy		1 month after radioiodine therapy	
	1		2		3	
	Me	$Q_{0.25}$ - $Q_{0.75}$	Me	$Q_{0.25}$ - $Q_{0.75}$	Me	$Q_{0.25}$ - $Q_{0.75}$
B lymphocytes, $10^9/L$	0.24	0.18-0.33	0.26	0.19-0.35	0.24	0.12-0.35
CD19 ⁺ , %	11.4	10.7-16.0	9.7	9.1-12.3	13.9	11.8-15.2
			$p_1 = 0.043$		$p_2 = 0.048$	
CD19 ⁺ CD27 ⁺ , %	8.8	6.6-15.8	7.4	6.0-11.8	12.1	8.7-14.9
					$p_2 = 0.044$	
CD19 ⁺ CD27 ⁺ , %	2.3	1.2-2.5	2.2	1.4-3.2	2.6	1.6-2.9
CD19 ⁺ CD5 ⁺ , %	2.0	0.8-5.4	2.8	2.0-3.6	3.1	1.9-4.0
CD19 ⁺ CD5 ⁺ , %	9.0	7.0-14.1	7.6	7.3-10.5	11.1	9.9-12.2
					$p_2 = 0.039$	
CD19 ⁺ CD23 ⁺ , %	5.5	2.1-8.5	5.6	3.8-6.2	4.3	3.7-5.9
CD19 ⁺ CD27 ⁺ CD23 ⁺ , %	1.29	0.63-3.72	1.86	1.28-2.19	1.41	1.18-4.00
CD19 ⁺ CD27 ⁺ CD23 ⁺ , %	0.17	0.06-0.53	0.44	0.29-0.84	0.24	0.10-0.37
			$p_1 = 0.027$		$p_2 = 0.040$	
CD19 ⁺ CD5 ⁺ CD23 ⁺ , %	1.91	0.94-3.59	1.60	0.84-1.91	1.20	0.61-1.41
					$p_1 = 0.035$	
CD19 ⁺ CD5 ⁺ CD23 ⁺ , %	2.99	1.83-5.34	3.85	2.99-4.60	3.19	2.35-4.90

Note. As for Table 1.

of B lymphocytes were found in GD patients during this period of the examination: an increase relative to the initial values of the levels of CD19⁺CD27⁺ and CD19⁺CD5⁺ cells, a decrease in the percentage of CD19⁺CD5⁺CD23⁺ lymphocytes relative to the control values.

Correlation analysis results

Features of the relationship between indicators of thyroid status and the phenotypic composition of T and B cells in the blood as well as between individual subsets of lymphocytes were investigated using correlation analysis. Examination of the control group showed that the relative amount of CD3⁺CD25⁺ lymphocytes was negatively correlated with the percentage of CD19⁺CD5⁺ cells ($r = -0.68$, $p = 0.008$) and the concentration of TSH also negatively correlates with the percentage of CD3⁺CD4⁺CD127^{Low}CD25^{High} cells ($r = -0.75$, $p < 0.001$). It was revealed in GD patients before the start of RIT that the relative content of CD3⁺ and CD3⁺CD8⁺CD25⁺ lymphocytes negatively correlated with the percentage of CD19⁺CD23⁺

($r = -0.82$, $p = 0.009$ and $r = -0.89$, $p < 0.001$, respectively) and CD19⁺CD5⁺CD23⁺ cells ($r = -0.83$, $p = 0.008$ and $r = -0.91$, $p < 0.001$, respectively). The concentration of TSH in GD before the start of treatment was positively correlated with CD3⁺CD4⁺CD127^{Low}CD25^{High} ($r = 0.94$, $p < 0.001$) and CD19⁺CD5⁺ cells ($r = 0.76$, $p = 0.014$) while the level of TSHR-AB in the blood serum was positively correlated with the percentage of CD3⁺CD25⁺ cells ($r = 0.65$, $p = 0.012$). Correlations between the studied parameters were completely absent in GD patients after 1 month of RIT.

Discussion

The character of the GD course before the start of ROT in patients is determined by the state of subclinical hyperthyroidism of autoimmune genesis which is manifested by a high concentration of TSHR-AB, a low TSH level and increased content of fT3. An increase in the percentage of T lymphocytes expressing

the CD25 marker (CD3⁺CD25⁺, CD3⁺CD4⁺CD25⁺ and CD3⁺CD8⁺CD25⁺) is observed in GD patients in the peripheral blood against this background. CD25 was defined as the α -subunit of the IL-2 receptor (IL-2R α) which in complex with the β (CD122, IL-2R β) and γ (CD132, IL-2R γ) subunits formed the high-affinity IL-2 receptor expressed on activated cells [17, 27]. Accordingly, it can be stated that the GD patients before the start of RIT had an increase in the number of activated T lymphocytes (including helper T cells and cytotoxic T cells) but with a decrease in the level of cytotoxic T cells non-expressing CD25.

When studying the phenotype of B lymphocytes, it was found that GD patients at the stage of pre-RIT examination had a low content of total B lymphocytes against the background of an increase in the relative number of memory B cells expressing the CD23 receptor. It is known that CD23 is a low-affinity IgE receptor whose expression level is increased on activated B lymphocytes [1, 6, 23]. The immunopathogenesis of GD is based on the exit to the periphery of the "forbidden" clone of B cells, which can form a cell clone producing of LATS-factor [4, 21, 25]. It can be assumed that an increase in the number of activated memory B cells with a decrease in the level of total B lymphocytes characterizes these processes of GD immunopathogenesis.

We characterized the dependence of the subset composition of T and B lymphocytes on the state of thyroid status in GD using the methods of correlation analysis. The only relationship between the studied parameters was found in the control group – a negative relationship between the concentration of TSH in serum and the percentage of Treg. Patients with GD at the stage of pre-therapeutic examination had an inversion of this relationship, that is the relationship between the concentration of TSH and the amount of Treg became positive. It can be concluded that the regulatory effect of the thyroid status in GD is focused on the stimulation of immune and, accordingly, autoimmune reactions since patients had a positive relationship between the TSH concentration and the number of activated B lymphocytes as well as between the level of TSHR-AB and activated T cells at this stage of the examination.

The relationship between the subpopulation composition of T and B lymphocytes was also investigated using correlation analysis. The only relationship revealed in the control group was characterized by the presence of a negative relationship between the number of activated T lymphocytes and the level of B1 cells in the blood. Negative relationships between the percentage of T lymphocytes and activated (expressing the CD25 antigen) cytotoxic T cells with activated (expressing the CD23 antigen) B lymphocytes and B2 cells have been found in GD. These relationships characterize the presence of

competitive processes in the cooperative interaction of T and B lymphocytes against the background of impaired thyroid status and the development of autoimmune processes in GD.

The serum TSH concentration in GD patients increased significantly and reached the control range in one month after RIT. However, the high level of TSHR-AB and the concentration of fT3 remained in the patients examined at this stage. A similar condition in the early post-radiation period with GD can be associated with both transient hyperthyroidism and relapse of the disease (due to the destructive effect of ¹³¹I on thyroid gland) as well as the ingress of intrathyroid autoantigens into the peripheral bloodstream [18, 24]. However, the number of activated total T lymphocytes in GD patients with transient hyperthyroidism was normalized due to a decrease in the levels of activated T helpers and cytotoxic T cells to control values. At the same time, the reduced content of cytotoxic T cells in the examined patients remained but the amount of Treg increased (more than 2 times). Similar changes in the phenotypic composition of blood T lymphocytes in GD patients characterize a decrease in functional activity (due to a decrease in the number of CD25 expressing T cells) as well as, accordingly, in autoreactivity (due to an increase in the number of Treg).

The number of B lymphocytes and activated memory B cells returned to normal in GD patients one month after RIT. But at the same time, an increase in the content of naive B lymphocytes and B2 cells relative to the initial level as well as a decrease in the number of activated B1 cells were found in GD patients relative to the control range. It is known that the development and maintenance of certain autoimmune processes in the body is associated with B1 cells [7, 11, 16]. Therefore, the changes in the subset composition of B lymphocytes in patients with GD one month after RIT also determine the trend towards normalization of the functional activity of B cells including from the standpoint of the implementation of autoimmune aggression.

The complete absence of correlations between the studied indicators of thyroid status and the immune system as well as between different subsets of T and B cells was revealed in GD patients a month after therapy against the background of characterized changes in the phenotypic composition of T and B lymphocytes. This condition is determined by an imbalance in the thyroid regulation of immune processes which develops against the background of the breakdown of thyrocytes due to the action of ¹³¹I. It can also be assumed that in this case, the different sensitivity of T and B lymphocytes to ¹³¹I in long-term period after RIT in GD take revenge and ultimately may realized as disorders of cooperative interaction during the development of the immune response.

Conclusion

Thus, it was found that the GD patients before the treatment with radioactive iodine had a high level of functional activity of the immune system cells which was determined by the expression of the CD25 antigen on T lymphocytes and the CD23 antigen on B lymphocytes. A high level of functional activity of the adaptive immunity cells in patients with GD was manifested against the background of an increased level of TSHR-AB. It was found with the help of correlation analysis that the state of the thyroid status in GD patients during the pre-therapeutic examination determined the stimulation of the functional activity of T and B lymphocytes and accordingly increased the level of autoimmune processes. At the same time, based on the analysis of the features of the relationships between the subset composition of cells, it can be assumed that there are competitive relationships in the cooperative interaction of T and B lymphocytes in GD patients. The number of activated T lymphocytes (including T helpers and cytotoxic T cells) decreased to control values in GD patients 1 month after RIT against the background of transient hyperthyroidism (while maintaining an increased concentration

of TSHR-AB). However, a low level of cytotoxic T lymphocytes in the blood and a significant increase in the Treg content in GD patients persisted during this period of the examination. A decrease in the number of B cells and activated memory B cells to the level of the control range was found in GD patients one month after RIT in the study of the phenotype of blood B lymphocytes. At the same time, an increase in the levels of naive B lymphocytes and B2 cells as well as a decrease in the number of activated B1 lymphocytes were detected in GD. All changes in the subset composition of T and B cells and in their phenotype developed against the background of a complete loss of relationships between the studied parameters, which characterized the loss of thyroid control of immune processes and the cooperative interaction of cells during the development of an immune response. In general, changes in the phenotype of T and B lymphocytes in the blood of patients with GD 1 month after treatment with radioactive iodine reflect a tendency towards a decrease in the functional activity of adaptive immunity cells which can also be realized in the inhibition of autoimmune processes.

References

1. Belenyuk V.D., Savchenko A.A., Borisov A.G., Kudryavtsev I.V. Features of peripheral blood B-cell subset phenotype are associated with clinical outcome of widespread purulent peritonitis. *Russian Journal of Infection and Immunity*, 2021, Vol. 11, no. 3, pp. 454-462. (In Russ.). doi: 10.15789/2220-7619-CBC-1397.
2. Corvilain B., Hamy A., Brunaud L., Borson-Chazot F., Orgiazzi J., Bensalem Hachmi L., Semrouni M., Rodien P., Lussery-Lepoutre C. Treatment of adult Graves' disease. *Ann. Endocrinol. (Paris)*, 2018, Vol. 79, no. 6, pp. 618-635.
3. Côté-Bigras S., Tran V., Turcotte S., Rola-Pleszczynski M., Verreault J., Rottembourg D. Impaired immune regulation after radioiodine therapy for Graves' disease and the protective effect of Methimazole. *Endocrine*, 2016, Vol. 52, no. 3, pp. 587-596.
4. Davies T.F., Andersen S., Latif R., Nagayama Y., Barbesino G., Brito M., Eckstein A.K., Stagnaro-Green A., Kahaly G.J. Graves' disease. *Nat. Rev. Dis. Primers.*, 2020, Vol. 6, no. 1, 52. doi: 10.1038/s41572-020-0184-y.
5. Du W., Dong Q., Lu X., Liu X., Wang Y., Li W., Pan Z., Gong Q., Liang C., Gao G. Iodine-131 therapy alters the immune/inflammatory responses in the thyroids of patients with Graves' disease. *Exp. Ther. Med.*, 2017, Vol. 13, no. 3, pp. 1155-1159.
6. Engeroff P., Caviezel F., Mueller D., Thoms F., Bachmann M.F., Vogel M. CD23 provides a noninflammatory pathway for IgE-allergen complexes. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2020, Vol. 145, no. 1, pp. 301-311.
7. Feng C., Li L., Zhou L., Li D., Liu M., Han S., Zheng B. Critical roles of the E3 ubiquitin ligase FBW7 in B-cell response and the pathogenesis of experimental autoimmune arthritis. *Immunology*, 2021, Vol. 164, no. 3, pp. 617-636.
8. Gallo D., Piantanida E., Gallazzi M., Bartalena L., Tanda M.L., Bruno A., Mortara L. Immunological drivers in Graves' Disease: NK Cells as a Master Switcher. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*, 2020, Vol. 11, 406. doi: 10.3389/fendo.2020.00406.
9. Giuliani C., Saji M., Bucci I., Napolitano G. Bioassays for TSH Receptor Autoantibodies, from FRTL-5 Cells to TSH Receptor-LH/CG Receptor Chimeras: The Contribution of Leonard D. Kohn. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*, 2016, Vol. 7, 103. doi: 10.3389/fendo.2016.00103.
10. Ji X., Wan J., Chen R., Wang H., Huang L., Wang S., Su Z., Xu H. Low frequency of IL-10-producing B cells and high density of ILC2s contribute to the pathological process in Graves' disease, which may be related to elevated-TRAb levels. *Autoimmunity*, 2020, Vol. 53, no. 2, pp. 78-85.
11. Kageyama Y., Katayama N. Ontogeny of human B1 cells. *Int. J. Hematol.*, 2020, Vol. 111, no. 5, pp. 628-633.
12. Klotz L., Burgdorf S., Dani I., Saijo K., Flossdorf J., Hucke S., Alferink J., Nowak N., Beyer M., Mayer G., Langhans B., Klockgether T., Waisman A., Eberl G., Schultze J., Famulok M., Kolanus W., Glass C., Kurts C., Knolle P.A. The nuclear receptor PPAR gamma selectively inhibits Th17 differentiation in a T cell-intrinsic fashion and suppresses CNS autoimmunity. *J. Exp. Med.*, 2009, Vol. 206, no. 10, pp. 2079-2089.

13. Kudryavtsev I.V., Subbotovskaya A.I. Application of six-color flow cytometric analysis for immune profile monitoring. *Medical Immunology (Russia)*, 2015, Vol. 17, no. 1, pp. 19-26. (In Russ.). doi: 10.15789/1563-0625-2015-1-19-26.
14. Li J.F., Xie L.J., Qin L.P., Liu Y.F., Zhang T.J., Huang Y., Cheng M.H. Apoptosis gene reprogramming of human peripheral blood mononuclear cells induced by radioiodine-131 ((131)I) irradiation. *Indian J. Med. Res.*, 2019, Vol. 149, no. 5, pp. 627-632.
15. Lindgren O., Asp P., Sundlöva., Tennvall J., Shahida B., Planck T., Åsman P., Lantz M. The effect of radioiodine treatment on trab, Anti-TPO, and Anti-TG in graves' disease. *Eur. Thyroid J.*, 2019, Vol. 8, no. 2, pp. 64-69.
16. Lushova A.A., Zheremyan E.A., Astakhova E.A., Spiridonova A.B., Byazrova M.G., Filatov A.V. B-lymphocyte subsets: functions and molecular markers. *Immunologiya*, 2019, Vol. 40, no. 6, pp. 63-76. (In Russ.). doi: 10.24411/0206-4952-2019-16009.
17. Mahmoodpoor A., Paknezhad S., Shadvar K., Hamishehkar H., Movassaghpour A.A., Sanaie S., Ghamari A.A., Soleimanpour H. Flow Cytometry of CD64, HLA-DR, CD25, and TLRs for Diagnosis and Prognosis of Sepsis in Critically Ill Patients Admitted to the Intensive Care Unit: A Review Article. *Anesth. Pain Med.*, 2018, Vol. 8, no. 6, e83128. doi: 10.5812/aapm.83128.
18. Riley A.S., McKenzie G.A.G., Green V., Schettino G., England R.J.A., Greenman J. The effect of radioiodine treatment on the diseased thyroid gland. *Int. J. Radiat. Biol.*, 2019, Vol. 95, no. 12, pp. 1718-1727.
19. Sánchez Á., Contreras-Jurado C., Rodríguez D., Regadera J., Alemany S., Aranda A. Hematopoiesis in aged female mice devoid of thyroid hormone receptors. *J. Endocrinol.*, 2020, Vol. 244, no. 1, pp. 83-94.
20. Savchenko A.A., Dudina M.A., Borisov A.G., Dogadin S.A., Kudryavtsev I.V., Moshev A.V., Mankovskiy V.A. Effects of helper and regulatory T cells upon phenotypic composition of blood B lymphocytes and thyroid gland in Graves' disease. *Medical Immunology (Russia)*, 2018, Vol. 20, no. 3, pp. 431-438. (In Russ.). doi: 10.15789/1563-0625-2018-3-431-438.
21. Struja T., Kutz A., Fischli S., Meier C., Mueller B., Recher M., Schuetz P. Is Graves' disease a primary immunodeficiency? New immunological perspectives on an endocrine disease. *BMC Med.*, 2017, Vol. 15, no. 1, 174. doi: 10.1186/s12916-017-0939-9.
22. Sutherland D.R., Ortiz F., Quest G., Illingworth A., Benko M., Nayyar R., Marinov I. High-sensitivity 5-, 6-, and 7-color PNH WBC assays for both Canto II and Navios platforms. *Cytometry B Clin. Cytom.*, 2018, Vol. 94, no. 4, pp. 637-651.
23. Sutton B.J., Davies A.M. Structure and dynamics of IgE-receptor interactions: FcεRI and CD23/FcεRII. *Immunol. Rev.*, 2015, Vol. 268, no. 1, pp. 222-235.
24. Troshina E.A., Sviridenko N.Yu., Vanushko V.E., Rumyantsev P.O., Fadeev V.V., Petunina N.A. Federal clinical recommendations of the Russian Association of Endocrinologists for the diagnosis and treatment of toxic goiter. *Clinical and Experimental Thyroidology*, 2014, Vol. 10, no. 3, pp. 8-19. (In Russ.).
25. Wiersinga W.M. Graves' Disease: Can It Be Cured? *Endocrinol. Metab. (Seoul)*, 2019, Vol. 34, no. 1, pp. 29-38.
26. Zhang D., Qiu X., Li J., Zheng S., Li L., Zhao H. MiR-23a-3p-regulated abnormal acetylation of FOXP3 induces regulatory T cell function defect in Graves' disease. *Biol. Chem.*, 2019, Vol. 400, no. 5, pp. 639-650.
27. Zohouri M., Mehdipour F., Razmkhah M., Faghih Z., Ghaderi A. CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ T cells: a distinct subset or a heterogeneous population? *Int. Rev. Immunol.*, 2021, Vol. 40, no. 4, pp. 307-316.

Авторы:

Савченко А.А. — д.м.н., профессор, руководитель лаборатории клеточно-молекулярной физиологии и патологии, Научно-исследовательский институт медицинских проблем Севера — обособленное подразделение ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук»; заведующий кафедрой физиологии ФГБОУ ВО «Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого» Министерства здравоохранения РФ, г. Красноярск, Россия

Дудина М.А. — к.м.н., ассистент кафедры внутренних болезней № 2 ФГБОУ ВО «Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого» Министерства здравоохранения РФ, г. Красноярск, Россия

Authors:

Savchenko A.A., PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Laboratory of Molecular and Cellular Physiology and Pathology, Research Institute of Medical Problems of the North, Krasnoyarsk Science Center, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences; Head, Department of Physiology, Krasnoyarsk State V. Voino-Yasenetsky Medical University, Krasnoyarsk, Russian Federation

Dudina M.A., (PhD (Medicine), Assistant Professor, Department of Internal Medicine No. 2, Krasnoyarsk State V. Voino-Yasenetsky Medical University, Krasnoyarsk, Russian Federation

Догадин С.А. — д.м.н., профессор кафедры внутренних болезней № 2 ФГБОУ ВО «Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого» Министерства здравоохранения РФ, г. Красноярск, Россия

Борисов А.Г. — к.м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории клеточно-молекулярной физиологии и патологии, Научно-исследовательский институт медицинских проблем Севера — обособленное подразделение ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр “Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук”»; доцент кафедры инфекционных болезней ФГБОУ ВО «Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого» Министерства здравоохранения РФ, г. Красноярск, Россия

Кудрявцев И.В. — к.б.н., заведующий лабораторией клеточной иммунологии, отдел иммунологии ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины»; доцент кафедры иммунологии ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Фомина Д.В. — аспирант кафедры внутренних болезней и иммунологии с курсом ПО ФГБОУ ВО «Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого» Министерства здравоохранения РФ, г. Красноярск, Россия

Беленюк В.Д. — младший научный сотрудник лаборатории клеточно-молекулярной физиологии и патологии, Научно-исследовательский институт медицинских проблем Севера — обособленное подразделение ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр “Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук”», г. Красноярск, Россия

Dogadin S.A., PhD, MD (Medicine), Professor, Department of Internal Medicine No. 2, Krasnoyarsk State V. Voino-Yasenetsky Medical University, Krasnoyarsk, Russian Federation

Borisov A.G., PhD (Medicine), Leading Research Associate, Laboratory of Molecular and Cellular Physiology and Pathology, Research Institute of Medical Problems of the North, Krasnoyarsk Science Center, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences; Associate Professor, Department of Infectious Diseases, Krasnoyarsk State V. Voino-Yasenetsky Medical University, Krasnoyarsk, Russian Federation

Kudryavtsev I.V., PhD (Biology), Head, Laboratory of Cellular Immunology, Department of Immunology, Institute of Experimental Medicine; Associate Professor, Department of Immunology, First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Fomina D.V., Postgraduate Student, Department of Internal Medicine, Krasnoyarsk State V. Voino-Yasenetsky Medical University, Krasnoyarsk, Russian Federation

Belenyuk V.D., Junior Research Associate, Laboratory of Molecular and Cellular Physiology and Pathology, Research Institute of Medical Problems of the North, Krasnoyarsk Science Center, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Krasnoyarsk, Russian Federation

Поступила 09.06.2022
Принята к печати 27.06.2022

Received 09.06.2022
Accepted 27.06.2022

КЛЕТОЧНЫЙ СОСТАВ И ЦИТОКИНОВЫЙ ПРОФИЛЬ СИНОВИАЛЬНОЙ ЖИДКОСТИ ПРИ РЕВМАТОИДНОМ АРТРИТЕ

Жданова Е.В., Костоломова Е.Г., Волкова Д.Е., Зыков А.В.

ФГБОУ ВО «Тюменский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ,
г. Тюмень, Россия

Резюме. Ревматоидный артрит занимает первое место среди хронических заболеваний суставов. Часто поражая лиц трудоспособного возраста, заболевание сопровождается значительным снижением качества жизни пациентов и их ранней инвалидизацией.

Ревматоидный артрит является иммуновоспалительным ревматическим заболеванием, следовательно, иммунная система обеспечивает формирование очага первичного повреждения, его персистенцию и периодическое обострение. Выяснение характера межклеточных взаимоотношений, опосредуемых с помощью цитокинов, на различных этапах хронического воспалительного процесса необходимо для разработки иммунотерапевтических подходов как для купирования обострения, так и поддержания ремиссии.

Цель исследования — оценить клеточный состав и цитокиновый профиль синовиальной жидкости у пациентов с ревматоидным артритом в стадии обострения и ремиссии.

В образцах синовиальной жидкости 60 больных ревматоидным артритом, 30 из которых находились в стадии обострения и 30 в стадии ремиссии, исследовали клеточный состав и цитокиновый профиль. В стадии обострения находились 21 женщина и 9 мужчин, их средний возраст составил $57,0 \pm 15,4$ года, с длительностью болезни $8,55 \pm 6,9$ года. Средний возраст 19 женщин и 11 мужчин, находившихся в стадии ремиссии, составил $53,5 \pm 10,9$ года, длительность болезни $6,9 \pm 5,8$ года.

Фенотипирование лейкоцитов осуществляли на проточном цитофлуориметре CytoFLEX (Beckman Coulter, США). Содержание цитокинов определяли иммуноферментным методом с использованием стандартного набора реактивов ООО «Протеиновый контур» (Россия). Регистрацию результатов проводили на фотометре Multiskan (Labsystems, Финляндия).

Во время обострения содержание лейкоцитов в синовиальной жидкости увеличилось в 2,4 раза по сравнению с ремиссией. Клеточный инфильтрат был представлен нейтрофилами, при этом содержание лимфоцитов и моноцитов не изменилось. Усиленная миграция нейтрофилов сопровождалась возрастанием уровней TNF α в 8 раз, по сравнению с ремиссией, и IL-1 β — в 6,3 раза. Абсолютное ко-

Адрес для переписки:

Жданова Екатерина Васильевна
ФГБОУ ВО «Тюменский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ
625027, Россия, г. Тюмень, ул. Котовского, 5/2.
Тел.: 8 (3452) 20-00-61.
E-mail: lenakost@mail.ru

Address for correspondence:

Zhdanova Ekaterina V.
Tyumen State Medical University
625027, Russian Federation, Tyumen, Kotovsky str., 5/2.
Phone: 7 (3452) 20-00-61.
E-mail: lenakost@mail.ru

Образец цитирования:

Е.В. Жданова, Е.Г. Костоломова, Д.Е. Волкова, А.В. Зыков «Клеточный состав и цитокиновый профиль синовиальной жидкости при ревматоидном артрите» // Медицинская иммунология, 2022. Т. 24, № 5. С. 1017-1026.
doi: 10.15789/1563-0625-CCA-2520
© Жданова Е.В. и соавт., 2022

For citation:

E.V. Zhdanova, E.G. Kostolomova, D.E. Volkova, A.V. Zykov
“Cellular composition and cytokine profile of synovial fluid in rheumatoid arthritis”, Medical Immunology (Russia)/ Meditsinskaya Immunologiya, 2022, Vol. 24, no. 5, pp. 1017-1026.
doi: 10.15789/1563-0625-CCA-2520
DOI: 10.15789/1563-0625-CCA-2520

личество CD3⁺T-лимфоцитов, CD16⁺CD56⁺B-клеток и CD3⁺CD19⁺NK при обострении было таким же, как и в ремиссии, однако при этом изменялась численность субпопуляций Т-лимфоцитов: число CD4⁺ лимфоцитов уменьшалась, а CD8⁺ возрастало, а также достоверно увеличивалось количество Трег-лимфоцитов и NKT-клеток. Увеличением в 4,3 раза концентрации IL-4 во время обострения свидетельствовало о преобладании Th2-иммунного ответа. Во время ремиссии в синовиальной жидкости в 1,5 раза возрастала концентрация IL-6 и в 2,5 раза IFN γ , что характерно для активации Th1-ответа.

Ключевые слова: ревматоидный артрит, синовиальная жидкость, нейтрофилы, Т-лимфоциты, В-лимфоциты, цитокины

CELLULAR COMPOSITION AND CYTOKINE PROFILE OF SYNOVIAL FLUID IN RHEUMATOID ARTHRITIS

Zhdanova E.V., Kostolomova E.G., Volkova D.E., Zykov A.V.

Tyumen State Medical University, Tyumen, Russian Federation

Abstract. Rheumatoid arthritis (RA) ranks first among chronic joint diseases. The disease often affects people at their working age, being accompanied by significant decrease in the life quality of patients and their early disability. Rheumatoid arthritis is an immunoinflammatory rheumatic disease. Therefore, the immune system provides evolving focus of primary damage, its persistence and periodic exacerbation. Elucidation of intercellular relationships mediated by cytokines at various stages of the chronic inflammatory process is required in order to develop immunotherapeutic approaches, aimed for both recovery from exacerbations and maintenance of remission state. Purpose of our study was to evaluate cellular composition and cytokine profile of synovial fluid in the patients with rheumatoid arthritis at acute phase and in remission state.

We have studied the samples of synovial fluid taken in 60 patients with rheumatoid arthritis, with 30 subjects being at acute stage of the disease, and 30 patients in remission. Cellular composition and cytokine profile were assessed in the clinical samples. There were 21 women and 9 men at the acute stage (57.0 ± 15.4 years old), with the disease duration of 8.55 ± 6.9 years. The average age of 19 women and 11 men examined in remission state was 53.5 ± 10.9 years, with comparable duration of illness (6.9 ± 5.8 years). The leukocyte phenotyping was performed with a CytoFLEX flow cytometer (Beckman Coulter, USA). The cytokine contents were measured by enzyme immunoassay using a standard set of reagents from the "Proteinovy Kontour" LLC (Russia). The results were registered by a Multiscan photometer (Labsystems, Finland).

During the disease exacerbation, the leukocyte contents in synovial fluid increased 2.4-fold, as compared to the remission values. The cellular infiltrate was represented by neutrophils, whereas the contents of lymphocytes and monocytes did not change. Increased migration of neutrophils was accompanied by an 8-fold increase in TNF α levels, compared with remission state, and IL-1 β levels were increased by 6.3 times. The absolute number of CD3⁺T lymphocytes, CD16⁺CD56⁺B cells, and CD3⁺CD19⁺NK during exacerbation was similar to the remission levels. However, the number of T cell subpopulations was changed, i.e., the number of CD4⁺ lymphocytes was decreased, and CD8⁺ cell counts were increased, like as numbers of Treg lymphocytes and NKT cells which showed a significant increase. A 4.3-fold increase in the IL-4 concentration during the RA exacerbation suggested the predominance of Th2 immune response. During remission, the concentrations of IL-6 and IFN γ in synovial fluid were increased, respectively, by 1.5 times and by 2.5 times, which is typical for activated Th1 response.

Keywords: rheumatoid arthritis, synovial fluid, neutrophils, T lymphocytes, B lymphocytes, cytokines

Введение

В структуре заболеваемости хроническими заболеваниями суставов первое место занимает ревматоидный артрит (РА), приводящий к инвалидизации уже через 3–5 лет после начала заболевания. Наиболее часто РА поражает лица трудоспособного возраста, при этом качество жизни больных значительно снижается.

РА является иммуновоспалительным ревматическим заболеванием, следовательно, именно иммунная система обеспечивает формирование очага воспаления с зонами первичной и вторичной альтерации, реакции микроциркуляторного русла, выход жидкой части крови, биоорганических соединений, электролитов из сосудов в ткани — экссудацию, скопление эмигрирующих клеток гематогенного происхождения и активацию резидентных клеток *in situ*, а также исход процесса в виде развития склероза и фиброза или различной степени регенерации клеток и тканей [4]. На разных этапах хронического воспаления формируются определенные взаимодействия между клетками, эмигрировавшими из сосудистого русла, и клетками — резидентами, которые опосредуются с помощью цитокинов и других биологически активных веществ [25]. Оценка характера межклеточных взаимоотношений и роли цитокинов необходима для разработки иммунотерапевтических подходов не только для достижения, но и для поддержания ремиссии.

Цель исследования — оценить клеточный состав и цитокиновый профиль синовиальной жидкости у пациентов в стадии обострения и ремиссии РА.

Материалы и методы

Образцы синовиальной жидкости были получены от 60 пациентов с ревматоидным артритом (РА), из которых 30 (21 женщина и 9 мужчин) находились в стадии обострения и 30 (19 женщин и 11 мужчин) в стадии ремиссии. Возраст больных, находившихся в стадии обострения, составил $57,0 \pm 15,4$ года, с длительностью болезни $8,55 \pm 6,9$ года. Средний возраст больных в стадии ремиссии составил $53,5 \pm 10,9$ года, длительность болезни $6,9 \pm 5,8$ года. Набор пациентов и верификация диагноза осуществлялись в отделении ревматологии ГБУЗ ТО «ОКБ № 1» согласно приказу № 21 «Об утверждении стандарта медицинской помощи больным ревматоидным артритом» от 13 января 2006 г.

Образцы синовиальной жидкости (СЖ) отбирали в вакуумные пробирки с добавлением КЗЭДТА. СЖ обрабатывали гиалуронидазой (Sigma Chemical Co, США) в течение 20 мин при 37°C для снижения вязкости, затем смешивали с равным объемом среды RPMI 1640. Выделение моноклеарных клеток (МНК) из СЖ проводили стандартным методом центрифугирования в градиенте плотности фиколл-урографина («Pharmacia», Швеция) ($\rho = 1,077 \text{ г/см}^3$). МНК СЖ окрашивали моноклональными антителами против CD3, CD4, CD8, CD16, CD56, CD19, CD25, CD127 (Beckman Coulter, США). После окрашивания образцы однократно отмывали избытком физиологического раствора при 1500 об/мин в течение 7 мин. Анализ проводили на проточном цитофлуориметре CytoFLEX (Beckman Coulter, США).

Содержание цитокинов определяли иммуноферментным методом с использованием стандартного набора реактивов ООО «Протеиновый контур» (Россия). В день проведения исследований пробы размораживали. Анализ проводили согласно инструкции, прилагаемой к набору фирмой изготовителем. Регистрацию результатов проводили на фотометре Multiskan (Labsystems, Финляндия).

Статистическую обработку результатов проводили с использованием программ Excel и Statistica 7.0 для WinXP. Статистическую достоверность различий между двумя группами данных оценивали по критерию t Стюдента.

Результаты

В синовиальной жидкости у больных с обострением РА содержание лейкоцитов было значительно выше, чем в стадию ремиссии. Если в период ремиссии в гемограмме СЖ было одинаковое количество нейтрофилов и лимфоцитов, то в период обострения содержание нейтрофилов увеличилось в 4 раза, а число лимфоцитов и моноцитов осталось прежним (табл. 1, рис. 1).

Популяционный состав лимфоцитов при обострении также не изменялся (табл. 2, рис. 2). Абсолютное количество $\text{CD3}^+\text{T}$ -лимфоцитов, $\text{CD16}^+\text{CD56}^+\text{B}$ -клеток и $\text{CD3}^+\text{CD19}^+\text{NK}$ при обострении было таким же, как и в ремиссии. Несмотря на то, что количество лимфоцитов и их популяционный состав не зависели от фазы заболевания, во время обострения изменялась численность субпопуляций Т-лимфоцитов: число CD4^+ лимфоцитов уменьшалась, а CD8^+ возрастало (табл. 2, рис. 3). Соотношение $\text{CD4}/\text{CD8}$ в СЖ на фоне обострения составило 0,49, в то

ТАБЛИЦА 1. КЛЕТочный СОСТАВ СИНОВИАЛЬНОЙ ЖИДКОСТИ ВО ВРЕМЯ РЕМИССИИ И ОБОСТРЕНИЯ РА

TABLE 1. CELLULAR COMPOSITION OF SYNOVIAL FLUID DURING REMISSION AND EXACERBATION OF RA

Исследуемый параметр Tested parameter	Ремиссия РА Remission RA	Обострение РА Exacerbation RA
Лейкоциты, $10^9/\text{л}$ Leukocytes, $10^9/\text{L}$	$8,30 \pm 4,25$	$20,12 \pm 1,80^*$
Нейтрофилы $10^9/\text{л}$ Neutrophils $10^9/\text{L}$	$3,60 \pm 1,88$	$15,65 \pm 1,59^*$
Лимфоциты $10^9/\text{л}$ Lymphocytes $10^9/\text{L}$	$4,197 \pm 2,200$	$3,86 \pm 0,53$
Моноциты $10^9/\text{л}$ Monocytes $10^9/\text{L}$	$0,510 \pm 0,287$	$0,660 \pm 0,099$

Примечание. * – обозначены величины, достоверно отличающиеся от показателей в стадии ремиссии ($p < 0,05$).

Note. *, values are indicated that are significantly different from those in the remission stage ($p < 0.05$).

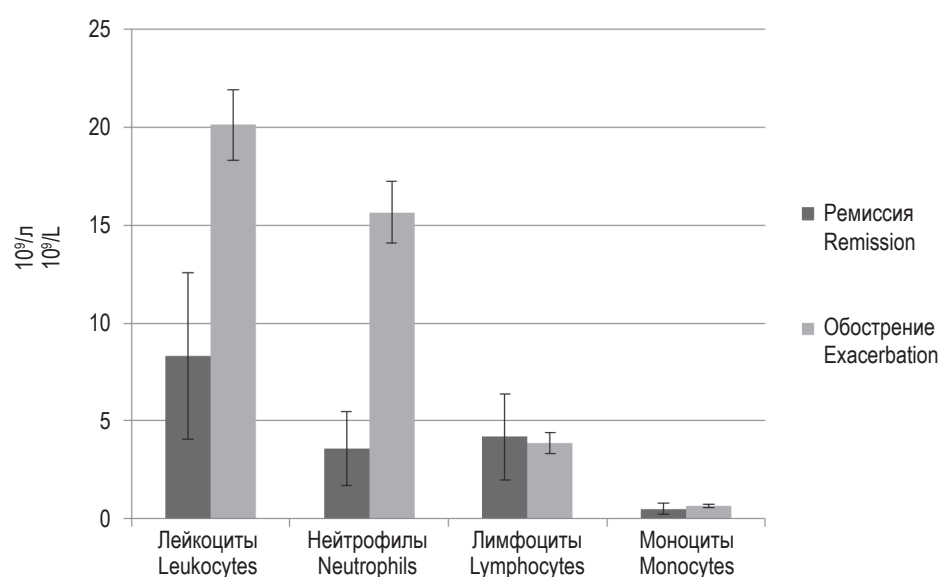


Рисунок 1. Клеточный состав синовиальной жидкости во время ремиссии и обострения РА

Figure 1. Cellular composition of synovial fluid during remission and exacerbation of RA

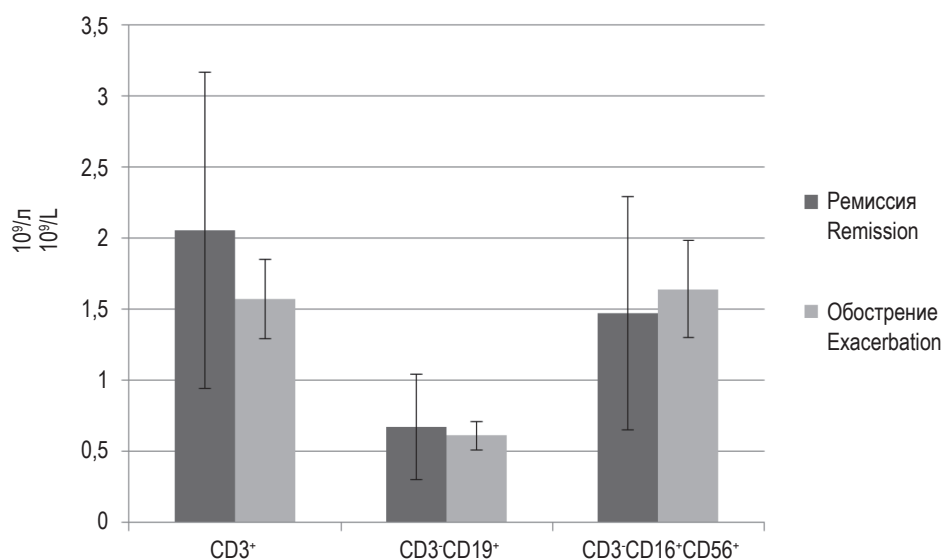


Рисунок 2. Популяционный состав лимфоцитов в СЖ во время ремиссии и обострения РА

Figure 2. Population composition of lymphocytes in synovial fluid during remission and exacerbation of RA

ТАБЛИЦА 2. ПОПУЛЯЦИОННЫЙ СОСТАВ ЛИМФОЦИТОВ В СЖ ВО ВРЕМЯ РЕМИССИИ И ОБОСТРЕНИЯ РА

TABLE 2. POPULATION COMPOSITION OF LYMPHOCYTES IN SYNOVIAL FLUID DURING REMISSION AND EXACERBATION OF RA

Исследуемый параметр Tested parameter	Ремиссия РА Remission RA	Обострение РА Exacerbation RA
CD3 ⁺ , 10 ⁹ /л CD3 ⁺ , 10 ⁹ /L	2,05±1,11	1,57±0,28
CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD8 ⁺ , 10 ⁹ /л CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD8 ⁺ , 10 ⁹ /L	0,80±0,34	0,224±0,110*
CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD8 ⁺ , 10 ⁹ /л CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD8 ⁺ , 10 ⁹ /L	0,21±0,07	0,46±0,10*
Treg, 10 ⁹ /л (CD4 ⁺ CD25 ⁺ CD127 ⁻) Treg, 10 ⁹ /L (CD4 ⁺ CD25 ⁺ CD127 ⁻)	0,12±0,02	0,214±0,025*
CD3 ⁺ CD16 ⁺ CD56 ⁺ , 10 ⁹ /л CD3 ⁺ CD16 ⁺ CD56 ⁺ , 10 ⁹ /L	0,125±0,012	0,174±0,018*
CD3 ⁺ CD19 ⁺ , 10 ⁹ /л CD3 ⁺ CD19 ⁺ , 10 ⁹ /L	0,67±0,37	0,61±0,10
CD3 ⁺ CD16 ⁺ CD56 ⁺ , 10 ⁹ /л CD3 ⁺ CD16 ⁺ CD56 ⁺ , 10 ⁹ /L	1,47±0,82	1,64±0,34

Примечание. См. примечание к таблице 1.

Note. As for Table 1.

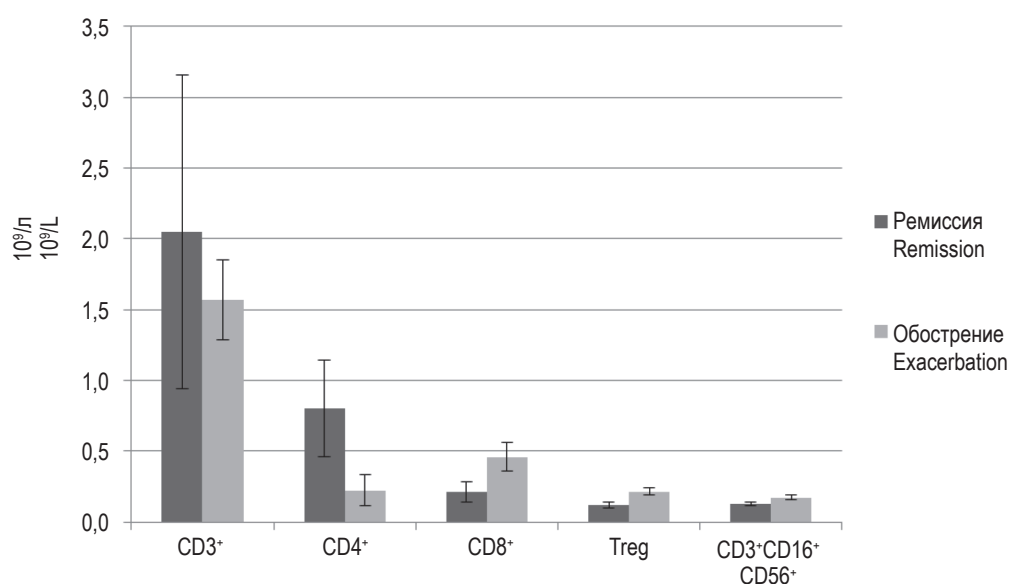


Рисунок 3 Субпопуляции Т-лимфоцитов в СЖ во время ремиссии и обострения РА

Figure 3. T lymphocyte subpopulations of in synovial fluid during remission and exacerbation of RA

ТАБЛИЦА 3. СОДЕРЖАНИЕ ЦИТОКИНОВ В СЖ У ПАЦИЕНТОВ С РА, пг/мл

TABLE 3. CONTENT OF CYTOKINES IN SYNOVIAL FLUID IN PATIENTS WITH RHEUMATOID ARTHRITIS, pg/mL

Цитокин Cytokine	TNF α	IL-1 β	IL-4	IL-6	IFN γ
Ремиссия РА Remission RA n = 30	7,39±2,01	10,53±4,19	4,25±0,75	191,09±38,90	70,99±23,39
Обострение РА Exacerbation RA n = 30	59,02±31,48*	65,827±8,415*	18,33±8,72*	119,49±24,60*	28,08±8,86*

Примечание. См. примечание к таблице 1.

Note. As for Table 1.

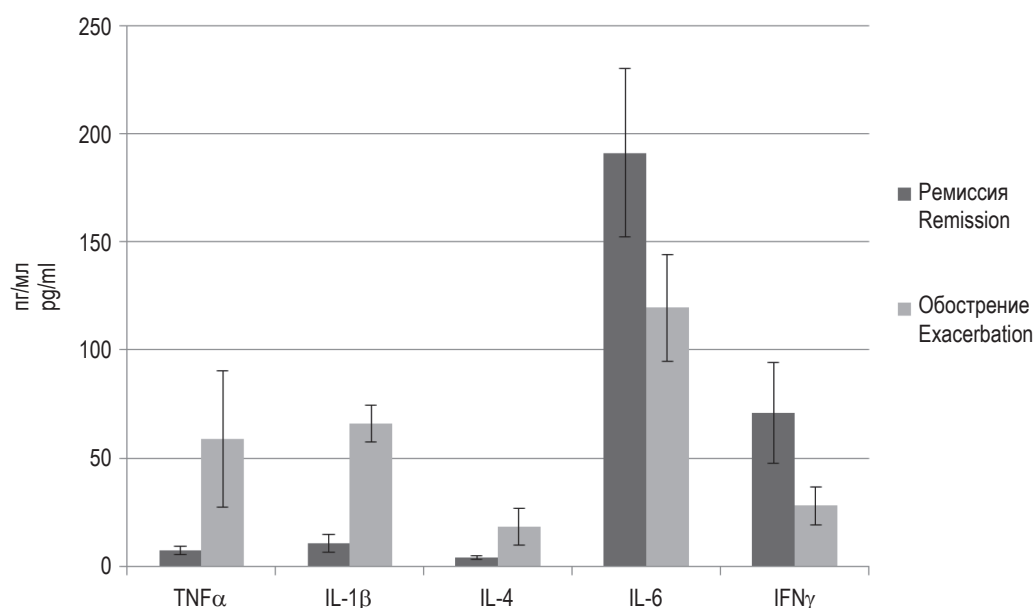


Рисунок 4. Содержание цитокинов в СЖ во время ремиссии и обострения РА

Figure 4. Cytokine levels in the synovial fluid during remission and exacerbation of RA

время как при ремиссии оно было 3,88. При обострении в СЖ достоверно возросло количество Treg-лимфоцитов и NKT-клеток.

При оценке уровня цитокинов в СЖ установлено, что при обострении РА уровень TNFα повышается в 8 раз по сравнению с ремиссией, IL-1β — в 6,3 раза, IL-4 — в 4,3 раза. При этом уровень IL-6 уменьшается в 1,5 раза, а IFNγ — в 2,5 раза (табл. 3, рис. 4).

Обсуждение

Клеточный и цитокиновый профили СЖ зависят от фазы РА. При обострении РА в 2,4 раза увеличивается количество лейкоцитов за счет нейтрофилов. Усиленный синтез макрофагами, синовиоцитами, хондроцитами, остеокластами цитокинов — IL-1β и TNFα — обуславливает выработку хемокинов и простагландинов, гиперэкспрессию молекул адгезии и активную миграцию нейтрофилов в СЖ [19]. В свою очередь нейтрофилы, находящиеся в синовиальной жидкости при РА, сами секретируют ряд провоспалительных факторов семейства TNF, включая TNFα [5, 6, 16], стимулируя выход гранулоцитов в очаг воспаления. Кроме того, TNFα может индуцировать образование нейтрофильных внеклеточных ловушек, которые значительно усиливают продукцию IL-6, IL-8, хемокинов и молекул адгезии синовиальными фибробластами при РА.

Нейтрофилы, гибнущие после фагоцитоза, оставляют после себя в экссудате цитотоксические факторы, в том числе свободные радикалы, которые непосредственно повреждают внутрисуставные структуры [8, 12, 17]. Кроме того, в нейтрофилах синтезируется активатор рецептора лиганда ядерного фактора каппа-В (RANKL) [21], а сам лиганд остеопротегерина усиленно образуется под действием TNFα. Взаимодействие лиганда с рецептором обеспечивает дифференцировку остеокластов, что ведет к резорбции костной ткани при РА [9], а также способствует активации металлопротеиназ и коллагеназ. IL-1β также активирует матриксные протеиназы и ферменты, способствующие разрушению хряща и костной ткани.

Показано, что нейтрофилы, экспрессируя МНС II, способны презентировать антиген *in vitro* и *ex vivo* аутологичным CD4⁺T-клеткам памяти и активировать их пролиферацию [11, 21]. Кроме того, нейтрофильные клетки способны синтезировать фактор активации В-клеток (BAFF) [24], который индуцирует их пролиферацию и способствует выработке аутоантител. Таким образом, активированные нейтрофилы могут регулировать функции Т- и В-лимфоцитов.

В стадию ремиссии в СЖ преобладает IL-6, который не влияет на функции нейтрофилов [26].

Несмотря на неизменное количество лимфоцитов в СЖ и их популяционный состав, а также фенотип Т-клеток изменяется в зависимости от

фазы хронического процесса. Если во время ремиссии преобладали $CD3^+CD4^+$, то во время обострения — $CD3^+CD8^+$.

Синовialesные $CD4^+$ Т-клетки больных РА экспрессируют рецептор-активатор лиганда ядерного фактора (RANKL), который взаимодействует с RANK, экспрессируемым на моноцитах, индуцируя их дифференцировку в остеокласты и, следовательно, вызывая эрозию кости. Моноциты являются предшественниками остеокластов, представляющих собой единственный тип клеток, способный разрушать кость. Если в норме резорбция кости остеокластами и образование кости остеобластами жестко регулируются для поддержания целостности скелета и гомеостаза, то при РА повышенная активность остеокластов в суставе приводит к несбалансированной эрозии кости [15]. Кроме того, опосредованно через связанные с мембраной $IFN\gamma$, $TNF\alpha$ и $IL-1\alpha$ $CD4^+$ Т-клетки ингибируют синтез коллагена фибробластоподобными синовиоцитами [10, 22].

Во время ремиссии преобладает Th1-иммунный ответ, о чем свидетельствует возрастание концентраций $IFN\gamma$ и $IL-6$. $IFN\gamma$ замедляет внутрисуставную деструкцию, снижает продукцию $IL-1$ и матриксных металлопротеиназ и пролиферацию фибробластоподобных синовиоцитов, но при этом тормозит коллаген-синтетическую функцию фибробластов [10, 18]. В свою очередь $IL-6$ потенцирует дегенеративные нарушения в костной ткани через активацию пролиферации синовиальных фибробластов и стимуляцию остеокластов. За счет дифференцировки остеокластов, увеличения активности протеолитического фермента агреканазы и ускорения дегенерации протеогликана даже во время ремиссии прогрессируют околоуставной остеопороз и суставная деструкция.

Во время обострения преобладает Th2-иммунный ответ, что подтверждается увеличением концентрации $IL-4$ в СЖ. Этот цитокин ингибирует продукцию Th1-цитокинов, в том числе $IL-6$ и $IFN\gamma$, но при этом активирует пролиферацию и активность В-клеток. Несмотря на то, что количество $CD16^+CD56^+$ В-клеток в СЖ при обострении не изменилось, их способность к выработке аутоантител может возрастать, так как степень экспрессии их мембраносвязанных рецепторов к $TNF\alpha$ и $IL-1\beta$ при РА реализуется как через процент позитивных клеток, так и через увеличение или уменьшение плотности распределения рецепторов на них [1, 13]. В свою очередь $IL-4$ способен подавлять пролиферацию синовиоцитов.

При обострении в СЖ увеличилось количество Treg. Несмотря на то, что Treg-клетки ингибируют аутоиммунный ответ, если их количество и/или функция аномальны, родственные антигены и молекулы DR вызывают амплификацию иммунного каскада, что приводит к быстрому увеличению уровней различных цитокинов в организме, в частности $IL-2$, а также стимуляции продукции макрофагами многих воспалительных цитокинов, таких как $IL-1$, $IL-6$ и $IL-8$, в синовиальной оболочке суставов [20].

Возрастание в СЖ количества $CD8^+$ Т-клеток может быть связано с их цитотоксическим потенциалом, однако другие исследования утверждают обратное: они играют в основном регулируемую роль в воспаленных суставах [7]. При этом у пациентов с РА количество $CD8^+$ Т-клеток коррелирует с уровнями провоспалительных цитокинов в синовиальной жидкости, что указывает на их способность продуцировать большое количество цитокинов ($IL-10$, а также $IFN\gamma$, $IL-4$ и $IL-5$) и, таким образом, активно способствовать воспалению и дегенерации суставов [14].

Увеличение в СЖ содержания $CD3^+CD16^+CD56^+$ НКТ-клеток во время обострения также свидетельствуют как о непосредственной роли цитотоксического клеточно-опосредованного механизма в повреждении сустава, так и о стимуляции неспецифической цитотоксичности других элементов врожденного иммунитета — НК-клеток и макрофагов.

Заключение

Таким образом, клеточный состав синовиальной жидкости и ее цитокиновый профиль зависят от фазы хронического воспалительного процесса. Движущей силой обострения являются нейтрофилы, а также $CD3^+CD8^+$ и $CD3^+CD16^+CD56^+$ клетки при участии Treg. Активация Th2-иммунного ответа усиливает гуморальные механизмы повреждения. Цитокиноопосредованная стимуляция клеток, эмигрировавших внутрь сустава, и резидентов способствует повреждению внутрисуставных поверхностей и костей.

Модификация иммунного ответа и цитокинового профиля СЖ в период ремиссии направлена на стимуляцию репаративных процессов, однако формирование новых межклеточных взаимоотношений обеспечивает ремоделирование соединительной ткани суставов на основе ее склероза и фиброза.

Список литературы / References

1. Альшевская А.А., Лопатникова Ю.А., Шкаруба Н.С. Экспрессия мембраносвязанных рецепторов к TNF α на моноцитах при atopическом дерматите и ревматоидном артрите // Цитокины и воспаление, 2015. Т. 14, № 1. С. 18-23. Alshevskaya A.A., Lopatnikova Yu.A., Shkaruba N.S. Expression of membrane-bound TNF α receptors on monocytes in atopic dermatitis and rheumatoid arthritis. *Tsitokiny i vospaleniye = Cytokines and Inflammation*, 2015, Vol. 14, no. 1, pp. 18-23. (In Russ.)]
2. Занин С.А., Онищук В.В., Каде А.Х., Кадомцев Д.В., Пасечникова Е.А. цитокиновый шторм» в патогенезе ревматоидного артрита и деформирующего остеоартроза крупных суставов // Современные проблемы науки и образования, 2017. № 3. [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://science-education.ru/ru/article/view?id=26398>. [Zanin S.A., Onischuk V.V., Kade A.Kh., Kadomtsev D.V., Pasechnikova E.A. cytokine storm» in the pathogenesis of rheumatoid arthritis and deforming osteoarthritis of large joints. *Sovremennyye problemy nauki i obrazovaniya = Modern Problems of Science and Education*, 2017, no. 3. [Electronic resource]. Access mode: <https://science-education.ru/ru/article/view?id=26398>. (In Russ.)]
3. Новиков А.А., Александрова Е.Н., Диатроптова М.А., Насонов Е.Л. Роль цитокинов в патогенезе ревматоидного артрита // Научно-практическая ревматология, 2010. Т. 48, № 2. С. 71-82. [Novikov A.A., Aleksandrova E.N., Diatroptova M.A., Nasonov E.L. The role of cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Nauchno-prakticheskaya revmatologiya = Scientific and Practical Rheumatology*, 2010, Vol. 48, no. 2, pp. 71-82. (In Russ.)]
4. Саидов М.З. Патогенетическое значение клеточного инфильтрата при иммуновоспалительных ревматических заболеваниях // Медицинская иммунология, 2021. Т. 23, № 6. С. 1239-1270. [Saidov M.Z. Pathogenetic significance of cellular infiltrate in immunoinflammatory rheumatic diseases. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2021, Vol. 23, no. 6, pp. 1239-1270. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-PVO-2386.
5. Alunno A., Carubbi F., Giacomelli R., Gerli R. Cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis: new players and therapeutic targets. *BMC Rheumatol.*, 2017, Vol. 1, 3. doi: 10.1186/s41927-017-0001-8.
6. Brennan F., McInnes I. Evidence that cytokines play a role in rheumatoid arthritis. *J. Clin. Invest.*, 2008, Vol. 118, no. 11, pp. 3537-3545.
7. Carvalheiro H., da Silva J.A., Souto-Carneiro M.M. Potential roles for CD8(+) T cells in rheumatoid arthritis. *Autoimmun. Rev.*, 2013, Vol. 12, no. 3, pp. 401-409.
8. Catrina A.I., Svensson C., Malmström V., Schett G., Klareskog L. Mechanisms leading from systemic autoimmunity to joint-specific disease in rheumatoid arthritis. *Nat. Rev. Rheumatol.*, 2017, Vol. 13, no. 2, pp. 79-86.
9. Chakravarti A., Raquil M.A., Tessier P., Poubelle P.E. Surface RANKL of Toll-like receptor 4-stimulated human neutrophils activates osteoclastic bone resorption. *Blood*, 2009, Vol. 114, no. 8, pp. 1633-1644.
10. Cho M.L., Yoon C.H., Hwang S.Y., Park M.K., Min S.Y., Lee S.H., Park S.H., Kim H.Y. Effector function of type II collagen-stimulated T cells from rheumatoid arthritis patients: Cross-talk between T cells and synovial fibroblasts. *Arthritis Rheum.*, 2004, Vol. 50, no. 3, pp. 776-784.
11. Cross A., Bucknall R.C., Cassatella M.A., Edwards S.W., Moots R.J. Synovial fluid neutrophils transcribe and express class II major histocompatibility complex molecules in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.*, 2003, Vol. 48, no. 10, pp. 2796-2806.
12. den Broeder A.A., Wanten G.J.A., Oyen W.J.G. Neutrophil migration and production of reactive oxygen species during treatment with a fully human anti-tumor necrosis factor-alpha monoclonal antibody in patients with rheumatoid arthritis. *J. Rheumatol.*, 2003, Vol. 30, pp. 232-237.
13. Humby F., Bombardieri M., Manzo A., Kelly S., Blades M.C., Kirkham B., Spencer J., Pitzalis C. Ectopic lymphoid structures support ongoing production of class-switched autoantibodies in rheumatoid synovium. *PLoS Med.*, 2009, Vol. 6, no. 1, e1. doi: 10.1371/journal.pmed.0060001.
14. Hussein M.R., Fathi N.A., el-Din A.M., Hassan H.I., Abdullah F., al-Hakeem E., Backer E.A. Alterations of the CD4(+), CD8 (+) T cell subsets, interleukins-1beta, IL-10, IL-17, tumor necrosis factor-alpha and soluble intercellular adhesion molecule-1 in rheumatoid arthritis and osteoarthritis: preliminary observations. *Pathol. Oncol.*, 2008, Vol. 14, no. 3, pp. 321-328.
15. Kotake S., Udagawa N., Hakoda M., Mogi M., Yano K., Tsuda E., Takahashi K., Furuya T., Ishiyama S., Kim K.J., Saito S., Nishikawa T., Takahashi N., Togari A., Tomatsu T., Suda T., Kamatani N. Activated human T cells directly induce osteoclastogenesis from human monocytes: Possible role of T cells in bone destruction in rheumatoid arthritis patients. *Arthritis Rheum.*, 2001, Vol. 44, no. 5, pp. 1003-1012.
16. Lupia E., Montrucchio G., Battaglia E., Modena V., Camussi G. Role of tumor necrosis factor- α and platelet-activating factor in neoangiogenesis induced by synovial fluids of patients with rheumatoid arthritis. *Eur. J. Immunol.*, 1996, Vol. 26, no. 8, pp. 1690-1694.
17. Mantovani A., Cassatella M., Costantini C., Jaillon S. Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity (in Eng). *Nat. Rev. Immunol.*, 2011, Vol. 11, no. 8, pp. 519-531.

18. McInnes I., Schett G. Cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Nat. Rev. Immunol.*, 2007, Vol. 7, no. 6, pp. 429-442.
19. McInnes I.B., Leung B.P., Sturrock R.D., Field M., Liew F.Y. Interleukin-15 mediates T cell-dependent regulation of tumor necrosis factor- α production in rheumatoid arthritis. *Nat. Med.*, 1997, Vol. 3, no. 2, pp. 189-195.
20. Möttönen M., Heikkinen J., Mustonen L., Isomäki P., Luukkainen R., Lassila O. CD4⁺CD25⁺ T cells with the phenotypic and functional characteristics of regulatory T cells are enriched in the synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis. *Clin. Exp. Immunol.*, 2005, Vol. 140, iss. 2, pp. 360-367.
21. Nauseef W.M., Borregaard N. Neutrophils at work. *Nat. Immunol.*, 2014, Vol. 15, no. 7, pp. 602-611.
22. Raza K., Falciani F., Curnow J., Ross E.J., Lee C.Y., Akbar A.N., Lord J.M., Gordon C., Buckley C.D., Salmon M. Early rheumatoid arthritis is characterized by a distinct and transient synovial fluid cytokine profile of T cell and stromal cell origin. *Arthr. Res. Ther.*, 2005, Vol. 7, no. 4, pp. 784-795.
23. Rezzonico R., Burger D., Dayer J.M. Direct contact between T lymphocytes and human dermal fibroblasts or synoviocytes down-regulates types I and III collagen production via cell-associated cytokines. *J. Biol. Chem.*, 1998, Vol. 273, no. 30, pp. 18720-18728.
24. Tanaka S. Emerging anti-osteoclast therapy for rheumatoid arthritis. *J. Orthop. Sci.*, 2018, Vol. 23, no. 5, pp. 717-721.
25. Veale D.J., Orr C., Fearon U. Cellular and molecular perspectives in rheumatoid arthritis. *Semin. Immunopathol.*, 2017, Vol. 39, no. 4, pp. 343-354.
26. Vono M., Lin A., Norrby-Teglund A., Koup R.A., Liang F., Loré K. Neutrophils acquire the capacity for antigen presentation to memory CD4⁺ T cells *in vitro* and *ex vivo*. *Blood*, 2017, Vol. 129, no. 14, pp. 1991-2001.
27. Wright H.L., Cross A.L., Edwards S.W., Moots R.J. Effects of IL-6 and IL-6 blockade on neutrophil function *in vitro* and *in vivo*. *Rheumatology*, 2014, Vol. 53, no. 7, pp. 1321-1331.

Авторы:

Жданова Е.В. — д.м.н., профессор, заведующая кафедрой патологической физиологии ФГБОУ ВО «Тюменский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Тюмень, Россия

Костоломова Е.Г. — к.б.н., доцент кафедры микробиологии ФГБОУ ВО «Тюменский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Тюмень, Россия

Authors:

Zhdanova E.V., PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Department of Pathological Physiology, Tyumen State Medical University, Tyumen, Russian Federation

Kostolomova E.G., PhD (Biology), Associate Professor, Department of Microbiology, Tyumen State Medical University, Tyumen, Russian Federation

Волкова Д.Е. — студентка лечебного факультета
ФГБОУ ВО «Тюменский государственный медицинский
университет» Министерства здравоохранения РФ,
г. Тюмень, Россия

Volkova D.E., Student, Faculty of Medicine, Tyumen State
Medical University, Tyumen, Russian Federation

Зыков А.В. — студент лечебного факультета
ФГБОУ ВО «Тюменский государственный медицинский
университет» Министерства здравоохранения РФ,
г. Тюмень, Россия

Zykov A.V., Student, Faculty of Medicine, Tyumen State
Medical University, Tyumen, Russian Federation

Поступила 17.05.2022
Принята к печати 22.05.2022

Received 17.05.2022
Accepted 22.05.2022

ПРИМЕНЕНИЕ БИОИНФОРМАТИЧЕСКОГО АНАЛИЗА ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ГЕНОВ-КАНДИДАТОВ, АССОЦИИРОВАННЫХ С НАСЛЕДСТВЕННЫМ АНГИОТЕКОМ

Печникова Н.А.¹, Останкова Ю.В.¹, Тотолян Арег А.^{1,2}

¹ ФБУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Санкт-Петербург, Россия

² ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Резюме. Первичные иммунодефициты (ПИД) — гетерогенная группа наследственных заболеваний, приводящих к нарушению иммунной защиты. Зачастую диагноз невозможно поставить без выявления мутаций, приводящих к развитию заболевания. Для многих ПИД отсутствует четкое представление об этиологии, патогенезе и задействованных генах. Очевидна необходимость определения генов-кандидатов, потенциально способных приводить к развитию того или иного ПИД.

Наследственный ангиоотек (НАО) — редкое генетически детерминированное заболевание, сопровождающееся рецидивирующими отеками мягких тканей и подслизистых оболочек, представляющими угрозу жизни пациентов. Диагноз ставят с учетом клинической картины, семейного анамнеза, лабораторных показателей значений C1-ингибитора эстеразы, компонента 4 комплемента, компонента Iq комплемента, антител к C1 и генетическом тестировании на ряд мутаций в генах *SERPING1*, *F12*, *PLG*, *ANGPT1*, *KNG1*, *MYOF*, *HS3ST6*. Однако в патогенезе могут быть задействованы другие гены, негативный эффект мутаций которых еще не изучен. Поскольку в развитии не моногенных заболеваний, к каковым относится и НАО, может быть задействована обширная сеть генов, особенно важным представляется определение групп наиболее вероятных генов-кандидатов, предположительно участвующих в развитии патологии.

Цель — выявить с помощью биоинформатического анализа гены-кандидаты развития/патогенеза НАО и раскрыть их биологический контекст.

В качестве основы для анализа использовали группу генов, мутации в которых достоверно ассоциированы с НАО: *SERPING1*, *F12*, *PLG*, *ANGPT1*, *KNG1*, *MYOF*, *HS3ST6*. Для построения генетических и белок-белковых сетей, идентификации биологического контекста отобранных генов-кандидатов задействовали ряд веб-ресурсов: HumanNetv3, GeneMania, FUMA GWAS в режиме GENE2FUNC.

Идентифицированы сто потенциальных генов-кандидатов, мутации в которых могут быть связаны с НАО. Определен биологический контекст выявленных генов. Данные биологического контекста, генетических и белок-белковых взаимодействий позволили исключить ряд генов из списка наиболее вероятных участников патогенеза и разделить оставшиеся на группы с большим или меньшим

Адрес для переписки:

Останкова Юлия Владимировна
ФБУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера»
197101, Россия, Санкт-Петербург, ул. Мира, 14.
Тел.: 8 (812) 233-20-92.
E-mail: shenna1@yandex.ru

Address for correspondence:

Ostankova Yulia V.
Saint Petersburg Pasteur Institute
1197101, Russian Federation, St. Petersburg, Mira str., 14.
Phone: 7 (812) 233-20-92.
E-mail: shenna1@yandex.ru

Образец цитирования:

Н.А. Печникова, Ю.В. Останкова, Арег А. Тотолян
«Применение биоинформатического анализа для
выявления генов-кандидатов, ассоциированных
с наследственным ангиотеком» // Медицинская
иммунология, 2022. Т. 24, № 5. С. 1027-1046.
doi: 10.15789/1563-0625-AOB-2579

© Печникова Н.А. и соавт., 2022

For citation:

N.A. Pechnikova, Yu.V. Ostankova, Areg A. Totolian
“Application of bioinformatical analysis to identify candidate
genes associated with hereditary angioedema”, *Medical
Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2022,
Vol. 24, no. 5, pp. 1027-1046.
doi: 10.15789/1563-0625-AOB-2579

DOI: 10.15789/1563-0625-AOB-2579

потенциалом вовлеченности. К группе наиболее вероятных генов-кандидатов НАО можно отнести: *PLAT, HRG, SERPINA1, SERPINF2, MASP2, GRB14, C1QBP, DOK2, KLKB1, F11, TEK, KLK10, KRT1, APOH, CPB2, F2*.

Полученные результаты могут оказать существенную помощь в изучении молекулярного механизма НАО, а также в диагностике и прогнозе течения заболевания. Выявленные гены-кандидаты потенциально способны служить диагностическими биомаркерами для пациентов с необъяснимым ангиоотеклом.

Применение биоинформатических методов позволяет определить список генов-кандидатов, предположительно вовлеченных в патогенез заболевания или усугубляющих его течение, получить актуальную информацию о биологическом контексте выявленных генов. Понимание генетических основ и патофизиологии ПИД может способствовать определению новых диагностических и терапевтических целей.

Ключевые слова: биоинформатический анализ, первичные иммунодефициты, наследственный ангиоотек, гены-кандидаты, патогенетически значимые мутации, анализ *in silico*

APPLICATION OF BIOINFORMATICAL ANALYSIS TO IDENTIFY CANDIDATE GENES ASSOCIATED WITH HEREDITARY ANGIOEDEMA

Pechnikova N.A.^a, Ostankova Yu.V.^a, Totolian Areg A.^{a, b}

^a Saint Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation

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

Abstract. Primary immunodeficiencies (PID) are a heterogeneous group of hereditary diseases that lead to impaired immune defense. Often, the diagnosis cannot be made without identifying mutations that lead to the development of the disease. For many PIDs, there is no clear understanding of the etiology, pathogenesis, and genes involved. There is an obvious need to identify candidate genes potentially capable of leading to the development of PIDs.

Hereditary angioedema (HAE) is a rare genetically determined disease, accompanied by recurrent edema of soft tissues and submucosal membranes, posing a threat to the life of patients. Diagnosis is based on the clinical presentation, family history, laboratory values of C1-esterase inhibitor, complement component 4, complement component 1q, antibodies to C1 and genetic testing for a number of mutations in the genes *SERPING1, F12, PLG, ANGPT1, KNG1, MYOF, HS3ST6*. However, pathogenesis may involve other genes in which the negative effect of mutations has not yet been studied. HAE is a non-monogenic disease that may involve an extensive network of genes. It seems important to determine the groups of the most probable candidate genes presumably involved in the development of pathology.

Aim – to identify, using bioinformatics analysis, candidate genes for the development/pathogenesis of HAE and to reveal their biological context.

The analysis was based on a group of genes, mutations in which are significantly associated with HAE: *SERPING1, F12, PLG, ANGPT1, KNG1, MYOF, HS3ST6*. To analyse genetic and protein–protein networks and identify the biological context of the selected candidate genes, a number of web resources were used: HumanNetv3, GeneMania, FUMA GWAS in the GENE2FUNC mode.

One hundred potential candidate genes in which mutations can be associated with HAE have been identified. The biological context of the identified genes was determined. The data of the biological context, genetic and protein-protein interactions made it possible to exclude a number of genes from the list of the most likely participants in pathogenesis and divide the remaining ones into groups with a greater or lesser potential for involvement. The group of the most likely HAO candidate genes includes *PLAT, HRG, SERPINA1, SERPINF2, MASP2, GRB14, C1QBP, DOK2, KLKB1, F11, TEK, KLK10, KRT1, APOH, CPB2, F2*.

The results obtained can provide significant assistance in the study of the HAE molecular mechanism, as well as in the diagnosis and prognosis of the disease course. The identified candidate genes have the potential to serve as diagnostic biomarkers for patients with unexplained angioedema.

The use of bioinformatic methods makes it possible to determine the list of candidate genes that are presumably involved in the disease pathogenesis or aggravate its course, and to obtain up-to-date information about the biological context of the identified genes. Understanding the genetic underpinnings and pathophysiology of PID may help define new diagnostic and therapeutic targets.

Keywords: bioinformatical analysis, primary immunodeficiencies, hereditary angioedema, candidate genes, pathogenetically significant mutations, in silico analysis

Введение

Первичные иммунодефициты (ПИД) — гетерогенная группа наследственных заболеваний, приводящих к нарушению работы одного или нескольких механизмов иммунной защиты. Длительное время считалось, что основное проявление ПИД представлено множественными, повторяющимися, оппортунистическими инфекциями, а сами заболевания характерны только для детей и всегда становятся причиной летальных исходов. Однако к настоящему времени представления о ПИД существенно изменились. На сегодняшний день, согласно данным Европейского общества иммунодефицитов (European Society for Immunodeficiencies — ESID) и Европейской справочной сети по редким первичным иммунодефицитам, аутовоспалительным и аутоиммунным заболеваниям (European Reference Network Rare Immunodeficiency, Autoinflammatory and Autoimmune Disease — ERN RITA), известно более 400 форм генетически подтвержденных ПИД [9]. Клиническая тяжесть их колеблется от легкой до потенциально опасной для жизни, дебют ряда заболеваний возможен в любом возрасте, а иммунопатологические проявления крайне разнообразны и могут протекать под маской инфекционных, аллергических, аутоиммунных, онкологических и других заболеваний. В Российской Федерации ежегодная рождаемость детей с ПИД составляет приблизительно 1 на 16-17 тысяч новорожденных, а наибольшая частота выявления ПИД среди детей составила 1 на 100-150 тысяч, смертность при этом составляет не менее 4-5,5% [2].

Учитывая, что симптомы ПИД обычно не специфичны, значимой проблемой данной группы заболеваний остается гиподиагностика — большинство пациентов с ПИД скрыты под маской других диагнозов (достаточно упомянуть проблему часто и длительно болеющих детей). Данное обстоятельство приводит к несвоевре-

менному и неадекватному лечению, а у пациентов с тяжелыми формами ПИД — к 100%-ной летальности.

При первичном выявлении заболевания у подростков и взрослых пациентов характер течения и клинических проявлений отличается вариабельностью даже в рамках одной нозологической формы [3]. При этом преимущественно сглаженная клиническая картина при первичном выявлении не позволяет рассчитывать на то, что заболевание будет протекать в легкой форме, так как у одного и того же больного приступы могут различаться по продолжительности и тяжести состояния пациента, в том числе способны приводить к летальным исходам.

Диагностика таких ПИД, которые впервые дебютируют или выявляются в подростковом и взрослом возрасте, в основном строится на данных клинической картины, анамнеза и специфических лабораторных показателей. Создание определенных алгоритмов лабораторной диагностики при работе с такими пациентами остается актуальной задачей, так как зачастую диагноз невозможно поставить без выполнения генетических тестов, выявления мутаций, приводящих к развитию заболевания. В то же время для многих ПИД отсутствует четкое представление об этиологии и патогенезе, а также задействованных в процессе генах. Так, среди 2728 больных в Российском регистре ПИД, генетическое тестирование было проведено для 1740 пациентов, но только у 77,2% из них определены генетические дефекты, причем диагноз ПИД был генетически подтвержден у 86% детей и только у 12% взрослых. При этом медиана диагностической задержки варьировала от 4 месяцев до 11 лет, в зависимости от заболевания [26].

В некоторых случаях скрининг генетических дефектов может быть выполнен с помощью полноэкзомного секвенирования, позволяющего обнаружить все разнообразие мутаций в геноме от точечных мутаций до крупномасштабных геном-

ных перестроек. Однако при получении такого массива данных возникает проблема избытка информации, анализировать которую крайне сложно, так как, в связи с редкостью заболеваний, невозможны экспериментальные исследования для подтверждения гипотезы о клинической значимости той или иной мутации.

Таким образом, очевидной становится необходимость определения генов-кандидатов, потенциально способных приводить к развитию того или иного первичного иммунодефицита, с использованием современных подходов к анализу геномов методами *in silico*.

Наследственный ангиоотек (НАО) — редкое генетически детерминированное заболевание, симптомы которого обычно впервые наблюдаются в детском и подростковом возрасте, сопровождающееся рецидивирующими отеками мягких тканей и подслизистых оболочек. Преимущественная локализация отеков — конечности, желудочно-кишечный тракт, лицо, ткани ротовой полости, дыхательные пути, что обуславливает опасность отеков для жизни больного [4, 11, 27, 30]. Большинство форм НАО вызваны генетическими дефектами, приводящими к чрезмерному высвобождению высокоэффективного вазоактивного пептида брадикинина [22]. Отеки возникают из-за чрезмерной активности сериновой протеазы калликреина плазмы (рКа), которая расщепляет высокомолекулярный кининоген (НК) с высвобождением брадикинина. Основным физиологическим ингибитором рКа является ингибитор эстеразы C1 (C1-INH) и генетически обусловленное снижение его экспрессии (НАО I типа) или подавление функции (НАО II типа) является причиной наиболее распространенных форм заболевания. Учитывая редкость заболевания (от 1:10 000 до 1:150 000 человек) [30, 31] и отсутствие специфичных симптомов, для подтверждения диагноза необходим учет клинической картины, анамнеза, лабораторных показателей значений C1-INH, компонента 4 комплемента (C4), компонента Iq комплемента (C1q), антител к C1 [24], а также генетического тестирования на ряд мутаций [1, 10, 31]. Генетическое тестирования в 85% случаев позволяет идентифицировать связанные с дефицитом C1-ингибитора мутации в гене, кодирующем ингибитор плазменной протеазы C1 (*SERPING1*), что позволяет отнести заболевание к НАО I типа. В случае НАО II типа уровень C1-ингибитора в крови пациента соответствует норме или превышает ее при наличии мутации в гене *SERPING1* [31]. Причем мутации, приводящие к НАО I типа, рассредоточены по всей протяженности гена *SERPING1*,

в то время как приводящие к НАО II типа локализованы вокруг петли белкового реактивного центра (RCL), за единственным исключением мутации аминокислотного остатка Lys251, влияющей на функциональность после фолдинга белка. Появление новых технологий, таких как полногеномное секвенирование, позволило также выявить патогенетически значимые мутации в интронных областях (1-й и 6-й интроны) гена *SERPING1*. Реже встречается НАО с нормальным уровнем C1-INH при отсутствии мутаций в гене *SERPING1* (III тип НАО). У пациентов с таким типом НАО показаны ассоциированные с заболеванием мутации в ряде других генов, кодирующих фактор XII (*F12*), плазминоген (*PLG*), ангиопозитин 1 (*ANGPT1*), кининоген 1 (*KNG1*), миоферлин (*MYOF*) [5, 6, 29], а также гепарансульфат-глюкозамин 3-О-сульфотрансфераза 6 (*HS3ST6*), в котором связанная с НАО мутация была описана только в 2021 году [7]. При отсутствии известных мутаций пациентов с клинической картиной НАО классифицируют как unknown [28, 31]. Все типы НАО наследуются как аутосомно-доминантные признаки с неполной пенетрантностью и незначительной корреляцией генотип-фенотип или ее отсутствием, в результате чего клинические проявления характеризуются неоднородностью [23].

В связи с вышесказанным, предполагают, что в патогенезе НАО могут быть задействованы и другие гены, негативный эффект мутаций которых в настоящее время еще не исследован. Это особенно важно, так как, согласно клиническим рекомендациям и МКБ-11, для подтверждения НАО необходимо проведение генетического анализа и выявление патогенетически значимых мутаций в гене *SERPING1* у больных с дефицитом C1-INH, а у пациентов без дефицита — выявление мутаций в иных генах, связанных с развитием заболевания [17]. В некоторых случаях, когда этиология НАО остается неизвестна (НАО-unknown), а также в 5% случаев НАО I типа, когда не удается определить мутацию при стандартном скрининге гена *SERPING1*, проблема подтверждения диагноза остается [31]. В РФ НАО I и II типов относится к наиболее распространенным ПИД и составляет 22% от всех случаев смертности взрослых больных. Это особенно важно, так как для НАО показана значительная задержка диагностики, составляющая в среднем 11 лет, но варьирующая от 0 до 68 лет [26].

При полногеномном и/или полноэкзомном секвенировании, позволяющем идентифицировать дополнительные, ранее не показанные как участвующие в патогенезе кодирующие и не ко-

дирующие регионы, выявляют множество генов, полиморфные варианты которых в той или иной степени коррелируют с заболеванием и различными его проявлениями. Некоторые из этих генов действительно имеют отношение к заболеванию, в то время как другие — нет, а корреляция может быть связана, например, с близкой локализацией генов или иными причинами. При этом отличить релевантные гены от нерелевантных только на основе ассоциативных *p-values* часто невозможно. А учитывая редкость ПИД в целом и НАО в частности, такие расчеты не будут иметь достаточной статистической силы, необходимой при оценке множества локусов-кандидатов, и требующей тестирования больших популяционных выборок. Необходимо хотя бы очертить группу наиболее вероятных генов-кандидатов для НАО, чтобы при полноэкзомном/полногеномном анализе обращать внимание в первую очередь на мутации именно в этих регионах.

Таким образом, существующие на сегодняшний момент диагностические методы не покрывают всех запросов клинической медицины для пациентов с НАО, в том числе из-за отсутствия информации о генах, мутации в которых потенциально способны приводить к развитию заболевания [28, 31]. Поскольку в развитии не моногенных заболеваний, к каковым относится и НАО, может быть задействована обширная сеть генов, важным аспектом является определение групп потенциальных генов-кандидатов. Такие группы генов с большей долей вероятности могут участвовать в патогенезе заболевания и привлечь внимание исследователей, лечащих врачей и разработчиков диагностических методов.

Целью нашей работы было выявить с помощью биоинформатического анализа гены-кандидаты развития/патогенеза наследственного ангиоотека и раскрыть их биологический контекст.

Материалы и методы

В качестве основы для настоящего анализа использовали группу генов, мутации в которых, согласно литературным источникам, достоверно ассоциированы с НАО: *SERPING1*, *F12*, *PLG*, *ANGPT1*, *KNG1*, *MYOF*, *HS3ST6*. Указанные гены вводили в качестве целевых/основных/базовых/фоновых для каждого метода анализа.

В рамках биоинформатического анализа задействовали ряд веб-ресурсов для построения генетических и белок-белковых сетей [16, 20, 33]. Была использована обновленная версия веб-приложения HumanNetv3, позволяющего исключить ложноположительные результаты при отборе ассоциированных с заболева-

нием генов [20]. С помощью веб-приложения HumanNetv3 (<https://www.inetbio.org/humannet/pes.php>) проводили идентификацию потенциальных генов — кандидатов, ассоциированных с НАО. Указанная версия содержит обновленную базу данных генных сетей человека, что позволяет проанализировать белок-белковые взаимодействия (HumanNet-PI) и построить генетические связи. Для идентификации биологического контекста отобранных генов-кандидатов (экспрессии генов, обогащение наборов дифференциально экспрессируемых генов (DEG) в определенной ткани по сравнению со всеми другими типами тканей) был использован веб-ресурс функционального картографирования и аннотации генов FUMA GWAS в режиме GENE2FUNC (<https://fuma.ctglab.nl/gene2func>). Применение FUMA GWAS осуществляли при следующих условиях: ансамблевая версия 92, набор данных экспрессии GTEx v8: 30 основных типов тканей, метод множественной коррекции теста для тестирования обогащения набора генов Бенджамини—Хохберга (ФДР), максимальное скорректированное значение *p* для ассоциации набора генов ($<$): 0,05, минимальные перекрывающиеся гены с наборами генов ($\geq$): 2. Для визуализации и анализа взаимоотношений целевых генов с другими генами также использовали ресурс GeneMania (<https://genemania.org/>) [16, 33]. Дизайн исследования. (рис. 1).

Результаты

Учитывая то, что в патогенезе НАО могут быть задействованы гены в различных биохимических каскадах, приводящих к гиперпродукции брадикинина [8, 12, 14, 19], предположили, что построение белок-белковых взаимодействий позволит выявить новые, ассоциированные с заболеванием гены. Для идентификации таковых семь генов (*ANGPT1*, *F12*, *HS3ST6*, *KNG1*, *MYOF*, *PLG*, *SERPING1*), мутации в которых приводят к развитию заболевания, были загружены на сервис HumanNetv3. При обработке данных в HumanNetv3 были получены результаты, которые показали, что общее количество потенциальных генов-кандидатов НАО на основе белок-белковых взаимодействий составляет 627 генов. Поскольку для последующего функционального анализа HumanNetv3 рассматривает первую сотню кандидатов, для дальнейшей работы были отобраны гены с прогнозом AUROC (площади под ROC-кривой) до уровня ложноположительных результатов в 1% (рис. 2).

На основании итоговых показателей были отсеяны ложноположительные кандидаты и прове-

Дизайн исследования / Research design

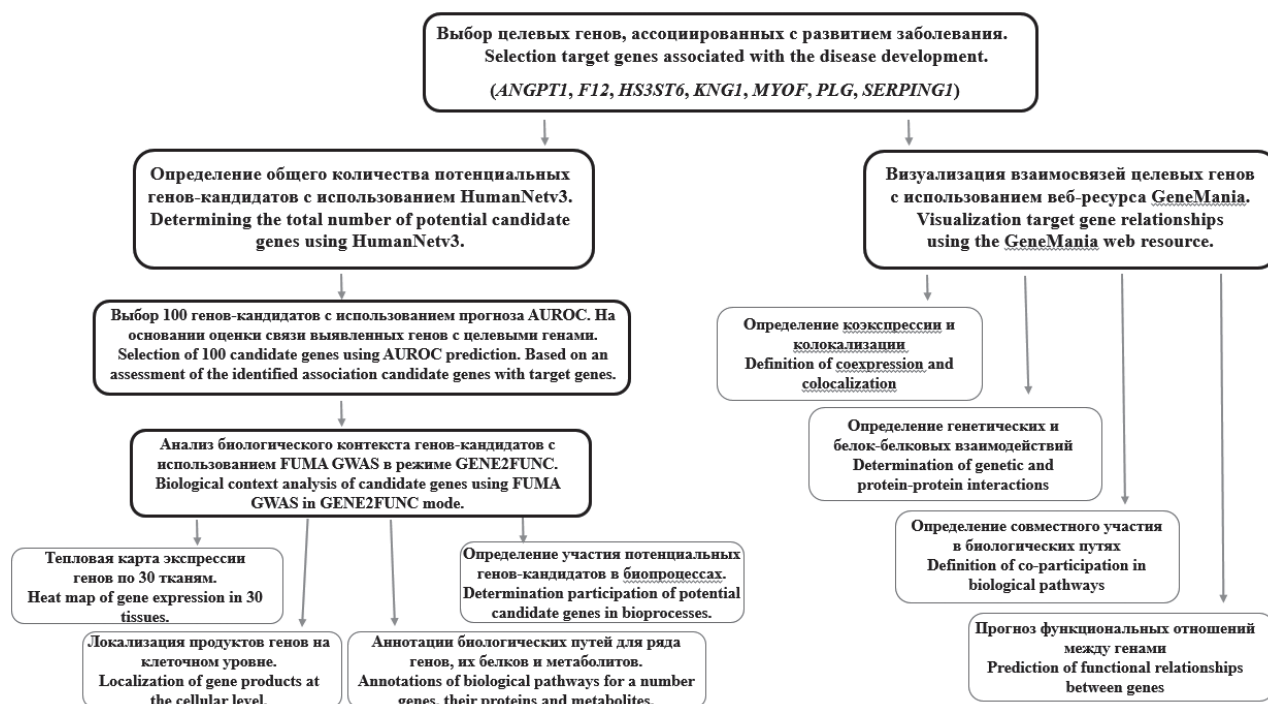


Рисунок 1. Схема используемой в настоящей работе общей методологии анализа *in silico* для выявления генов-кандидатов заболевания

Figure 1. Scheme of the general methodology of *in silico* analysis used in this work to identify disease candidate genes

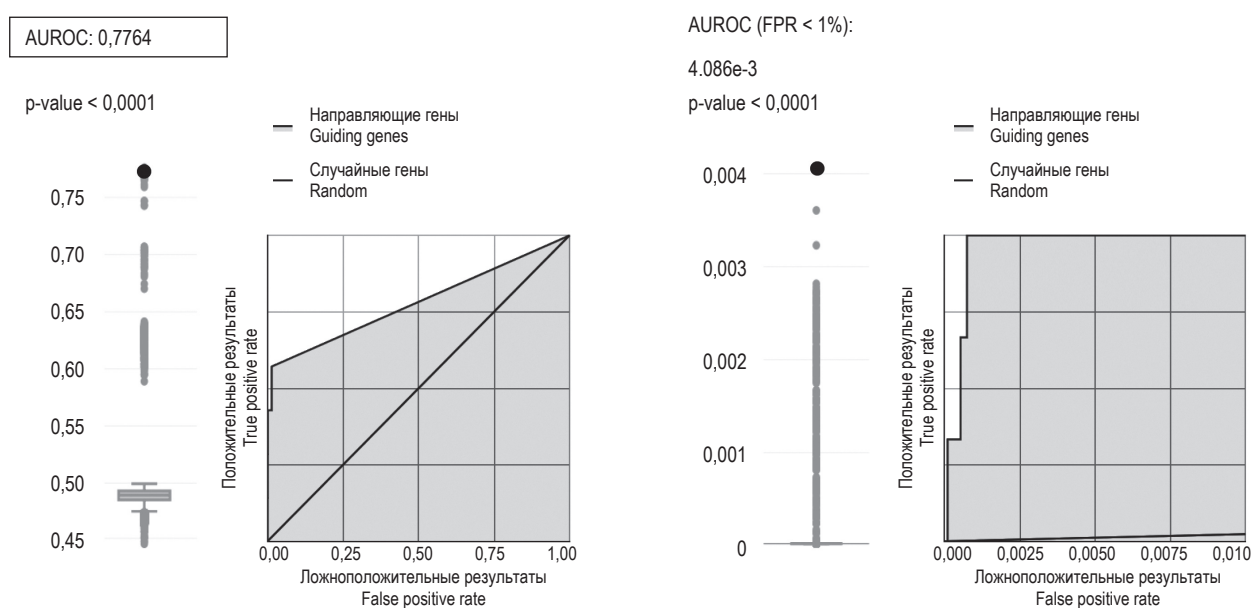


Рисунок 2. AUROC-прогноз генов-кандидатов патогенеза НАО до уровня ложноположительных результатов в 1%

Figure 2. AUROC prediction of candidate genes for the HAE pathogenesis to a false-positive rate of 1%

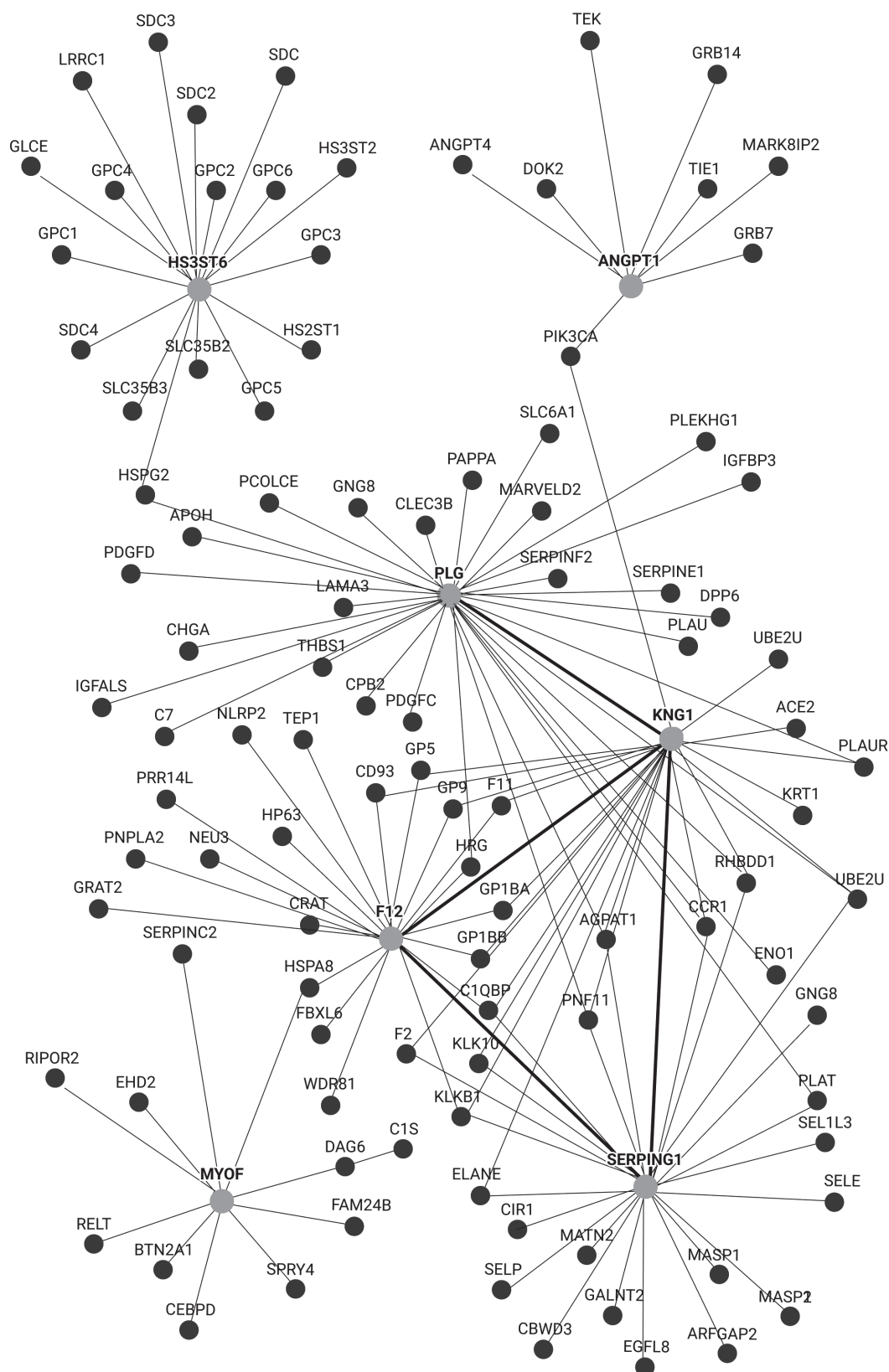


Рисунок 3. Потенциальные гены-кандидаты HAO по данным HumanNet v3 на основе белок-белковых взаимодействий с пороговой оценкой > 2,489

Figure 3. Potential HAE candidate genes according to HumanNet v3 data based on protein-protein interactions with a threshold score > 2.489

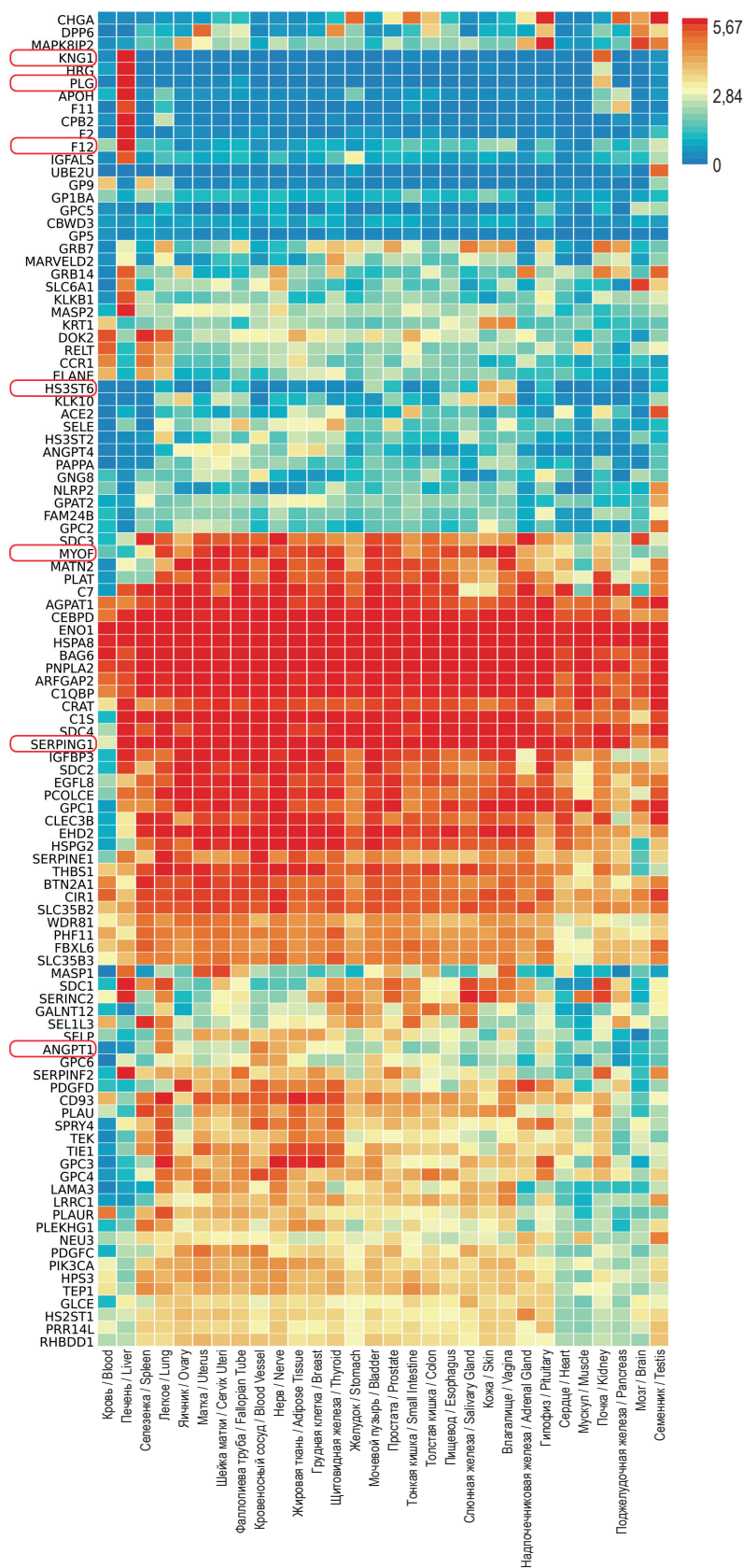


Рисунок 4. Тепловая карта экспрессии анализируемых генов в тканях и органах

Примечание. Отмечены участвующие в патогенезе НАО гены *ANGPT1*, *F12*, *HS3ST6*, *KNG1*, *MYOF*, *PLG*, *SERPING1*.

Figure 4. Heat map of the analyzed genes expression in tissues and organs

Note. The *ANGPT1*, *F12*, *HS3ST6*, *KNG1*, *MYOF*, *PLG*, and *SERPING1* genes involved in the pathogenesis of HAE have been identified.

дено ранжирование выбранных генов по оценке связей между ними и участвующими в патогенезе генами *ANGPT1*, *F12*, *HS3ST6*, *KNG1*, *MYOF*, *PLG*, *SERPING1*. Пороговое значение, используемое для выявления наиболее вероятных генов-кандидатов, отражающее близость с другими генами по правилу взвешивания соседей, составило 2,489. Таким образом, был сформирован список, включающий 100 генов, ранжированных по пороговому значению (оценке связи) от 2,489 до 10,118, мутации в которых могут быть вовлечены в патогенез НАО. Сведения о белок-белковых взаимодействиях и генах, потенциально связанных с заболеванием, представлены на рисунке 3.

Для дальнейшего анализа использовали веб-ресурс FUMA GWAS в режиме GENE2FUNC [<https://fuma.ctglab.nl/gene2func>]. При обработке биологического контекста генов-кандидатов, были использованы обобщенные данные: тепловая карта экспрессии генов по 30 тканям, локализация продуктов генов на клеточном уровне, аннотации биологических путей выявленных генов и их продуктов, а также их функции в организме человека. В качестве целевых/основных/базовых/фоновых и анализируемых генов указывали *SERPING1*, *F12*, *PLG*, *ANGPT1*, *KNG1*, *MYOF*, *HS3ST6* и 100 первых генов-кандидатов, полученных посредством анализа HumanNetv3.

Согласно данным тепловой карты, демонстрирующей спектр экспрессии РНК от выраженной к более слабой, для исследуемых генов характерна экспрессия в различных органах и тканях, в том числе в тех, которые подвергаются спорадическим отекам при НАО или могут быть косвенно задействованы в патогенезе заболевания (кровеносные сосуды, пищевод, кожа и т. д.) (рис. 4).

Согласно тепловой карте, высокие уровни экспрессии гена *SERPING1* показаны для всех, а гена *MYOF* — для большинства анализируемых тканей и органов. Более низкий уровень экспрессии и меньшее разнообразие тканей и органов демонстрирует ген *ANGPT1* (легкие и кровеносные сосуды), в то время как гены *KNG1*, *PLG* активно экспрессируются только в легких и почках, ген *F12* в легких и в значительно меньшей степени в коже, тканях половых органов, крови, а экспрессия гена *HS3ST6* определена в коже и тканях женских половых органов. Интересно отметить, что более 30 выявленных генов-кандидатов (красный диапазон на рисунке 3) имеют выраженную экспрессию в большинстве тканей, включая кожу, пищевод. Учитывая, что мутации высокоэкспрессирующегося во всех анализируемых тканях гена *SERPING1* представлены в 85%

случаев НАО, можно предположить, что мутации в генах со сходным уровнем экспрессии в большинстве тканей способны оказывать существенное влияние на патогенез НАО в комплексе или моногенно у большинства пациентов. В то же время с НАО могут быть связаны редкие мутации в генах, которые слабо экспрессируются в большинстве тканей, но имеют выраженную экспрессию в тканях верхних дыхательных путей, коже, половых органах, как это представлено для гена *HS3ST6*, или только в тканях печени, как показано для *F12*.

В ходе анализа была получена информация о локализации генетических продуктов на клеточном уровне (рис. 5).

Показано расположение продуктов генов *SERPING1*, *KNG1*, *PLG*, *F12* во внеклеточном матриксе и коллагенсодержащем внеклеточном матриксе, секреторных гранулах и пузырьках, просветах пузырьков, альфа-гранулах тромбоцитов и их просветах, микрочастицах крови. Кроме того, для *PLG* определена представленность продуктов на поверхности клетки, в мембране, в том числе внешней стороне плазматической мембраны и внешнем компоненте мембраны. Для продуктов *KNG1* показаны эндоплазматический ретикулум, который также характерен для *F12*, и его просвет. Представленность продуктов в мембране определена для *ANGPT1* и *MYOF*, продукты последнего выявляли также в цитоплазматических пузырьках.

Получены данные аннотаций путей ряда генетических продуктов (рис. 6).

Данные аннотации биологических путей, подгруженные в результат работы GENE2FUNC с WikiPathways, учитывают информацию по генам, их белкам, а также метаболитам, что позволило быстро выявить задействованность генов, мутации в которых приводят к НАО, в пути активации системы комплемента и коагуляционных каскадов (*SERPING1*, *KNG1*, *F12*, *PLG*), системы комплемента человека (*SERPING1*, *F12*, *PLG*), каскада свертываемости крови (*F12*, *PLG*), пути RAC1/PAK1/p38/MMP2 (*ANGPT1*), PI3K-Akt-mTOR-сигнального пути (*ANGPT1*), сигнального пути PI3K-Akt (*ANGPT1*), генов вовлеченных в острый воспалительный ответ (*KNG1*) и ангиогенез (*ANGPT1*), пути ингибитора АПФ (*KNG1*).

При функциональном картографировании анализируемых генов определено их участие в биологических процессах (табл. 1).

Для дальнейшего анализа осуществляли визуализацию взаимосвязей целевых генов, мутации в которых достоверно ассоциированы с развитием НАО, с использованием веб-ресурса GeneMania.

ТАБЛИЦА 1. УЧАСТИЕ ЗНАЧИМЫХ ДЛЯ РАЗВИТИЯ НАО ГЕНОВ И ГЕНОВ-КАНДИДАТОВ В БИОЛОГИЧЕСКИХ ПРОЦЕССАХ ПО ДАННЫМ GENE2FUNC (РАНЖИРОВАНЫ ПО УРОВНЮ ДОКАЗАТЕЛЬНОЙ ЗНАЧИМОСТИ)

TABLE 1. PARTICIPATION OF GENES AND CANDIDATE GENES SIGNIFICANT FOR THE DEVELOPMENT OF HAE IN BIOLOGICAL PROCESSES ACCORDING TO GENE2FUNC DATA (RANKED ACCORDING TO THE LEVEL OF EVIDENTIARY SIGNIFICANCE)

№ No.	Участие Participation	Гены Genes	p-value
1	Фибролиз Fibrolisis	PLAU, F2, SERPING1, KRT1, CPB2, THBS1, SERPINF2, GP1BA, APOH, PLAUR, HRG, KLKB1, F11, F12, PLG, SERPINE1, PLAT	7,67 ⁻³⁷
2	Регуляция коагуляции Regulation of coagulation	SELP, PLAU, F2, SERPING1, KRT1, CPB2, THBS1, SERPINF2, GP1BA, APOH, PLAUR, HRG, KNG1, KLKB1, F11, F12, PLG, SERPINE1, PLAT	3,05 ⁻³¹
3	Ответ на повреждение Response to damage	SELP, PLAU, MYOF, F2, SERPING1, KRT1, CPB2, THBS1, SERPINF2, GP1BA, C1QBP, APOH, PLAUR, EHD2, SDC1, SDC4, GP1BB, CCR1, GP9, PIK3CA, HRG, KNG1, GP5, KLKB1, F11, F12, PLG, SERPINE1, PLAT, MATN2	6,96 ⁻²⁷
4	Активация плазминогена Plasminogen activation	ENO1, PLAU, CPB2, THBS1, SERPINF2, APOH, CLEC3B, KLKB1, F11, F12, SERPINE1, PLAT	7,82 ⁻²⁵
5	Регуляция уровня жидкости в теле Fluid regulation in the body	SELP, PLAU, F2, SERPING1, KRT1, CPB2, THBS1, SERPINF2, GP1BA, C1QBP, APOH, PLAUR, EHD2, GP1BB, GP9, PIK3CA, HRG, KNG1, GP5, KLKB1, F11, F12, PLG, SERPINE1, PLAT	1,41 ⁻²³
6	Процессы, связанные с аминокликаном Processes associated with aminoglycan	HSPG2, SDC3, HS2ST1, GPC5, GPC6, GLCE, HS3ST6, HS3ST2, SDC1, GPC1, SDC4, GPC2, SDC2, ANGPT1, GPC4, GPC3	9,28 ⁻²³
7	Протеолиз Proteolysis	ENO1, MASP2, UBE2U, PLAU, F2, SERPING1, C1S, CPB2, THBS1, WDR81, SERPINF2, APOH, ELANE, PLAUR, KLK10, NLRP2, RHBDD1, CLEC3B, HRG, KNG1, MASP1, KLKB1, F11, F12, BAG6, PLG, PCOLCE, SERPINE1, DPP6, PLAT, FBXL6, PAPP, ACE2, GPC3	6,43 ⁻¹⁹
8	Регуляция ответа на стресс Regulation of response to stress	ENO1, SELP, SELE, PLAU, F2, SERPING1, HSPA8, KRT1, CPB2, THBS1, SERPINF2, GP1BA, C1QBP, APOH, ELANE, PLAUR, MAPK8IP2, HRG, KNG1, KLKB1, F11, F12, BAG6, PLG, SERPINE1, PLAT, TEK, ACE2	3,37 ⁻¹⁵
9	Биологическая адгезия Biological adhesion	SELP, SELE, PLAU, THBS1, IGFALS, SERPINF2, GP1BA, C1QBP, LAMA3, ELANE, CD93, SDC4, GP1BB, CCR1, GP9, PIK3CA, HRG, KNG1, GP5, PLG, SERPINE1, ANGPT1, TEK, ACE2, GPC4	5,04 ⁻¹³
10	Экзоцитоз Exocytosis	SELP, PLAU, SERPING1, HSPA8, KRT1, CHGA, THBS1, SERPINF2, APOH, ELANE, PLAUR, SDC1, CD93, SDC4, CLEC3B, CCR1, HRG, KNG1, PLG, SERPINE1	2,76 ⁻¹²
11	Воспалительный ответ Inflammatory response	HSPG2, SELP, SELE, F2, KRT1, THBS1, SERPINF2, ELANE, NLRP2, SDC1, CCR1, KNG1, KLKB1, F12, SERPINE1, TEK, ACE2	5,16 ⁻¹¹
12	Гуморальный иммунный ответ Humoral immune response	MASP2, F2, SERPING1, C1S, KRT1, CPB2, CHGA, C1QBP, ELANE, HRG, MASP1, C7	5,23 ⁻¹⁰
13	Врожденный иммунный ответ Innate immune response	MASP2, SERPING1, C1S, KRT1, CHGA, C1QBP, NLRP2, MASP1, C7, F12	6,94 ⁻⁴
14	Иммунный эффекторный процесс Immune effector process	MASP2, PLAU, F2, SERPING1, HSPA8, C1S, KRT1, CPB2, CHGA, C1QBP, ELANE, PLAUR, CD93, PIK3CA, MASP1, C7, ANGPT1	1,89 ⁻⁷
15	Регуляция процессов иммунной системы Regulation of immune system processes	MASP2, SELP, F2, SERPING1, PDGFD, C1S, KRT1, CPB2, THBS1, GP1BA, C1QBP, ELANE, SDC4, CCR1, PIK3CA, HRG, MASP1, C7, BTN2A1, BAG6, SERPINE1, ANGPT1	2,20 ⁻⁹

Таблица 1 (окончание)
Table 1 (continued)

№ No.	Участие Participation	Гены Genes	p-value
16	Активация системы комплемента Activation of the complement system	<i>MASP2, F2, SERPING1, C1S, KRT1, CPB2, C1QBP, MASP1, C7</i>	1,35 ⁻⁹
17	Фосфатнодилинозитол-3-киназная сигнализация Phosphatidylinositol-3-kinase signaling	<i>SELP, F2, PDGFD, C1QBP, PIK3CA, PDGFC, ANGPT1, TEK</i>	1,57 ⁻⁸
18	Регуляция активности киназ Regulation of kinase activity	<i>F2, PDGFD, THBS1, WDR81, ELANE, ANGPT4, SDC4, PIK3CA, PDGFC, SPRY4, ANGPT1, TEK</i>	1,11 ⁻⁵
19	Активация клеток Cell activation	<i>SELP, PLAU, F2, HSPA8, KRT1, CHGA, THBS1, GP1BA, ELANE, PLAUR, CD93, SDC4, GP1BB, GP9, PIK3CA, HRG, GP5, BAG6</i>	2,16 ⁻⁷
20	Регуляция активности пептидаз Regulation of peptidase activity	<i>SERPING1, THBS1, SERPINF2, PLAUR, NLRP2, HRG, KNG1, PCOLCE, SERPINE1, GPC3</i>	7,92 ⁻⁷
21	Лейкоцит-опосредованный иммунитет Leukocyte-mediated immunity	<i>MASP2, PLAU, F2, SERPING1, HSPA8, C1S, KRT1, CHGA, C1QBP, ELANE, PLAUR, CD93, C7</i>	1,95 ⁻⁶
22	Регуляция клеточного ответа на стимул фактора роста Regulation of cellular response to growth factor stimulus	<i>MYOF, THBS1, GPC1, HRG, SPRY4, GPC3</i>	2,21 ⁻⁴
23	Процесс метаболизма протеогликанов и гепарансульфатных протеогликанов Process of proteoglycans and heparan sulfate proteoglycans metabolism	<i>HS2ST1, GLCE, HS3ST6, HS3ST2, GPC1</i>	2,90 ⁻⁶
24	Процесс биосинтеза протеогликанов Process of proteoglycan biosynthesis	<i>HS2ST1, GLCE, HS3ST6, HS3ST2</i>	5,18 ⁻⁵
25	Регуляция каскада MAPK Regulation of the MAPK cascade	<i>PDGFD, THBS1, SERPINF2, ELANE, MAPK8IP2, CCR1, PDGFC, SPRY4, IGFBP3, ANGPT1, TEK</i>	1,74 ⁻⁵
26	Миграция минонуклеарных клеток Minonuclear cell migration	<i>PDGFD, THBS1, CCR1, SERPINE1</i>	1,37 ⁻⁴
27	Продукция цитокинов Cytokine production	<i>F2, CHGA, THBS1, SERPINF2, C1QBP, ELANE, NLRP2, AGPAT1, SERPINE1, ANGPT1, ACE2</i>	1,72 ⁻⁵
28	Каскад ERK1 и ERK2 Cascade ERK1 and ERK2	<i>PDGFD, SERPINF2, CCR1, PDGFC, SPRY4, ANGPT1, TEK</i>	4,40 ⁻⁵
29	Процесс метаболизма гликопротеинов Process of glycoprotein metabolism	<i>HS2ST1, GLCE, HS3ST6, HS3ST2, GPC1</i>	5,57 ⁻⁵
30	Негативная регуляция выработки IL-12 Down regulation of IL-12 production	<i>THBS1, C1QBP</i>	1,05 ⁻³
31	Положительная регуляция хемотаксиса моноцитов Upregulation of monocyte chemotaxis	<i>CCR1, SERPINE1</i>	1,34 ⁻³
32	Ответ на тепло Response to heat	<i>CPB2, THBS1, MYOF, HSPA8</i>	1,37e ⁻³

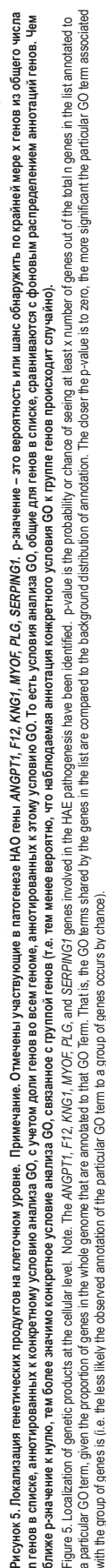


Рисунок 5. Локализация генетических продуктов на клеточном уровне. Примечание. Отмечены участвующие в патогенезе HAO гены *ANGPT1*, *F12*, *KNG1*, *MYOF*, *PLG*, *SERPINF1*. *p*-значение – это вероятность или шанс обнаружить по крайней мере *x* генов из общего числа *y* генов, аннотированных к конкретному анализу GO, с учетом доли генов во всей геноме. Это есть условия анализа GO, общие для генов в списке, сравниваемых с фоновым распределением аннотаций генов. Чем ближе *p*-значение к нулю, тем более значимо конкретное условие анализа GO, связанное со группой генов (з.е. тем менее вероятно, что наблюдаемая аннотация конкретного условия GO к группе генов происходит случайно).

Figure 5. Localization of genetic products at the cellular level. Note. The *ANGPT1*, *F12*, *KNG1*, *MYOF*, *PLG*, and *SERPINF1* genes involved in the HAE pathogenesis have been identified. *p*-value is the probability or chance of seeing at least *x* number of genes out of the total *y* genes in the list annotated to the particular GO term, given the proportion of genes in the whole genome that are annotated to that GO term. That is, the GO terms shared by the genes in the list are compared to the background distribution of annotation. The closer the *p*-value is to zero, the more significant the particular GO term associated with the genes is (i.e. the less likely the observed annotation of the particular GO term to a group of genes occurs by chance).



Рисунок 6. Аннотации биологических путей для ряда тенов, их белков и метаболитов при $p < 0,05$, полученных в режиме GENE2FUNC по данным WikiPathways

Примечание. Отмечены участвующие в патогенезе HAO гены: *ANGPT1*, *F12*, *KNK1*, *PLG*, *SERP1G1*.
 Figure 6. Annotations of biological pathways for some genes, their proteins and metabolites at $p < 0.05$ obtained in the GENE2FUNC mode from WikiPathways database. The *ANGPT1*, *F12*, *KNK1*, *MYOF*, *PLG*, and *SERP1G1* genes involved in the HAE pathogenesis have been identified.

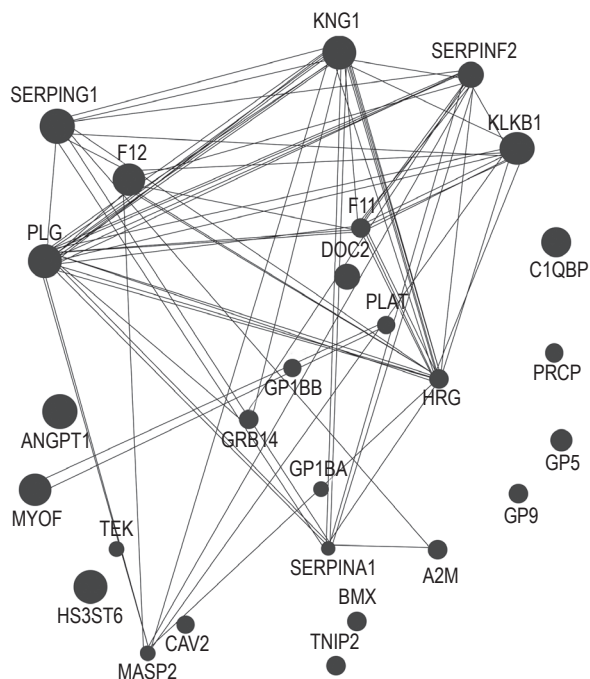


Рисунок 7. Данные коэкспрессии целевых генов, полученные с использованием ресурса GeneMania

Примечание. SERPING1 – представитель 1 семейства серпинов G, код, согласно номенклатуре Комитета по номенклатуре генов HUGO (HGNC): 1228. F12 – фактор свертывания крови XII, HGNC: 3530. PLG – плазминоген, HGNC: 9071. ANGPT1 – ангиопоэтин 1, HGNC: 484. MYOF – миоферлин, HGNC: 3656. KNG1 – кининоген 1, HGNC: 6383. HS3ST6 – гепарансульфат-глюкозамин-3-сульфотрансфераза 6, HGNC: 14178. TEK – тирозинкиназа рецептора TEK, HGNC: 11724. MASP2 – MBL-ассоциированная сериновая протеаза 2, HGNC: 6902. CAV2 – caveolin 2, HGNC: 1528. GRB14 – белок 14, связанный с рецептором фактора роста, HGNC: 4565. GP1BB – бета-субъединица тромбоцитов гликопротеина Ib, HGNC: 4440. GP1BA – альфа-субъединица тромбоцитов гликопротеина Ib, HGNC: 4439. DOK2 – стыковочный белок 2, HGNC: 2991. F11 – фактор свертывания крови XI, HGNC: 3529. PLAT – тканевой активатор плазминогена, HGNC: 9051. SERPINA1 – представитель 1 семейства серпинов A, HGNC: 8941. SERPINF2 – представитель 2 семейства серпинов F, HGNC: 9075. KLKB1 – калликреин B1, HGNC: 6371. HRG – гистидин-богатый гликопротеин, HGNC: 5181. A2M – альфа-2-макроглобулин, HGNC: 7. TNIP2 – Белок 2, взаимодействующий с TNFAIP3, HGNC: 19118. BMX – нерецепторная тирозинкиназа BMX, HGNC: 1079. C1QBP – белок, связывающий комплемент C1q, HGNC: 1243. PRCP – пролилкарбоксипептидаза, HGNC: 9344. GP5 – гликопротеин V тромбоцитов, HGNC: 4443. GP9 – гликопротеин IX тромбоцитов, HGNC: 4444.

Figure 7. Target gene co-expression data obtained using the GeneMania resource

Note. SERPING1 – serpin family G member 1, HUGO Gene Nomenclature Committee (HGNC): 1228. F12 – coagulation factor XII, HGNC: 3530. PLG – plasminogen, HGNC: 9071. ANGPT1 – angiopoietin 1, HGNC: 484. MYOF – myoferlin, HGNC: 3656. KNG1 – kininogen 1, HGNC: 6383. HS3ST6 – heparan sulfate-glucosamine 3-sulfotransferase 6, HGNC: 14178. TEK – TEK receptor tyrosine kinase, HGNC: 11724. MASP2 – MBL associated serine protease 2, HGNC: 6902. CAV2 – caveolin 2, HGNC: 1528. GRB14 – growth factor receptor bound protein 14, HGNC: 4565. GP1BB – glycoprotein Ib platelet subunit beta, HGNC: 4440. GP1BA – glycoprotein Ib platelet subunit alpha, HGNC: 4439. DOK2 – docking protein 2, HGNC: 2991. F11 – coagulation factor XI, HGNC: 3529. PLAT – plasminogen activator, tissue type, HGNC: 9051. SERPINA1 – serpin family A member 1, HGNC: 8941. SERPINF2 – serpin family F member 2, HGNC: 9075. KLKB1 – kallikrein B1, HGNC: 6371. HRG – histidine rich glycoprotein, HGNC: 5181. A2M – alpha-2-macroglobulin, HGNC: 7. TNIP2 – TNFAIP3 interacting protein 2, HGNC: 19118. BMX – BMX non-receptor tyrosine kinase, HGNC: 1079. C1QBP – complement C1q binding protein, HGNC: 1243. PRCP – prolylcarboxypeptidase, HGNC: 9344. GP5 – glycoprotein V platelet, HGNC: 4443. GP9 – glycoprotein IX platelet, HGNC: 4444.

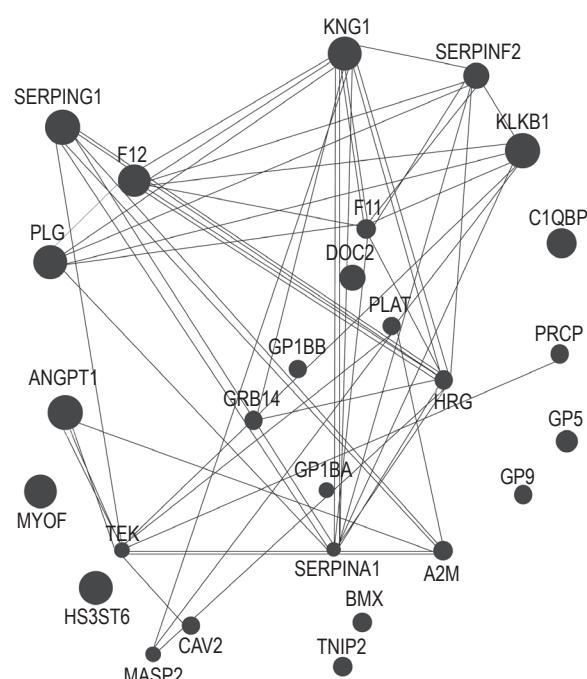


Рисунок 8. Данные колокализации целевых генов, полученные с использованием ресурса GeneMania

Примечание. См. примечание к рисунку 7.

Figure 8. Target gene colocalization data obtained using the GeneMania resource

Note. As for Figure 7.

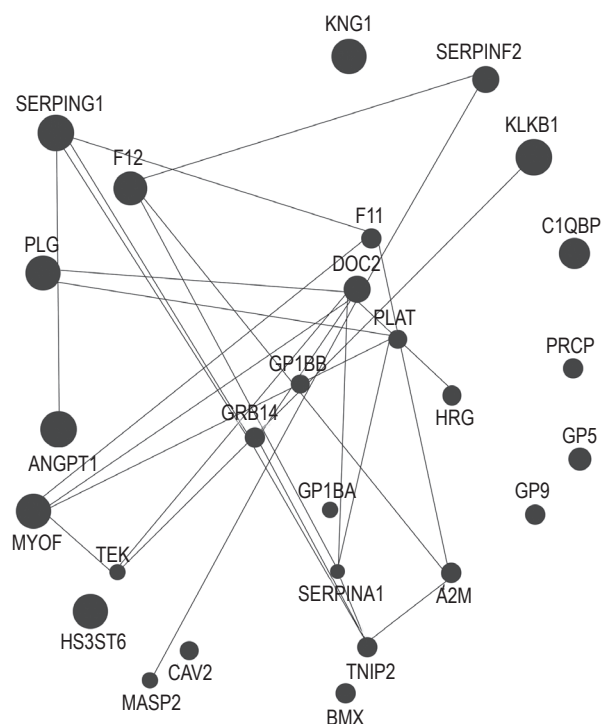


Рисунок 9. Данные генетических взаимодействий целевых генов, полученные с использованием ресурса GeneMania

Примечание. См. примечание к рисунку 7.

Figure 9. Data on genetic interactions of target genes obtained using the GeneMania resource

Note. As for Figure 7.

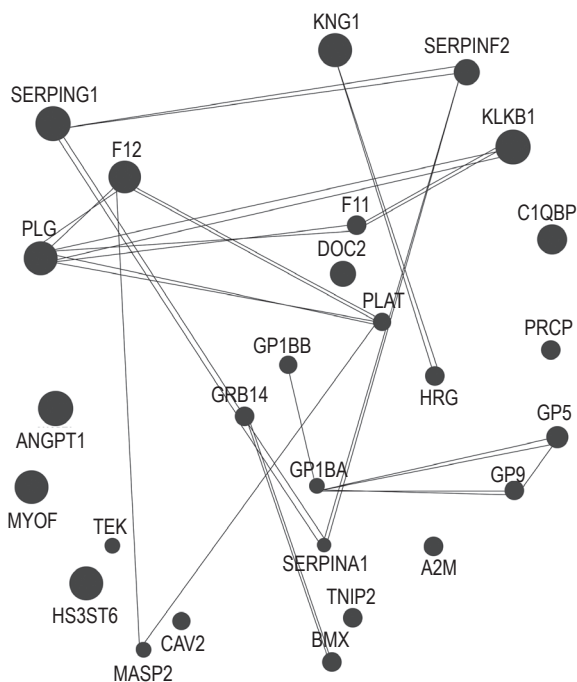


Рисунок 10. Данные белок-белковых взаимодействий целевых генов, полученные с использованием ресурса GeneMania

Примечание. См. примечание к рисунку 7.

Figure 10. Data on protein-protein interactions of target genes obtained using the GeneMania resource

Note. As for Figure 7.

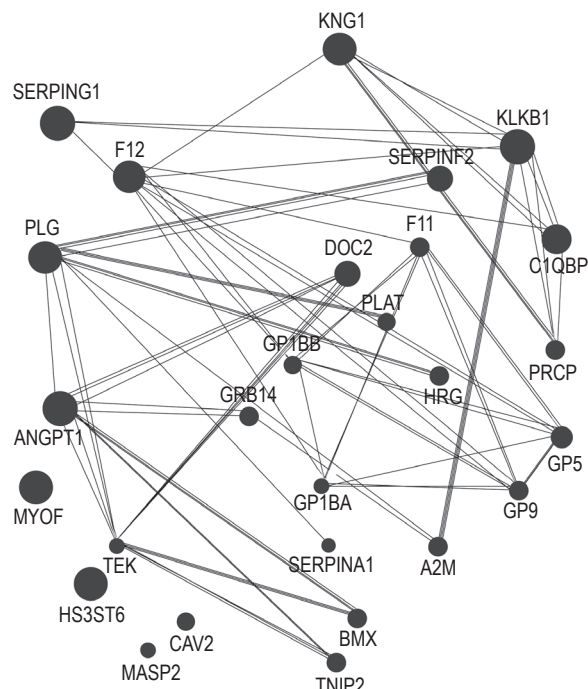


Рисунок 11. Данные совместного участия целевых генов в биологических путях, полученные с использованием ресурса GeneMania

Примечание. См. примечание к рисунку 7.

Figure 11. Data on the co-involvement of target genes in biological pathways obtained using the GeneMania resource

Note. As for Figure 7.

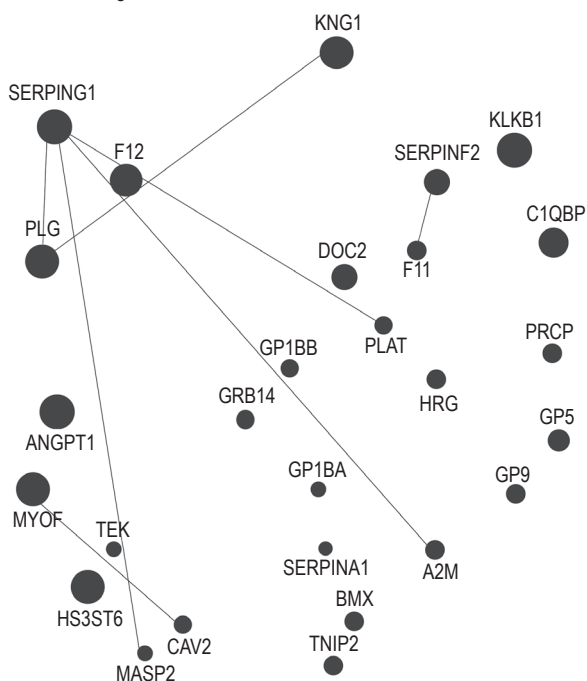


Рисунок 12. Данные прогноза функциональных отношений между целевыми генами, полученные с использованием ресурса GeneMania

Примечание. См. примечание к рисунку 7.

Figure 12. Data for predicting functional relationships between target genes obtained using the GeneMania resource

Note. As for Figure 7.

На рисунках 7 и 8 представлены данные, характеризующие коэкспрессию и колокализацию целевых генов.

На рисунках 9 и 10 представлены данные, характеризующие генетические и белок-белковые взаимодействия целевых генов соответственно.

На рисунке 11 представлены данные о совместном участии генов в биологических путях.

На рисунке 12 представлены данные прогноза функциональных отношений между генами.

Было показано, что *KNG1*, *A2M*, *F11*, *F12*, *GRB14*, *HRG*, *KLKB1*, *MASP2*, *PLAT*, *PLG*, *SERPINA1*, *SERPINF2*, *SERPING1*, *MYOF* имеют близкие паттерны экспрессии в различных условиях. В то же время анализ колокализации экспрессии генов и их продуктов выявил группы генов, участвующих в схожих биологических механизмах (*KNG1*, *PLG*, *KLKB1*, *SERPINF2*, *F11*, *HRG*, *GRB14*, *SERPINA1*, *A2M*, *MASP2*, *TEK*, *F12*, *SERPING1*, *ANGPT1*, *PRCP*, *CAV2*, *PLAT*), функционально связанных между собой (*ANGPT1*, *SERPINF2*, *DOK2*, *F11*, *PLAT*, *HRG*, *GRB14*, *SERPINA1*, *A2M*, *TNIP2*, *MASP2*, *TEK*, *SERPING1*, *F12*, *MYOF*, *PLG*, *KLKB1*) и имеющих белковые взаимодействия (*F12*, *KNG1*, *KLKB1*, *SERPINF2*,

CIQBP, DOK2, PRCP, F11, PLAT, HRG, GRB14, GP1BB, GP5, GP9, GP1BA, A2M, TEK, PLG, TNIP2, MASP2, SERPING1, ANGPT1).

Обсуждение

Факторы, связанные с этиологией НАО, остаются малоизученными. Основными причинами развития заболевания в настоящее время называют мутации в ранее определенных генах *SERPING1, F12, PLG, KNG1, ANGPT1, HS3ST6, MYOF*. Некоторые авторы выдвигали предположения о том, что в развитие данного заболевания могут быть вовлечены мутации до настоящего момента не изученных генов, включенных, в том числе опосредованными путями, в механизмы реализации брадикинина. При этом, независимо от того, какой ген мутирует, сходные пути реализации играют ключевую роль, запуская повышающую регуляцию системы контактной активации/калликреин-кининовой системы, тем самым приводя к несбалансированному увеличению брадикинина [23]. Однако, несмотря на увеличение брадикинина в кровотоке, для НАО характерны локализованные спорадические, а не системные, отеки. Таким образом, допускается существование нескольких локальных факторов, стимулирующих выработку брадикинина в конкретном месте, в частности в мягких тканях лица, рук, ног, гениталий, а также на слизистых оболочках, выстилающих дыхательный и пищеварительный тракты [23]. Выдвигают предположения о вовлеченности врожденной и адаптивной иммунной системы в ангиоотек [15]. Так, моноциты, макрофаги, гранулоциты, лимфоциты, базофилы, эндотелиальные клетки прямо или косвенно могут участвовать в иммунопатогенезе ангиоотека. В частности, была показана положительная корреляция между повышенными значениями уровня фактора роста эндотелия сосудов (VEGF), продуцируемого различными клетками, в том числе эндотелиальными, и тяжестью течения НАО [21]. В дополнение к этому, макрофаги секретируют широкий спектр медиаторов, включая компоненты комплемента, такие как C1-INH, который, как известно, является ключевым фактором развития НАО [15]. Возможно также носительство мутаций в генах, которые оказывают негативный синергический эффект на развитие и течение НАО, что косвенно подтверждается различными триггерами данного заболевания (колебания уровней гормонов, в первую очередь эстрогена, ингибиторы ангиотензин-превращающего фермента (АСІ), травма, манипуляции с верхними дыхательными путями и медицинские процедуры, в том числе хирургическое и стома-

тологическое вмешательство, эмоциональный стресс, инфекции) [13]. Еще одним косвенным подтверждением вовлеченности в патогенез НАО врожденной и адаптивной иммунной системы, а также комплекса функционально различающихся генов, является многообразие симптоматики заболевания, тяжесть и течение которого в клинической практике могут значительно отличаться даже среди членов семьи, имеющих одну и ту же мутацию [31]. Данное обстоятельство также позволяет предположить наличие у больных иных мутаций, оказывающих синергический эффект на течение заболевания.

Для того чтобы снизить затратность на идентификацию патогенетически значимых мутаций у пациентов с симптомами НАО, Kalmar L. с коллегами разработали онлайн-базу данных НАО (HAEdb), которая предназначена для анализа и получения информации о генетических изменениях по конкретным локусам в гене *SERPING1* [18]. Данная база позволяет исследователям получать информацию о мутациях и вносить новые обнаруженные варианты, но, к сожалению, она не включает классификацию генетических аномалий, характерных для НАО, затрагивающих гены *F12, PLG, KNG1, ANGPT1, HS3ST6, MYOF*, в соответствии с рекомендациями Американского колледжа медицинской генетики и геномики (American College of Medical Genetics and Genomics – ACMG) [32], поэтому несет больше ознакомительный, чем диагностический, характер. Среди ресурсов, посвященных исследованию ассоциированных с НАО мутаций, особого внимания заслуживает база данных наследственного ангиоотека (Annotation of Genetic Variants Causing Hereditary Angioedema – HADA), разработанная Mendoza-Alvarez A. с соавт., позволяющая идентифицировать генетические варианты, вызывающие заболевание [25]. Однако указанное приложение не позволяет выявлять новые гены, мутации в которых способны приводить к НАО.

Применение веб-ресурсов HumanNet v3 и GeneMania в данном исследовании позволило построить белок-белковые и генетические связи генов-кандидатов с основными генами, мутации в которых ассоциированы с НАО: *SERPING1, F12, PLG, KNG1, ANGPT1, HS3ST6, MYOF*. В результате анализа были предсказаны 100 генов, которые потенциально способны играть роль в патогенезе НАО.

Получены данные о локализации того или иного белка в клеточных компонентах от экстрацеллюлярного расположения (*HSPG2, SDC3, F2, SERPING1, KRT1, GPC5, GPC6, THBS1, IGFALS*,

SERPINF2, GP1BA, APOH, LAMA3, ELANE, GPC1, CLEC3B, HRG, GPC2, PCOLCE, SERPINE1, SDC2, MATN2, GPC4, GPC3) до расположения в специфических гранулах клеток (*PLAU, ELANE, PLAUR, CD93*). Интересно отметить, что в большинстве клеточных компонентов широко представлены белки *SERPING1, KNG1, PLG, F12*, с мутациями которых ассоциированы наиболее распространенные типы НАО. Генные продукты *MYOF* и *ANGPT1*, напротив, имеют выборочное расположение на клеточном уровне, что может быть связано с редкими типами НАО. Продукты ряда генов-кандидатов в диапазоне от *HSPG2* до *GPC3* (рис. 4) также локализованы во внеклеточном и коллагенсодержащем внеклеточном матриксе. Таким образом, можно предположить, что мутации в этих генах могут участвовать в патогенезе НАО и требуют более детального рассмотрения. Учитывая, что во многих случаях НАО отмечают нарушение клеточной мембраны и активации каскада коагуляции одновременно с усилением фибринолиза, отдельного внимания заслуживают гены, продукты которых локализуются в клеточной и/или плазматической мембране, или на ее поверхности: *THBS1* (адгезивный гликопротеин, опосредующий межклеточные взаимодействия и взаимодействия клеток с матриксом), *GP1BA* (белок поверхностной мембраны тромбоцитов), *GPC1* (протеогликан клеточной поверхности, несущий гепарансульфат) и т. д.

Особый интерес представляют данные о функциональном участии генов-кандидатов в биологических процессах. Поскольку гены, относящиеся к тому или иному заболеванию, часто организованы в единые биологические пути или функциональные группы, связанные с формированием и прогрессированием патологии, в ходе исследования была определена вовлеченность генов-кандидатов в пути активации системы комплемента и коагуляционных каскадов (*MASP2, PLAU, F2, C1S, CPB2, SERPINF2, PLAUR, MASP1, KLKB1, C7, SERPINE1, PLAT*), системы комплемента человека (*MASP2, SELP, SELE, C1S, THBS1, CIQBP, ELANE, PLAUR, CD93, MASP1, KLKB1, F11, C7*), каскада свертываемости крови (*PLAU, F2, SERPINF2, KLKB1, F11, SERPINE1, PLAT*), пути RAC1/PAK1/p38/MMP2 (*TIE1, GRB7, GRB14, ANGPT4, PIK3CA, DOK2, TEK*), PI3K-Akt-mTOR-сигнального пути (*PDGFD, THBS1, LAMA3, GNG8, ANGPT4, PIK3CA, PDGFC, TEK*), сигнального пути PI3K-Akt (*PDGFD, THBS1, LAMA3, GNG8, ANGPT4, PIK3CA, PDGFC, TEK*), генов, вовлеченных в острый воспалительный ответ (*SELP, C7*) и ангиогенез (*PIK3CA, TEK*) и пути активации ингибитора АПФ (*ACE2*).

Необходимо отметить гены, продукты которых участвуют в VEGFA-VEGFR2 сигнальном пути, нарушения в котором также могут усугубить течение заболевания: *PLAU, PLAUR, SELE, PIK3CA, GPC1* [15]. Помимо этого, отдельное внимание заслуживают гены участвующие в активации комплемента (*MASP1-2, C1S, C7*), что также может оказывать негативное влияние на течение НАО. Таким образом, можно выделить гены, связанные с фибролизом, коагуляцией, активацией плазминогена, адгезией, фосфатидилинозитол-3-киназной сигнализацией (ключевой элемент PI3K сигнального пути) и т. д. Такие процессы в той или иной степени могут быть задействованы в патофизиологии НАО и требуют детального исследования.

Анализ с использованием веб-ресурса GeneMania, как и в случае с HumanNet v3, был основан на 7 базовых генах *SERPING1, F12, PLG, KNG1, ANGPT1, HS3ST6, MYOF*. Гены были сгруппированы по паттернам экспрессии, сходству биологических механизмов, функциональной связи, белок-белковым взаимодействиям. Продукты сгруппированных генов предположительно могут оказывать влияние друг на друга или опосредованно взаимодействовать через сложные каскады биохимических процессов. Однако анализ с использованием GeneMania показал совместное участие генных продуктов в биологических путях только для *F12, KNG1, KLKB1, SERPINF2, CIQBP, DOK2, PRCP, F11, PLAT, HRG, GP1BB, GP5, GP9, GP1BA, A2M, TEK, PLG, GRB14, SERPINA1, TNIP2, BMX, SERPING1, ANGPT1*. Дополнительные функциональные отношения были выявлены между генами *PLG, F11, PLAT, CAV2, A2M, MASP2, SERPING1, KNG1, SERPINF2, MYOF*. Интересно отметить, что веб-ресурс GeneMania не предоставил сетевых данных для гена *HS3ST6*, достоверно ассоциированного с НАО. Среди полученных результатов ряд генов не пересекается с данными, полученными посредством FUMA GWAS и HumanNet v3: так, ген *A2M* занимает 554 место в списке возможных генов-кандидатов и не входит в топ-100 по версии HumanNet v3, а гены *TNIP2, PRCP, BMX* и *CAV2* в этом списке отсутствуют. Расхождения в результатах анализа могут быть связаны с различными алгоритмами и с тем, что программы подгружают информацию из разных баз данных.

Определение уровней и представленность экспрессии генов-кандидатов в тканях и органах, расположение их продуктов на клеточном уровне, а также анализ с использованием разных веб-ресурсов пересечения путей и функций с задействованными в патогенезе НАО генами по-

зволили нам исключить из списка наиболее вероятных участников патогенеза НАО следующие гены (в скобках указаны уровни оценки связи с участвующими в заболевании генами): *GP1BA* (6,315), *GP1BB* (4,263), *GP5* (4,293), *GP9* (4,074), *CCR1* (6,034), *GPC1* (2,492), *CD93* (4,702), *ELANE* (4,627), *BAG6* (4,044), *PIK3CA* (3,905), *HSPA8* (3,800), *TIE1* (3,172), *HS3ST2* (3,144), *SELP* (3,070), *GPC5* (2,958), *SELE* (2,952), *GLCE* (2,939), *CHGA* (2,856), *C7* (2,815), *HS2ST1* (2,775), *MASPI* (2,764), *DPP6* (2,760), *SDC4* (2,691), *GRB7* (2,589), *CBWD3* (2,576), *PDGFD* (2,569), *SPRY4* (2,556), *GALNT12* (2,514), *NLRP2* (2,497), *UBE2U* (6,475), *ACE2* (3,369), *ANGPT4* (3,034), *PAPPA* (2,744), *GNG8* (4,438), *GPAT2* (2,587), *FAM24B* (2,612), *GPC2* (2,973), *A2M* (< 2,489), *TNIP2*, *PRCP*, *BMX*, *CAV2*. Интересно, что ряд из этих генов имеют высокую оценку связи с участвующими в патогенезе генами, а также высокий уровень экспрессии в тех же тканях и органах, которые показаны для участвующих в патогенезе НАО генов. Можно предположить, что данные гены могут быть задействованы в развитии иных иммунодефицитных состояний, связанных с *SERPING1*, *F12*, *PLG*, *KNG1*, *ANGPT1*, *HS3ST6*, *MYOF*. Кроме того, несмотря на принадлежность НАО к ПИД, представляющим собой редкие заболевания, и частоту больных, страдающих от рецидивирующего/неаллергического ангиоотека в популяции около 0,05%, острый эпизод ангиоотека в общей популяции, по крайней мере один раз в течение жизни, возникает у 7,4% человек [31]. Не исключено, что с такими эпизодами могут быть связаны полиморфные варианты перечисленных выше генов.

Таким образом, с учетом пересечения результатов биоинформатического анализа, мы считаем, что потенциально связанные с развитием НАО гены-кандидаты следует разделить на группы с большей или меньшей вероятностью участия в патогенезе заболевания. К группе наиболее вероятных генов-кандидатов НАО можно отнести: *PLAT*, *HRG*, *SERPINA1*, *SERPINF2*, *MASP2*, *GRB14*, *CIQBP*, *DOK2*, *KLKB1*, *F11*, *TEK*, *KLK10*, *KRT1*, *APOH*, *CPB2*, *F2*. Вторая группа — *PRCP*, *C1S*, *THBS1*, *PLAU*, *IGFALS*, *AGPAT1*, *CEBPD*, *ENO1*, *PNPLA2*, *ARFGAP2*, *CRAT*, *IGFBP3*, *SDC2*, *CIR1*, *SDC1*, *SERPINC2*. В третью группу могут быть включены остальные гены-кандидаты, определенные с помощью HumanNet v3 на основе белок-белковых взаимодействий.

В дальнейшем, при подозрении на НАО, обследовании больных с помощью полногеномного и/или полноэкзомного секвенирования, а также при планировании разработок диагностических

наборов олигонуклеотидов, в первую очередь следует акцентировать внимание на этих генах.

Тем не менее не исключено, что ранее не рассматриваемые гены, ассоциированные с фибролизом, коагуляцией, иммунным ответом, активацией плазминогена, регуляцией уровня жидкости в теле, протеолизом, регуляцией реакции на стресс и воспаление, адгезией, процессами ассоциированными с аминокликанами, протеогликанами и гликопротеинами, экзоцитозом, продукцией цитокинов, регуляцией активности киназ и пептидаз, могут быть вовлечены в патогенез заболевания. Разнообразие генов и биологических путей наталкивает на предположение о том, что НАО является не самостоятельным заболеванием, а синдромом при ряде клинически сходных заболеваний, генетически и фенотипически отличных друг от друга.

Заключение

Выявленные нами гены-кандидаты НАО могут способствовать не только изучению механизма развития комплекса нарушений, но и диагностике, а также прогнозу течения заболевания. Патогенетически значимые мутации наиболее вероятных генов-кандидатов могут служить диагностическими биомаркерами для пациентов с необъяснимым ангиоотеком, обеспечивая анализ на молекулярном уровне для установления диагноза наследственный ангиоотек с нормальным уровнем C1-INH.

Применение биоинформатических методов в исследовании ПИД позволяет определить группу генов, потенциально участвующих в патогенезе или оказывающих влияние на течение заболевания. Получение *in silico* актуальных данных о биологическом контексте выявленных генов-кандидатов, в том числе экспрессии в тех или иных тканях, локализации продуктов и метаболитов на клеточном уровне, вовлеченности в биологические процессы, может существенно облегчить работу исследователей с результатами полноэкзомного/полногеномного секвенирования. В дальнейшем это может способствовать переходу от полногеномного секвенирования к секвенированию и анализу коротких, значимых для патогенеза, участков генома, тем самым снижая время и стоимость генетического тестирования при подозрении на то или иное заболевание. Кроме того, такой подход содействует расширению понимания генетической основы и иммунопатогенеза ПИД, облегчая поиск терапевтических мишеней.

Список литературы / References

1. Бодня О.С., Демина Д.В., Кузьменко Н.Б., Латышева Е.А., Латышева Т.В., Миличкина А.М., Пампура А.Н., Сизякина Л.П., Тотолян А.А., Уханова О.П., Федотова Н.В., Фомина Д.С. Долгосрочная профилактика наследственного ангиоотёка в России: резолюция Совета экспертов // Российский аллергологический журнал, 2021. Т. 18. №3. С. 126-130. Bodnya O.S., Demina D.V., Kuzmenko N.B., Latysheva E.A., Latysheva T.V., Milichkina A.M., Pampura A.N., Sizyakina L.P., Totolian A.A., Ukhanova O.P., Fedotova N.V., Fomina D.S. Long-term prophylaxis therapy in patients with hereditary angioedema in Russia: resolution of the expert Council. *Rossiyskiy allergologicheskiy zhurnal = Russian Journal of Allergy*, 2021, Vol. 18, no. 3, pp. 126-130. (In Russ.)]
2. Мухина А.А., Кузьменко Н.Б., Родина Ю.А., Хорева А.Л., Моисеева А.А., Швеиц О.А., Кондратенко И.В., Латышева Т.В., Латышева Е.А., Костинова А.М., Пашченко О.Е., Пампура А.Н., Зиновьева Н.В., Зимин С.Б., Ильина Н.И., Бологов А.А., Продеус А.П., Балашов Д.Н., Фомина Д.С., Деордиева Е.А., Кутлянцева А.Ю., Вахлярская С.С., Барычева Л.Ю., Кубанова Л.Т., Хачирова Л.С., Сибгатулина Ф.И., Тузанкина И.А., Болков М.А., Шахова Н.В., Камалтынова Е.М., Хайруллина Р.М., Кальметьева Л.Р., Пролыгина Д.Д., Давлетбаева Г.А., Мирсаяпова И.А., Сулима Е.И., Гусева М.Н., Тотолян А.А., Миличкина А.М., Кузнецова Р.Н., Рычкова О.А., Кузьмичева К.П., Грахова М.А., Селезнева О.С., Юдина Н.Б., Орлова Е.А., Самофалова Т.В., Букина Т.В., Мигачева Н.Б., Жестков А.В., Бармина Е.В., Парфенова Н.А., Исакова С.Н., Аверина Е.В., Сазонова И.В., Старикова С.Ю., Шилова Т.В., Асекретова Т.В., Супрун Р.Н., Клещенко Е.И., Лебедев В.В., Демикхова Е.В., Демихов В.Г., Калинин В.А., Тимофеева Е.В., Ермакова А.С., Павлова Т.Б., Шинкарева В.М., Горенькова А.В., Дурягина С.Н., Смолева И.В., Александрова Т.П., Бамбаева З.В., Филиппова М.А., Грачева Е.М., Цывкина Г.И., Ефременков Е.В., Машковская Д.В., Яровая И.В., Алексеенко В.А., Фисюн И.В., Молокова Г.В., Троицкая Е.В., Гольцман Е.А., Пяткина Л.И., Власова Е.В., Уханова О.П., Чернышова Е.Г., Васильева М.М., Лаба О.М., Володина Е.В., Ипатова М.Г., Воронин К.А., Гуркина М.В., Щербина А.Ю., Новичкова Г.А., Румянцев А.Г. Эпидемиология первичных иммунодефицитов в Российской Федерации // Педиатрия им. Г.Н. Сперанского. 2020. Т. 99, № 2. С. 16-32. [Mukhina A.A., Kuzmenko N.B., Rodina Yu.A., Khoreva A.L., Moiseeva A.A., Shvets O.A., Kondratenko I.V., Latysheva T.V., Latysheva E.A., Kostinova A.M., Pashchenko O.E., Pampura A.N., Zinovieva N.V., Zimin S.B., Ilyina N.I., Bologov A.A., Prodeus A.P., Balashov D.N., Fomina D.S., Deordieva E.A., Kutlyantseva A.Yu., Vakhlyarskaya S.S., Barycheva L.Yu., Kubanova L.T., Khachirova L.S., Sibgatulina F.I., Tuzankina I.A., Bolkov M.A., Shakhova N.V., Kamaltynova E.M., Khayrullina R.M., Kalmatieva L.R., Prolygina D.D., Davletbaeva G.A., Mirsayapova I.A., Sulima E.I., Guseva M.N., Totolyan A.A., Milichkina A.M., Kuznetsova R.N., Rychkova O.A., Kuzmicheva K.P., Grakhova M.A., Selezneva O.S., Yudina N.B., Orlova E.A., Samofalova T.V., Bukina T.V., Migacheva N.B., Zhestkov A.V., Barmina E.V., Parfenova N.A., Isakova S.N., Averina E.V., Sazonova I.V., Starikova S.Yu., Shilova T.V., Asekretova T.V., Suprun R.N., Kleshchenko E.I., Lebedev V.V., Demikhova E.V., Demikhov V.G., Kalinkina V.A., Timofeeva E.V., Ermakova A.S., Pavlova T.B., Shinkareva V.M., Gorenkova A.V., Duryagina S.N., Smoleva I.V., Alexandrova T.P., Bambaeva Z.V., Filippova M.A., Gracheva E.M., Tsyvkina G.I., Efremenkov E.V., Mashkovskaya D.V., Yarovaya I.V., Alekseenko V.A., Fisyun I.V., Molokova G.V., Troitskaya E.V., Goltsman E.A., Pyatkina L.I., Vlasova E.V., Ukhanova O.P., Chernyshova E.G., Vasilyeva M.M., Laba O.M., Volodina E.V., Ipatova M.G., Voronin K.A., Gurkina M.V., Shcherbina A.Yu., Novichkova G.A., Rumyantsev A.G. Epidemiology of primary immunodeficiencies in the Russian Federation. *Pediatrriya im. G.N. Speranskogo = G. Speransky Pediatrics*, 2020, Vol. 99, no. 2, pp. 16-32. (In Russ.)]
3. Тузанкина И.А., Каракина М.Л., Власова Е.В. Анализ клинических проявлений дебюта первичных иммунодефицитов у взрослых // Медицинская иммунология, 2014. Т. 16, № 4. С. 367-374. [Tuzankina I.A., Karakina M.L., Vlasova E.V. Analysis of initial clinical features of primary immunodeficiencies in adults. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2014, Vol. 16, no. 4, pp. 367-374. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2014-4-367-374.
4. Agostoni A., Aygören-Pürsün E., Binkley K.E., Blanch A., Bork K., Bouillet L., Bucher C., Castaldo A.J., Cicardi M., Davis A.E., de Carolis C., Drouet C., Duponchel C., Farkas H., Fáy K., Fekete B., Fischer B., Fontana L., Füst G., Giacomelli R., Gröner A., Hack C.E., Harmat G., Jakenfelds J., Juers M., Kalmár L., Kaposi P.N., Karádi I., Kitzinger A., Kollár T., Kreuz W., Lakatos P., Longhurst H.J., Lopez-Trascasa M., Martinez-Saguer I., Monnier N., Nagy I., Németh E., Nielsen E.W., Nuijens J.H., O'grady C., Pappalardo E., Penna V., Perricone C., Perricone R., Rauch U., Roche O., Rusicke E., Späth P.J., Szendei G., Takács E., Tordai A., Truedsson L., Varga L., Visy B., Williams K., Zanichelli A., Zingale L. Hereditary and acquired angioedema: problems and progress: proceedings of the third C1 esterase inhibitor deficiency workshop and beyond. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2004, Vol. 114, no. 3 Suppl., pp. S51-131.
5. Ariano A., D'Apolito M., Bova M., Bellanti F., Loffredo S., D'Andrea G., Intrieri M., Petraroli A., Maffione A.B., Spadaro G., Santacroce R., Margaglione M. A myoferlin gain-of-function variant associates with a new type of hereditary angioedema. *Allergy*, 2020, Vol. 75, no. 11, pp. 2989-2992.
6. Bafunno V., Firinu D., D'Apolito M., Cordisco G., Loffredo S., Leccese A., Bova M., Barca M.P., Santacroce R., Cicardi M., del Giacco S., Margaglione M. Mutation of the angiopoietin-1 gene (ANGPT1) associates with a new type of hereditary angioedema. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2018. Vol. 141, no. 3, pp. 1009-1017.

7. Bork K., Wulff K., Möhl B.S., Steinmüller-Magin L., Witzke G., Hardt J., Meinke P. Novel hereditary angioedema linked with a heparan sulfate 3-O-sulfotransferase 6 gene mutation. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2021, Vol. 148, no. 4, pp. 1041-1048.
8. Bova M., de Feo G., Parente R., De Pasquale T., Gravante C., Pucci S., Nettis E., Triggiani M. Hereditary and Acquired Angioedema: Heterogeneity of Pathogenesis and Clinical Phenotypes. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, 2018, Vol. 175, no. 3, pp. 126-135.
9. Bousfiha A., Jeddane L., Picard C., Al-Herz W., Ailal F., Chatila T., Cunningham-Rundles C., Etzioni A., Franco J.L., Holland S.M., Klein C., Morio T., Ochs H.D., Oksenhendler E., Puck J., Torgerson T.R., Casanova J.L., Sullivan K.E., Tangye S.G. Human inborn errors of immunity: 2019 Update of the IUIS Phenotypical Classification. *J. Clin. Immunol.*, 2020, Vol. 40, no. 1, pp. 66-81.
10. Busse P.J., Christiansen S.C. Hereditary Angioedema. *N. Engl. J. Med.*, 2020, Vol. 382, pp. 1136-1148.
11. Caballero T., Baeza M.L., Cabañas R., Campos A., Cimbollek S., Gómez-Traseira C. Spanish Study Group on Bradykinin-Induced Angioedema (SGBA). Consensus statement on the diagnosis, management, and treatment of angioedema mediated by bradykinin. Part II. Treatment, follow-up, and special situations. *J. Investig. Allergol. Clin. Immunol.*, 2011, Vol. 21, no. 6, pp. 422-441.
12. Cao Y., Liu S., Zhi Y. Advances in the pathogenesis of hereditary angioedema. *Zhongguo yi xue ke xue Yuan xue bao*, 2020, Vol. 42, no. 5, pp. 686-690. (In Chinese)
13. Craig T. Triggers and short-term prophylaxis in patients with hereditary angioedema. *Allergy Asthma Proc.*, 2020, Vol. 41, pp. S30-S34.
14. de Maat S., Joseph K., Maas C., Kaplan A.P. Blood Clotting and the Pathogenesis of Types I and II Hereditary Angioedema. *Clin. Rev. Allergy Immunol.*, 2021, Vol. 60, no. 3, pp. 348-356.
15. Ferrara A.L., Cristinziano L., Petraroli A., Bova M., Gigliotti M. C., Marcella S., Modestino L., Varricchi G., Braile M., Galdiero M.R., Spadaro G., Loffredo S. Roles of immune cells in hereditary angioedema. *Clin. Rev. Allergy Immunol.*, 2021, Vol. 60, pp. 369-382.
16. Franz M., Rodriguez H., Lopes C., Zuberi K., Montojo J., Bader G.D., Morris Q. GeneMANIA update 2018. *Nucleic Acids Res.*, 2018, Vol. 46, no. W1, pp. W60-W64.
17. Germenis A.E., Margaglione M., Pesquero J.B., Farkas H., Cichon S., Csuka D., Lera A.L., Rijavec M., Jolles S., Szilagyi A., Trascasa M.L., Veronez C.L., Drouet C., Zamanakou M.; Hereditary Angioedema International Working Group. International Consensus on the Use of Genetics in the Management of Hereditary Angioedema. *J. Allergy Clin. Immunol. Pract.*, 2020, Vol. 8, no. 3, pp. 901-911.
18. Kalmar L., Hegedüs T., Farkas H., Nagy M., Tordai A. HAEdb: a novel interactive, locus-specific mutation database for the C1 inhibitor gene. *Hum. Mutat.*, 2005, Vol. 25, no. 1, pp. 1-5.
19. Kaplan A.P., Joseph K. Pathogenesis of Hereditary Angioedema: The Role of the Bradykinin-Forming Cascade. *Immunol. Allergy Clin. North Am.*, 2017, Vol. 37, no. 3, pp. 513-525.
20. Kim C.Y., Baek S., Cha J., Yang S., Kim E., Marcotte E.M., Hart T., Lee I. HumanNet v3: an improved database of human gene networks for disease research. *Nucleic Acids Res.*, 2022, Vol. 50, no. D1, pp. D632-D639.
21. Loffredo S., Bova M., Suffritti C., Borriello F., Zanichelli A., Petraroli A., Varricchi G., Triggiani M., Cicardi M., Marone G. Elevated plasma levels of vascular permeability factors in C1 inhibitor-deficient hereditary angioedema. *Allergy*, 2016, Vol. 71, no. 7, pp. 989-996.
22. Maetzel A., Smith M.D., Duckworth E.J., Hampton S.L., De Donatis G.M., Murugesan N., Rushbrooke L.J., Li L., Francombe D., Feener E.P., Yea C.M. KVD900, an oral on-demand treatment for hereditary angioedema: Phase 1 study results. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2022, Vol. 149, no. 6, pp. 2034-2042.
23. Margaglione M., D'Apolito M., Santocroce R., Maffione A.B. Hereditary angioedema: Looking for bradykinin production and triggers of vascular permeability. *Clin. Exp. Allergy*, 2019, Vol. 49, no. 11, pp. 1395-1402.
24. Maurer M., Grattan C.E.H., Zuraw B.L. Urticaria and angioedema without wheals. *Allergy (Fourth Edition)*, 2012, pp. 247-261.
25. Mendoza-Alvarez A., Muñoz-Barrera A., Rubio-Rodríguez L.A., Marcelino-Rodríguez I., Corrales A., Iñigo-Campos A., Callero A., Perez-Rodríguez E., García-Robaina J.C., González-Montelongo R., Lorenzo-Salazar J.M., Flores C. Interactive Web-Based Resource for Annotation of Genetic Variants Causing Hereditary Angioedema (HADA): Database Development, Implementation, and Validation. *J. Med. Internet Res.*, 2020, Vol. 22, no. 10, e19040. doi: 10.2196/19040.
26. Mukhina A.A., Kuzmenko N.B., Rodina Y.A., Kondratenko I.V., Bologov A.A., Latysheva T.V., Prodeus A.P., Pampura A.N., Balashov D.N., Ilyina N.I., Latysheva E.A., Deordieva E.A., Shvets O.A., Deripapa E.V., Abramova I.N., Pashenko O.E., Vahlyarskaya S.S., Zinovyeva N.V., Zimin S.B., Skorobogatova E.V., Machneva E.B., Fomina D.S., Ipatova M.G., Barycheva L.Y., Khachirova L.S., Tuzankina I.A., Bolkov M.A., Shakhova N.V., Kamaltynova E.M., Sibgatullina F.I., Guseva M.N., Kuznetsova R.N., Milichkina A.M., Totolian A.A., Kalinina N.M., Goltsman E.A., Sulima E.I., Kutlyanceva A.Y., Moiseeva A.A., Khoreva A.L., Nesterenko Z., Tymofeeva E.V., Ermakova A., Proligina D.D., Kalmatieva L.R., Davletbaieva G.A., Mirsayapova I.A., Richkova O.A., Kuzmicheva K.P., Grakhova M.A., Yudina N.B., Orlova E.A., Selezneva O.S., Piskunova S.G., Samofalova T.V., Bukina T.V., Pechkurova A.D., Migacheva N., Zhestkov A., Barmina E.V., Parfenova N.A., Isakova S.N., Averina E.V.,

Sazonova I.V., Starikova S.Y., Shilova T.V., Asekretova T.V., Suprun R.N., Kleshchenko E.I., Lebedev V.V., Demikhova E.V., Demikhov V.G., Kalinkina V.A., Gorenkova A.V., Duryagina S.N., Pavlova T.B., Shinkareva V.M., Smoleva I.V., Aleksandrova T.P., Bambaeva Z.V., Philippova M.A., Gracheva E.M., Tcyvkina G.I., Efremenko A.V., Mashkovskaya D., Yarovaya I.V., Alekseenko V.A., Fisyun I.V., Molokova G.V., Troitskaya E.V., Piatkina L.I., Vlasova E.V., Ukhanova O., Chernishova E.G., Vasilieva M., Laba O.M., Volodina E., Safonova E.V., Voronin K.A., Gurkina M.V., Rumyantsev A.G., Novichkova G.A., Shcherbina A.Y. Primary Immunodeficiencies in Russia: Data from the National Registry. *Front. Immunol.*, 2020, Vol. 11, 1491. doi: 10.3389/fimmu.2020.01491.

27. Nzeako U.C., Frigas E., Tremaine W.J. Hereditary angioedema: a broad review for clinicians. *Arch. Intern. Med.*, 2001, Vol. 161, no. 20, pp. 2417-2429.

28. Patel G., Pongracic J.A. Hereditary and acquired angioedema. *Allergy Asthma Proc.*, 2019. Vol. 40, no. 6, pp. 441-445.

29. Ponard D., Gaboriaud C., Charignon D., Ghannam A., Wagenaar-Bos I.G.A., Roem D., López-Lera A., López-Trascasa M., Tosi M., Drouet C. SERPING1 mutation update: Mutation spectrum and C1 Inhibitor phenotypes. *Hum. Mutat.*, 2020, Vol. 41, no. 1, pp. 38-57.

30. Rosi-Schumacher M., Shah S.J., Craig T., Goyal N. Clinical manifestations of hereditary angioedema and a systematic review of treatment options. *Laryngoscope Investig. Otolaryngol.*, 2021, Vol. 6, no. 3, pp. 394-403.

31. Santacroce R., D'Andrea G., Maffione A.B., Margaglione M., d'Apolito M. The Genetics of Hereditary Angioedema: A Review. *J. Clin. Med.*, 2021, Vol. 10, no. 9, 2023. doi: 10.3390/jcm10092023.

32. Veronez C.L., Csuka D., Sheikh F.R., Zuraw B.L., Farkas H., Bork K. The Expanding Spectrum of Mutations in Hereditary Angioedema. *J. Allergy Clin. Immunol. Pract.*, 2021, Vol. 9, no. 6, pp. 2229-2234.

33. Warde-Farley D., Donaldson S.L., Comes O., Zuberi K., Badrawi R., Chao P., Franz M., Grouios C., Kazi F., Lopes C.T., Maitland A., Mostafavi S., Montojo J., Shao Q., Wright G., Bader G.D., Morris Q. The GeneMANIA prediction server: biological network integration for gene prioritization and predicting gene function. *Nucleic Acids Res.*, 2010, Vol. 38, pp. W214-220.

Авторы:

Печникова Н.А. — младший научный сотрудник ФБУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Санкт-Петербург, Россия

Останкова Ю.В. — к.б.н., старший научный сотрудник, заведующая лабораторией ФБУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Санкт-Петербург, Россия

Тотolian Арег А. — д.м.н., профессор, академик РАН, директор ФБУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека; заведующий кафедрой иммунологии ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Authors:

Pechnikova N.A., Junior Research Associate, Saint Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation

Ostankova Yu.V., PhD (Biology), Senior Research Associate, Head, Laboratory, Saint Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation

Totolian Areg A., PhD, MD (Medicine), Professor, Full Member, Russian Academy of Sciences, Director, Saint Petersburg Pasteur Institute; Head, Department of Immunology, First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Поступила 08.09.2022
Принята к печати 08.09.2022

Received 08.09.2022
Accepted 08.09.2022

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ИММУНОГЕНЕТИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ ДОНОРОВ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ СТЕЛОВЫХ КЛЕТОК РЕГИСТРОВ ДВУХ РОССИЙСКИХ МЕГАПОЛИСОВ

Бубнова Л.Н.^{1,2}, Кузьмич Е.В.¹, Павлова И.Е.¹, Беляева Е.В.¹,
Терентьева М.А.¹

¹ ФГБУ «Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии Федерального медико-биологического агентства», Санкт-Петербург, Россия

² ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Резюме. Эффективность поиска HLA-совместимого неродственного донора гемопоэтических стволовых клеток зависит от ряда факторов, среди которых наиболее важными являются стандарт первичного HLA-типирования и иммуногенетическое разнообразие донорского пула. Своевременность подбора донора гарантирует выполнение аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток в оптимальные сроки, что, в свою очередь, оказывает положительное влияние на исход трансплантации. Для того чтобы сократить время поиска донора, спектр первичного иммуногенетического обследования волонтеров, вступающих в регистр доноров гемопоэтических стволовых клеток ФГБУ РосНИИГТ ФМБА России, с 2019 года включает HLA-типирование генов HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DRB1, HLA-DQB1. Целью нашего исследования являлся анализ результатов HLA-типирования потенциальных доноров гемопоэтических стволовых клеток регистра ФГБУ РосНИИГТ ФМБА России в сравнении с иммуногенетическим профилем доноров регистров, сформированных в двух российских мегаполисах. У потенциальных доноров нашего регистра выявлены все известные к настоящему времени группы аллелей генов HLA-C, HLA-DRB1, HLA-DQB1, 19 из 21 открытой группы аллелей гена HLA-A, 34 из 36 известных групп аллелей гена HLA-B. С максимальной частотой определялись следующие группы HLA-аллелей: A*02 (0,2957), A*03 (0,1432), A*01 (0,1155), A*24 (0,1128); B*07 (0,1282), B*35 (0,1084), B*44 (0,0921), B*18 (0,0745); C*07 (0,2738), C*04 (0,1361), C*12 (0,1202), C*03 (0,1134), C*06 (0,1127); DRB1*15 (0,1445), DRB1*07 (0,1420), DRB1*13 (0,1271), DRB1*01 (0,1269), DRB1*11 (0,1216); DQB1*03 (0,3517), DQB1*06 (0,2269). Установлены 1702 HLA-A*-B*-C*-DRB1*-DQB1*-гаплотипа. Частота девяти HLA-гаплотипов превышала 0,01: A*01-B*08-C*07-DRB1*03-DQB1*02 (0,0366), A*03-B*07-C*07-DRB1*15-DQB1*06 (0,0269), A*03-B*35-C*04-DRB1*01-DQB1*05 (0,0238), A*02-B*13-C*06-DRB1*07-DQB1*02 (0,0204), A*02-B*07-C*07-DRB1*15-DQB1*06 (0,0184), A*25-B*18-C*12-DRB1*15-DQB1*06 (0,0127), A*02-B*18-C*07-DRB1*11-DQB1*03 (0,0126),

Адрес для переписки:

Бубнова Людмила Николаевна
ФГБУ «Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии Федерального медико-биологического агентства»
191024, Россия, Санкт-Петербург,
ул. 2-я Советская, 16.
Тел.: 8 (911) 925-00-10.
E-mail: lnubnova@mail.ru

Address for correspondence:

Bubnova Lyudmila N.
Russian Research Institute of Haematology
and Transfusiology, Federal Medical and Biological Agency
191024, Russian Federation, St. Petersburg,
2nd Sovetskaya str., 16.
Phone: 7 (911) 925-00-10.
E-mail: lnubnova@mail.ru

Образец цитирования:

Л.Н. Бубнова, Е.В. Кузьмич, И.Е. Павлова, Е.В. Беляева, М.А. Терентьева «Сравнительный анализ иммуногенетических характеристик потенциальных доноров гемопоэтических стволовых клеток регистров двух российских мегаполисов» // Медицинская иммунология, 2022. Т. 24, № 5. С. 1047-1056. doi: 10.15789/1563-0625-CAO-2539
© Бубнова Л.Н. и соавт., 2022

For citation:

L.N. Bubnova, E.V. Kuzmich, I.E. Pavlova, E.V. Belyaeva, M.A. Terentyeva "Comparative analysis of immunogenetic characteristics of potential hematopoietic stem cell donors from the registries of two Russian megapolises", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2022, Vol. 24, no. 5, pp. 1047-1056. doi: 10.15789/1563-0625-CAO-2539
DOI: 10.15789/1563-0625-CAO-2539

A*02-B*15-C*03-DRB1*04-DQB1*03 (0,0123), A*02-B*41-C*17-DRB1*13-DQB1*03 (0,0109). Выполнен сравнительный анализ полученных данных с результатами обследования потенциальных доноров гемопоэтических стволовых клеток регистров ФГБОУ ВО ПСПбГМУ им. акад. И.П. Павлова Минздрава России (Санкт-Петербург) и ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России (Москва). Установлено, что шесть наиболее распространенных HLA-гаплотипов у доноров трех российских регистров, сформированных в мегаполисах, совпадают по позиции и близки по частоте. Выявлены различия в распределении менее распространенных HLA-гаплотипов. Результаты выполненной работы свидетельствуют об иммуногенетическом разнообразии пула доноров гемопоэтических стволовых клеток регистра ФГБУ РосНИИГТ ФМБА России, что, наряду с использованием современных международных стандартов первичного иммуногенетического обследования, является необходимым условием для осуществления эффективного поиска доноров для пациентов, нуждающихся в проведении аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток.

Ключевые слова: регистр доноров гемопоэтических стволовых клеток, потенциальный донор, HLA-гаплотипы, группы HLA-аллелей

COMPARATIVE ANALYSIS OF IMMUNOGENETIC CHARACTERISTICS OF POTENTIAL HEMATOPOIETIC STEM CELL DONORS FROM THE REGISTRIES OF TWO RUSSIAN MEGAPOLISES

Bubnova L.N.^{a, b}, Kuzmich E.V.^a, Pavlova I.E.^a, Belyaeva E.V.^a, Terentyeva M.A.^a

^a Russian Research Institute of Haematology and Transfusiology, Federal Medical and Biological Agency, St. Petersburg, Russian Federation

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

Abstract. Efficacy of search for the unrelated compatible transplant donors depends on a number of factors. Of most importance are the standards of primary HLA typing, and the immunogenetic diversity of the donor pool. Timely donor selection guarantees the optimal timing for stem cell transplantation. This factor exerts positive influence upon the transplantation outcomes. In 2019, The Bone Marrow Donors Registry at the Russian Research Institute of Haematology and Transfusiology has implemented HLA-typing for HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DRB1, HLA-DQB1 genes as a standard for primary immunogenetic examination, in order to reduce the donor search period. The aim of our study was to evaluate the HLA typing results for potential stem cell donors at our Registry as compared with immunogenetic profile of donors at the Registries arranged in two Russian megapolises. All currently known groups of HLA-C, HLA-DRB1, HLA-DQB1 gene alleles, 19 of 21 open groups of HLA-A gene alleles, 34 of 36 known groups of HLA-B gene alleles were screened in the donors from our Registry. The most common HLA alleles groups were as follows: A*02 (0.2957), A*03 (0.1432), A*01 (0.1155), A*24 (0.1128); B*07 (0.1282), B*35 (0.1084), B*44 (0.0921), B*18 (0.0745); C*07 (0.2738), C*04 (0.1361), C*12 (0.1202), C*03 (0.1134), C*06 (0.1127); DRB1*15 (0.1445), DRB1*07 (0.1420), DRB1*13 (0.1271), DRB1*01 (0.1269), DRB1*11 (0.1216); DQB1*03 (0.3517), DQB1*06 (0.2269). A total of 1702 HLA-A*-B*-C*-DRB1*-DQB1*-haplotypes were revealed in our donor pool. The frequency of nine HLA-haplotypes exceeded 0.01: A*01-B*08-C*07-DRB1*03-DQB1*02 (0.0366), A*03-B*07-C*07-DRB1*15-DQB1*06 (0.0269), A*03-B*35-C*04-DRB1*01-DQB1*05 (0.0238), A*02-B*13-C*06-DRB1*07-DQB1*02 (0.0204), A*02-B*07-C*07-DRB1*15-DQB1*06 (0.0184), A*25-B*18-C*12-DRB1*15-DQB1*06 (0.0127), A*02-B*18-C*07-DRB1*11-DQB1*03 (0.0126), A*02-B*15-C*03-DRB1*04-DQB1*03 (0.0123), A*02-B*41-C*17-DRB1*13-DQB1*03 (0.0109). We carried out a comparative analysis of the HLA-haplotypes distribution for the donors of three Russian registers: Russian Research Institute of Haematology and Transfusiology (St. Petersburg); First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University (St. Petersburg); National Medical Research Center for Hematology (Moscow). The six most common HLA-haplotypes among the donors from three Russian registers had the same rank positions and frequencies. The differences of some less

common HLA-haplotypes distribution were determined. The results of our study indicate the immunogenetic diversity of the donor pool the Registry of Russian Research Institute of Haematology and Transfusiology. This fact, along with usage of international standards for primary immunogenetic examination is a prerequisite for effective donor search for the patients requiring stem cell transplantation.

Keywords: hematopoietic stem cell, donors, registry, HLA-haplotypes, groups of HLA-alleles

Введение

Эффективность поиска HLA-совместимого неродственного донора гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) зависит от ряда факторов, среди которых наиболее важными являются стандарт первичного HLA-типирования и иммуногенетическое разнообразие донорского пула. Своевременность подбора донора гарантирует выполнение аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (ТГСК) в оптимальные сроки, что в свою очередь оказывает положительное влияние на исход ТГСК [9, 13].

Согласно опубликованным данным, поиск совместимого неродственного донора в среднем продолжается около двух месяцев. Однако в регистры доноров костного мозга поступают все более срочные запросы, предполагающие проведение поиска донора в течение нескольких недель [11]. Для того чтобы сократить длительность поиска, регистры совершенствуют стратегию первичного иммуногенетического обследования (HLA-типирования) лиц, вступающих в регистр. Согласно данным, опубликованным Всемирной ассоциацией доноров костного мозга (World Marrow Donor Association, WMDA), все большее число регистров выполняют первичное обследование доноров расширенным спектром по сравнению с минимальными международными стандартами (HLA-типирование трех генов: HLA-A, HLA-B, HLA-DRB1) [15]. Стратегия развернутого HLA-типирования волонтеров, вступающих в регистр, способствует сокращению времени поиска донора, так как в большинстве трансплантационных центров считается оптимальной степень совместимости пациента и донора 10/10 HLA аллелей (гены HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DRB1, HLA-DQB1) [14].

Спектр первичного иммуногенетического обследования добровольцев, вступающих в регистр доноров костного мозга ФГБУ РосНИИГТ ФМБА России (далее Регистр), с 2019 года включает типирование пяти генов HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DRB1, HLA-DQB1. В настоящее время в соответствии с данным стандартом обследовано 35% потенциальных доноров Регистра.

Цель нашего исследования — анализ результатов HLA-типирования потенциальных доноров ГСК регистра ФГБУ РосНИИГТ ФМБА России

в сравнении с иммуногенетическим профилем доноров регистров, сформированных в двух российских мегаполисах.

Материалы и методы

В исследование включены 2853 потенциальных донора ГСК в возрасте от 18 до 60 лет. Медиана возраста доноров составила 30 лет. В составе обследованной группы 1569 мужчин (55%) и 1284 женщины (45%).

Биологический материал (образцы периферической крови) потенциальных доноров и согласие на проведение иммуногенетического обследования получены на этапе вступления в Регистр.

Типирование генов HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DRB1, HLA-DQB1 базового уровня разрешения выполнено с помощью методов полимеразной цепной реакции с сиквенс-специфичными праймерами (наборы производства Protrans, Германия) и полимеразной цепной реакции с олигонуклеотидными сиквенс-специфичными пробамми (наборы производства BAG HEALTH CARE, Германия).

Статистическая обработка результатов: частоты групп HLA-аллелей и HLA-гаплотипов определены методом максимального правдоподобия с применением алгоритма максимизации ожидания с помощью программного обеспечения Arlequin 3.5 [8]. Оценка различий частот HLA-гаплотипов осуществлена с помощью непараметрических статистических методов с использованием программы Epi Info 7.2 [10]. Статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$.

Результаты

Группы аллелей генов HLA класса I

В ходе исследования у потенциальных доноров Регистра выявлены 19 групп аллелей гена HLA-A из 21 группы, установленной к настоящему времени. С максимальной частотой определялись следующие: A*02 (0,2957), A*03 (0,1432), A*01 (0,1155), A*24 (0,1128). Наиболее редкими являлись: A*74 (0,0004) и A*69 (0,0006). Группы аллелей A*43, A*80 у доноров Регистра не выявлены.

Из 36 известных групп аллелей гена HLA-B определены 34. Наиболее распространенными являлись: B*07 (0,1282), B*35 (0,1084), B*44

ТАБЛИЦА 1. ЧАСТОТЫ ГРУПП АЛЛЕЛЕЙ ГЕНОВ HLA КЛАССА I У ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ ДОНОРОВ ГСК РЕГИСТРА ФГБУ РОСНИИГТ ФМБА РОССИИ

TABLE 1. FREQUENCIES OF HLA CLASS I GENE ALLELE GROUPS IN POTENTIAL HSC DONORS OF THE REGISTER OF RUSSIAN RESEARCH INSTITUTE OF HAEMATOLOGY AND TRANSFUSIOLOGY

HLA-A*			HLA-B*			HLA-C*		
Группа аллелей Allele group	Частота Frequency	SD**	Группа аллелей Allele group	Частота Frequency	SD	Группа аллелей Allele group	Частота Frequency	SD
01	0,1155	0,0028	07	0,1282	0,0027	01	0,0408	0,0026
02	0,2957	0,0035	08	0,0621	0,0022	02	0,0623	0,0027
03	0,1432	0,0029	13	0,0618	0,0020	03	0,1134	0,0036
11	0,0612	0,0021	14	0,0234	0,0011	04	0,1361	0,0043
23	0,0228	0,0012	15	0,0647	0,0019	05	0,0408	0,0026
24	0,1128	0,0023	18	0,0745	0,0021	06	0,1127	0,0042
25	0,0423	0,0016	27	0,0526	0,0018	07	0,2738	0,0052
26	0,0475	0,0016	35	0,1084	0,0023	08	0,0291	0,0021
29	0,0117	0,0008	37	0,0121	0,0008	12	0,1202	0,0038
30	0,0222	0,0010	38	0,0367	0,0016	14	0,0089	0,0011
31	0,0249	0,0012	39	0,0251	0,0011	15	0,0233	0,0021
32	0,0298	0,0013	40	0,0608	0,0021	16	0,0123	0,0015
33	0,0226	0,0012	41	0,0252	0,0013	17	0,0256	0,0020
34	0,0003	0,0001	42	0,0080	0,0002	18	0,0008	0,0003
36	0,0004	0,0002	44	0,0921	0,0022			
66	0,0069	0,0006	45	0,0024	0,0004			
68	0,0386	0,0015	46	0,0013	0,0003			
69	0,0006	0,0002	47	0,0023	0,0004			
74	0,0004	0,0001	48	0,0054	0,0006			
			49	0,0140	0,0010			
			50	0,0116	0,0010			
			51	0,0465	0,0017			
			52	0,0211	0,0010			
			53	0,0018	0,0003			
			54	0,0021	0,0003			
			55	0,0096	0,0008			
			56	0,0110	0,0008			
			57	0,0294	0,0013			
			58	0,0121	0,0009			
			59	0,0001	0,0001			
			67	0,0003	0,0001			
			73	0,0006	0,0002			
			78	0,0001	0,0001			
			81	0,0001	0,0001			

Примечание. ** – стандартное отклонение (SD).

Note. **, standard deviation (SD).

ТАБЛИЦА 2. ЧАСТОТЫ ГРУПП АЛЛЕЛЕЙ ГЕНОВ HLA КЛАССА II У ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ ДОНОРОВ ГСК РЕГИСТРА ФГБУ РОСНИИГТ ФМБА РОССИИ

TABLE 2. FREQUENCIES OF HLA CLASS II GENE ALLELE GROUPS IN POTENTIAL HSC DONORS OF THE REGISTER OF RUSSIAN RESEARCH INSTITUTE OF HAEMATOLOGY AND TRANSFUSIOLOGY

HLA-DRB1*			HLA-DQB1*		
Группа аллелей Allele group	Частота Frequency	SD	Группа аллелей Allele group	Частота Frequency	SD
01	0,1269	0,0028	02	0,1784	0,0046
03	0,0798	0,0022	03	0,3517	0,0062
04	0,1115	0,0022	04	0,0340	0,0021
07	0,1420	0,0030	05	0,2089	0,0056
08	0,0364	0,0016	06	0,2269	0,0052
09	0,0143	0,0009			
10	0,0089	0,0007			
11	0,1216	0,0028			
12	0,0248	0,0011			
13	0,1271	0,0029			
14	0,0201	0,0011			
15	0,1445	0,0025			
16	0,0421	0,0019			

(0,0921), В*18 (0,0745). С минимальной частотой определялись: В*59 (0,0001), В*78 (0,0001), В*81 (0,0001). Группы аллелей В*82, В*83 выявлены не были.

У доноров Регистра установлены все 14 групп аллелей гена HLA-C, известных к настоящему времени. Наиболее высокочастотные: С*07 (0,2738), С*04 (0,1361), С*12 (0,1202), С*03 (0,1134), С*06 (0,1127). С минимальной частотой определялась группа С*18 (0,0008) (табл. 1).

Группы аллелей генов HLA класса II

В процессе исследования у доноров Регистра определены все известные группы аллелей гена HLA-DRB1. С наибольшей частотой встретились следующие: DRB1*15 (0,1445), DRB1*07 (0,1420), DRB1*13 (0,1271), DRB1*01 (0,1269), DRB1*11 (0,1216). Наиболее редкими оказались группы аллелей DRB1*09 (0,0143) и DRB1*10 (0,0089).

Выявлены все известные группы аллелей гена HLA-DQB1. Наиболее распространенной являлась группа DQB1*03 (0,3517), наиболее редкой – DQB1*04 (0,0340) (табл. 2).

У доноров обследованной когорты определены 1702 HLA-A*-B*-C*-DRB1*-DQB1* гаплотипа. В таблице 3 представлены 20 HLA-гаплотипов, являвшихся наиболее распространенными.

Как видно из данных, представленных в таблице 3, с частотой более 1% определялись первые 9 гаплотипов. Следует отметить, что первые

два высокочастотных HLA-гаплотипа А*01-В*08-С*07-DRB1*03-DQB1*02, А*03-В*07-С*07-DRB1*15-DQB1*06 являются наиболее распространенными у представителей большинства европейских популяций [12].

Полученные нами результаты были проанализированы в сравнении с опубликованными данными, представляющими распределение HLA-A*-B*-C*-DRB1*-DQB1*-гаплотипов в регистрах двух крупнейших городов Российской Федерации. Использованы результаты обследования 10 000 потенциальных доноров ГСК регистра ФГБОУ ВО ПСПбГМУ им. акад. И.П. Павлова Минздрава России (Санкт-Петербург) [2], а также данные обследования 504 потенциальных доноров ГСК регистра ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России (Москва) [7]. В таблице 4 представлены HLA-гаплотипы, наиболее распространенные в каждом из регистров, частоты этих гаплотипов в сравниваемых регистрах, и показатель статистической значимости различий (p).

Согласно данным, представленным в таблице 4, в регистре ФГБУ РосНИИГТ ФМБА России определено большее число HLA-гаплотипов с частотой более 1%, чем в регистрах ФГБОУ ВО ПСПбГМУ им. акад. И.П. Павлова Минздрава России и ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России (девять против шести соответственно).

ТАБЛИЦА 3. ЧАСТОТЫ HLA-A*-B*-C*-DRB1*-DQB1*-ГАПЛОТИПОВ У ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ ДОНОРОВ РЕГИСТРА ФГБУ РОСНИИГТ ФМБА РОССИИ

TABLE 3. FREQUENCIES OF HLA-A*-B*-C*-DRB1*-DQB1*-HAPLOTYPES IN POTENTIAL HSC DONORS OF THE REGISTER OF RUSSIAN RESEARCH INSTITUTE OF HAEMATOLOGY AND TRANSFUSIOLOGY

№ No.	HLA-гаплотип HLA-haplotype	Частота Frequency	SD
1	A*01-B*08-C*07-DRB1*03-DQB1*02	0,0366	0,0024
2	A*03-B*07-C*07-DRB1*15-DQB1*06	0,0269	0,0021
3	A*03-B*35-C*04-DRB1*01-DQB1*05	0,0238	0,0023
4	A*02-B*13-C*06-DRB1*07-DQB1*02	0,0204	0,0022
5	A*02-B*07-C*07-DRB1*15-DQB1*06	0,0184	0,0022
6	A*25-B*18-C*12-DRB1*15-DQB1*06	0,0127	0,0014
7	A*02-B*18-C*07-DRB1*11-DQB1*03	0,0126	0,0016
8	A*02-B*15-C*03-DRB1*04-DQB1*03	0,0123	0,0016
9	A*02-B*41-C*17-DRB1*13-DQB1*03	0,0109	0,0014
10	A*30-B*13-C*06-DRB1*07-DQB1*02	0,0099	0,0013
11	A*11-B*35-C*04-DRB1*01-DQB1*05	0,0090	0,0014
12	A*01-B*57-C*06-DRB1*07-DQB1*03	0,0085	0,0015
13	A*02-B*27-C*02-DRB1*01-DQB1*05	0,0082	0,0012
14	A*24-B*07-C*07-DRB1*15-DQB1*06	0,0082	0,0013
15	A*33-B*14-C*08-DRB1*01-DQB1*05	0,0078	0,0013
16	A*23-B*44-C*04-DRB1*07-DQB1*02	0,0077	0,0013
17	A*02-B*44-C*05-DRB1*04-DQB1*03	0,0075	0,0013
18	A*02-B*15-C*03-DRB1*13-DQB1*06	0,0065	0,0013
19	A*02-B*44-C*07-DRB1*16-DQB1*05	0,0061	0,0013
20	A*24-B*13-C*06-DRB1*07-DQB1*02	0,0053	0,0011

Обсуждение

Результаты работы свидетельствуют о широком иммуногенетическом разнообразии донорского пула в регистре ФГБУ РосНИИГТ ФМБА России. У доноров Регистра выявлены все известные к настоящему времени группы аллелей генов HLA-C, HLA-DRB1, HLA-DQB1. Из 21 известной группы аллелей гена HLA-A в ходе обследования установлены 19. Что касается обнаруженных у доноров Регистра групп A*43, A*80, то они характерны для населения Африканского континента. В частности, группа A*43 определяется у жителей Южно-Африканской Республики и Замбии, а группа аллелей A*80 выявлена у жителей Ганы, Сенегала, Марокко [12]. Из 36 известных групп аллелей гена HLA-B у доноров Регистра установлены 34, не выявлены группы

B*82, B*83. Согласно данным популяционных исследований, группа аллелей B*82 характерна для жителей Кении, а также для афроамериканцев, проживающих на территории США. Группа аллелей B*83 определена у жителей Центрально-африканской Республики [12].

Из 1702 HLA-A*-B*-C*-DRB1*-DQB1*-гаплотипов, определенных у доноров Регистра, с частотой более 1% встречались девять: A*01-B*08-C*07-DRB1*03-DQB1*02, A*03-B*07-C*07-DRB1*15-DQB1*06, A*03-B*35-C*04-DRB1*01-DQB1*05, A*02-B*13-C*06-DRB1*07-DQB1*02, A*02-B*07-C*07-DRB1*15-DQB1*06, A*25-B*18-C*12-DRB1*15-DQB1*06, A*02-B*18-C*07-DRB1*11-DQB1*03, A*02-B*15-C*03-DRB1*04-DQB1*03, A*02-B*41-C*17-DRB1*13-DQB1*03.

Сравнительный анализ распределения HLA-A*-B*-C*-DRB1*-DQB1*-гаплотипов у потен-

ТАБЛИЦА 4. ЧАСТОТЫ (%) HLA-A*-B*-C*-DRB1*-DQB1*-ГАПЛОТИПОВ У ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ ДОНОРОВ ГСК РОССИЙСКИХ РЕГИСТРОВ

TABLE 4. FREQUENCIES (%) OF HLA-A*-B*-C*-DRB1*-DQB1*-HAPLOTYPES IN POTENTIAL HSC DONORS OF RUSSIAN REGISTERS

HLA-гаплотип HLA-haplotype	Регистр РосНИИГТ (1) Register of Russian Research Institute of Haematology and Transfusiology (1)	Регистр ПСПбГМУ (2) Register of First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University (2)		Регистр НМИЦ гематологии (3) Register of National Medical Research Center for Hematology (3)	
	Частота Frequency	Частота Frequency	P _{1,2}	Частота Frequency	P _{1,3}
A*01-B*08-C*07-DRB1*03-DQB1*02	3,66	3,73	> 0,05	4,1	> 0,05
A*03-B*07-C*07-DRB1*15-DQB1*06	2,69	2,93	> 0,05	2,5	> 0,05
A*03-B*35-C*04-DRB1*01-DQB1*05	2,38	2,77	> 0,05	2,3	> 0,05
A*02-B*13-C*06-DRB1*07-DQB1*02	2,04	2,03	> 0,05	1,7	> 0,05
A*02-B*07-C*07-DRB1*15-DQB1*06	1,84	1,79	> 0,05	1,6	> 0,05
A*25-B*18-C*12-DRB1*15-DQB1*06	1,27	1,23	> 0,05	1,6	> 0,05
A*02-B*18-C*07-DRB1*11-DQB1*03	1,26	0,94	> 0,05	0,9	> 0,05
A*02-B*15-C*03-DRB1*04-DQB1*03	1,23	0,68	0,006	—	—
A*02-B*41-C*17-DRB1*13-DQB1*03	1,09	0,74	0,077	—	—
A*30-B*13-C*06-DRB1*07-DQB1*02	0,99	0,99	> 0,05	—	—
A*24-B*07-C*07-DRB1*15-DQB1*06	0,82	0,98	> 0,05	—	—
A*02-B*50-C*06-DRB1*07-DQB1*02	0,29	—	—	0,9	0,034

Примечание. Данные в цитируемой публикации не представлены.

Note. The data is not presented in the cited publication.

циальных доноров ГСК регистров г. Санкт-Петербурга (регистры ФГБУ РосНИИГТ ФМБА России и ФГБОУ ВО ПСПбГМУ им. акад. И.П. Павлова Минздрава России) и г. Москвы (регистр ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России) показал, что первые шесть наиболее распространенных HLA-гаплотипов у доноров регистров совпадают и близки по частоте. Аналогичное распределение первых шести наиболее часто встречающихся HLA-A*-B*-C*-DRB1*-DQB1*-гаплотипов установлено в популяции русских, проживающих на территории Челябинской области [5]. Города Санкт-Петербург и Москва являются мегаполисами с многонациональным населением. В частности, согласно Всероссийской переписи населения 2010 года, в Санкт-Петербурге проживали представители более 200 национальностей и народностей. Тем не

менее 92,5% жителей города самоопределились как русские. Среди многонационального населения Москвы 91,6% жителей отнесли себя к русским [3]. Таким образом, совпадение профиля HLA-гаплотипов у русских Челябинской области и у доноров регистров г. Санкт-Петербурга и г. Москвы может объясняться тем, что пополнение донорского пула происходит преимущественно за счет жителей мегаполисов, среди которых преобладают русские. Однако даже невысокие доли индивидуумов других национальностей в мегаполисе в абсолютных цифрах создают разнообразие как состава населения города, так и доноров регистра, обеспечивая широкое представительство HLA-гаплотипов [1].

HLA-гаплотип A*01-B*08-C*07-DRB1*03-DQB1*02, максимально часто определяющийся у доноров регистров г. Москвы и

г. Санкт-Петербурга, является наиболее распространенным у представителей большинства европейских популяций. При этом частота этого гаплотипа в ряде стран Европы значительно выше, чем в России: в Южной Ирландии – 11,5000, на северо-западе Англии – 9,50000, в Польше – 5,8729. Второй по частоте определения HLA-гаплотип A*03-B*07-C*07-DRB1*15-DQB1*06 также характерен для населения европейских стран. HLA-гаплотип A*03-B*35-C*04-DRB1*01-DQB1*05, занимающий третью позицию, с высокой частотой определяется в популяции русских, проживающих в Нижнем Новгороде, среди населения Республики Карелия и Норвегии, а также у татар, проживающих на территории Республики Башкортостан [12]. HLA-гаплотип A*02-B*13-C*06-DRB1*07-DQB1*02, являющийся четвертым по частоте у доноров всех трех рассматриваемых регистров, характерен также для населения Северного Кавказа, для башкир и татар, проживающих на территории Республики Башкортостан, для жителей Республики Карелия и Польши [4, 12]. Пятый по распространенности у доноров регистров HLA-гаплотип A*02-B*07-C*07-DRB1*15-DQB1*06 с высокой частотой определяется среди русских Нижнего Новгорода, в популяциях башкир и татар, проживающих на территории Республики Башкортостан, а также у жителей Ирландии и Англии. HLA-гаплотип A*25-B*18-C*12-DR*15-DQB*06, занимающий шестую позицию в регистрах г. Москвы и г. Санкт-Петербурга, с максимальной частотой определяется в популяциях русских, проживающих в различных регионах Российской Федерации (г. Нижний Новгород, г. Челябинск, Москва) и среди жителей Польши [5, 6, 12].

Принадлежащий к десяти наиболее распространенным у доноров обоих регистров г. Санкт-Петербурга HLA-гаплотип A*30-B*13-C*06-DRB1*07-DQB1*02, не представлен в перечне высокочастотных HLA-гаплотипов у потенциальных доноров регистра г. Москвы. Согласно популяционным исследованиям, данный гаплотип с высокой частотой встречается у русских Нижнего Новгорода и среди бурят Забайкалья [12].

HLA-гаплотип A*02-B*15-C*03-DRB1*04-DQB1*03 более характерен для доноров регистра ФГБУ РосНИИГТ ФМБА России. В когорте доноров регистра ФГБОУ ВО ПСПбГМУ им. акад. И.П. Павлова Минздрава России данный гаплотип определяется с меньшей частотой ($p = 0,006$), а в профиле наиболее распространенных HLA-гаплотипов у потенциальных доноров регистра ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России не указан. Согласно опубликованным данным, гаплотип A*02-B*15-C*03-DRB1*04-DQB1*03

наиболее часто определяется у русских Челябинской области и в Южной Ирландии [5, 12].

В ходе исследования выявлена тенденция повышения частоты гаплотипа HLA-A*02-B*41-C*17-DRB1*13-DQB1*03 у доноров регистра ФГБУ РосНИИГТ ФМБА России по сравнению с донорами регистра ФГБОУ ВО ПСПбГМУ им. акад. И.П. Павлова Минздрава России ($p = 0,077$), а в числе наиболее часто встречающихся HLA-гаплотипов в регистре ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России этот гаплотип отсутствует. Опубликованные популяционные исследования свидетельствуют о выявлении данного гаплотипа у русских Нижнего Новгорода и Челябинской области [5, 12].

Частота определения HLA-гаплотипа A*24-B*07-C*07-DRB1*15-DQB1*06 у доноров регистров г. Санкт-Петербурга не имеет значимых различий. Тем не менее этот гаплотип является девятым по частоте в регистре ФГБОУ ВО ПСПбГМУ им. акад. И.П. Павлова Минздрава России, а в регистре ФГБУ РосНИИГТ ФМБА России только четырнадцатым. В профиле наиболее распространенных HLA-гаплотипов у потенциальных доноров регистра ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России данный гаплотип не представлен.

HLA-гаплотип A*02-B*50-C*06-DRB1*07-DQB1*02 входит в число восьми наиболее распространенных в когорте доноров регистра ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России, но не относится к часто встречающимся у доноров регистров г. Санкт-Петербурга.

Сравнительный анализ результатов иммуногенетического обследования потенциальных доноров ГСК регистров г. Санкт-Петербурга и г. Москвы демонстрирует совпадение профиля наиболее высокочастотных HLA-гаплотипов. В распределении HLA-гаплотипов, определяющихся с меньшей частотой, установлены различия, объясняемые, очевидно, некоторыми особенностями национального состава и численностью рассматриваемых регистров.

Заключение

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют об иммуногенетическом разнообразии пула доноров гемопоэтических стволовых клеток регистра ФГБУ РосНИИГТ ФМБА России, что, наряду с использованием современных международных стандартов первичного иммуногенетического обследования, является необходимым условием для осуществления эффективного поиска доноров для пациентов, нуждающихся в проведении аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток.

Список литературы / References

1. Бубнова Л.Н., Павлова И.Е., Кузьмич Е.В., Терентьева М.А., Беляева Е.В., Глазанова Т.В., Сидоркевич С.В. Развитие регистра доноров костного мозга Российского НИИ гематологии и трансфузиологии ФМБА России // Трансфузиология, 2022. Т. 23, № 2. С. 171-183. [Bubnova L.N., Pavlova I.E., Kuzmich E.V., Terentyeva M.A., Belyaeva E.V., Glazanova T.V., Sidorkevich S.V. Development of the bone marrow donor registry of the Russian research institute of hematology and transfusiology of the FMBA of Russia. *Transfuziologiya* = *Transfuziologiya*, 2022, Vol. 23, no. 2, pp. 171-183. (In Russ.)]
2. Бубнова Л.Н., Кузьмич Е.В., Павлова И.Е., Терентьева М.А., Алянский А.Л., Беркос А.С., Иванова Н.Е., Моисеев И.С., Кулагин А.Д., Сидоркевич С.В. Сравнительный анализ распределения HLA-A*-B*-C*-DRB1*-DQB1*-гаплотипов у потенциальных доноров гемопоэтических стволовых клеток регистров г. Санкт-Петербурга // Вестник гематологии, 2022. Т. XVIII, № 2. С. 42-43. [Bubnova L.N., Kuzmich E.V., Pavlova I.E., Terentyeva M.A., Alyansky A.L., Berkos A.S., Ivanova N.E., Moiseev I.S., Kulagin A.D., Sidorkevich S.V. Comparative analysis of the HLA-A*-B*-C*-DRB1*-DQB1*-haplotypes distribution in potential donors of hematopoietic stem cells registers of St. Petersburg. *Vestnik gematologii* = *Bulletin of Hematology*, 2022, Vol. XVIII, no. 2, pp. 42-43. (In Russ.)]
3. Всероссийская перепись населения 2010 года; Т. 4. Национальный состав и владение языками, гражданство, пункт 4 [Электронный ресурс]. Режим доступа: https://gks.ru/free_doc/new_site/perepis2010/croc/perepis_itogi1612.htm. (Дата обращения 13.05.2022). [All-Russian population census 2010, Vol. 4. Ethnic composition and language skills, citizenship, point 4 [Electronic resource]. Access mode: https://gks.ru/free_doc/new_site/perepis2010/croc/perepis_itogi1612.htm. (Date of application May 13, 2022).]
4. Логинова М.А., Смирнова Д.Н., Кутявина С.С., Махова О.А., Кашин К.П., Парамонов И.В. Иммуногенетическая характеристика потенциальных доноров гемопоэтических стволовых клеток, рекрутированных на территории Северного Кавказа // Сибирский научный медицинский журнал, 2021. Т. 41, № 1. С. 69-80. [Loginova M.A., Smirnova D.N., Kutayavina S.S., Makhova O.A., Kashin K.P., Paramonov I.V. Immunogenetic characteristics of potential donors of hemopoietic stem cells recruited in the North Caucasus. *Sibirskiy nauchnyy meditsinskiy zhurnal* = *Siberian Scientific Medical Journal*, 2021, Vol. 41, no. 1, pp. 69-80. (In Russ.)]
5. Суслова Т.А., Вавилов М.Н., Сташкевич Д.С., Беляева С.В., Хромова Е.Б., Евдокимов А.В., Горелова А.К., Бурмистрова А.Л. Иммуногенетический профиль (HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DRB1, HLA-DQB1) популяции русских Челябинской области // Гематология и трансфузиология, 2015. Т. 60, № 3. С. 28-35. [Suslova T.A., Vavilov M.N., Stashkevich D.S. 1, Belyaeva S.V., Khromova E.B., Evdokimov A.V., Gorelova A.K., Burmistrova A.L. Immunogenetic profile (HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DRB1, HLA-DQB1) of the Russian population in Chelyabinsk region. *Gematologiya i transfuziologiya* = *Russian Journal of Hematology and Transfusiology*, 2015, Vol. 60, no. 3, pp. 28-35. (In Russ.)]
6. Хамаганова Е.Г., Кузьминова Е.П., Чапова Р.С., Гапонова Т.В., Савченко В.Г. HLA-A*/B*/C*/DRB1*/DQB1*-гены и гаплотипы у доноров костного мозга регистра ФГБУ «Гематологический научный центр» Минздрава России, самоопределившихся как русские // Гематология и трансфузиология, 2017. Т. 62, № 2. С. 65-70. [Khamaganova E.G., Kuzminova E.P., Chapova R.S., Gaponova T.V., Savchenko V.G. HLA-A*/B*/C*/DRB1*/DQB1*-genes and haplotypes in self-assessment as the Russians donors of Bone Marrow Registry (National Research Center for Hematology). *Gematologiya i transfuziologiya* = *Russian Journal of Hematology and Transfusiology*, 2017, Vol. 62, no. 2, pp. 65-70. (In Russ.)]
7. Хамаганова Е.Г., Кузьминова Е.П., Чапова Р.С., Чугреева Т.П., Гапонова Т.В., Савченко В.Г. HLA-A*~B*~C*~DRB1*~DQB1*-гаплотипы у доноров гемопоэтических стволовых клеток в регистре ФГБУ ГНЦ МЗ РФ // Вестник гематологии, 2016. Т. XII, № 2. С. 64-65. [Khamaganova E.G., Kuzminova E.P., Chapova R.S., Chugreeva T.P., Gaponova T.V., Savchenko V.G. HLA-A*~B*~C*~DRB1*~DQB1*-haplotypes in hematopoietic stem cell donors in the register of the Federal State Budgetary Institution of the Ministry of Health of the Russian Federation. *Vestnik gematologii* = *Bulletin of Hematology*, 2016, Vol. XII, no. 2, pp. 64-65. (In Russ.)]
8. Arlequin: An Integrated Software for Population Genetics Data Analysis [cmpg.unibe.ch]. Arlequin ver. 3.5.2.2 [released on 02.08.2015; date of access May 2022]. Available at: <http://cmpg.unibe.ch/software/arlequin35/>.
9. Craddock C., Labopin M., Pillai S., Finke J., Bunjes H., Greinix H., Ehninger G., Stelckel N.K., Zander A.R., Schwerdtfeger R., Buchholz S., Kolb H.J., Volin L., Fauser A., Polge E., Schmid C., Mohty M., Rocha V. Factors predicting outcome after unrelated donor stem cell transplantation in primary refractory acute myeloid leukaemia. *Leukemia*, 2011, Vol. 25, no. 5, pp. 808-813.
10. Epi Info™ for Windows. Epi Info ver. 7.2. [Date of access May 2022]. Available at: <https://www.cdc.gov/epiinfo/pc.html>.
11. Evseeva I., Foeken L., Madrigal A. The role of unrelated donor registries in HSCT. The EBMT Handbook, 2019, pp. 19-26.
12. HLA haplotype freq search [allelefreqencies.net]. Allele Frequency Net Database [Date of access May 2022]. Available at: <http://www.allelefreqencies.net/hla6003a.asp>.

13. Schmid Ch. Optimal timing and conditioning regimen in allogeneic hematopoietic cell transplantation for AML. *Acta Haematol. Pol.*, 2021, Vol. 52, no. 4, pp. 237-241.

14. Tiercy J.M. How to select the best available related or unrelated donor of hematopoietic stem cells? *Haematologica*, 2016, Vol. 101, no. 6, pp. 680-687.

15. WMDA Global Trends Report 2020 [wmda.info]. WMDA. [Date of access May 2022]. Available at: <https://wmda.info/wp-content/uploads/2021/05/GTR-2020-Summary-slides.pdf>.

Авторы:

Бубнова Л.Н. — д.м.н., профессор, заслуженный деятель науки РФ, руководитель Центра иммунологического типирования тканей клиники ФГБУ «Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии Федерального медико-биологического агентства»; профессор кафедры иммунологии ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Кузьмич Е.В. — к.б.н., старший научный сотрудник НИЛ иммунологии ФГБУ «Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии Федерального медико-биологического агентства», Санкт-Петербург, Россия

Павлова И.Е. — д.м.н., главный научный сотрудник НИЛ иммунологии ФГБУ «Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии Федерального медико-биологического агентства», Санкт-Петербург, Россия

Беляева Е.В. — к.м.н., старший научный сотрудник НИЛ иммунологии ФГБУ «Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии Федерального медико-биологического агентства», Санкт-Петербург, Россия

Терентьева М.А. — врач клинической лабораторной диагностики регистра доноров гемопоэтических стволовых клеток Центра иммунологического типирования тканей клиники ФГБУ «Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии Федерального медико-биологического агентства», Санкт-Петербург, Россия

Authors:

Bubnova L.N., PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Center of Tissues Typing, Russian Research Institute of Haematology and Transfusiology, Federal Medical and Biological Agency; Professor, Department of Immunology, First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Kuzmich E.V., PhD (Biology), Senior Research Associate, Research Laboratory of Immunology, Russian Research Institute of Haematology and Transfusiology, Federal Medical and Biological Agency, St. Petersburg, Russian Federation

Pavlova I.E., PhD, MD (Medicine), Chief Research Associate, Research Laboratory of Immunology, Russian Research Institute of Haematology and Transfusiology, Federal Medical and Biological Agency, St. Petersburg, Russian Federation

Belyaeva E.V., PhD (Medicine), Senior Research Associate, Research Laboratory of Immunology, Russian Research Institute of Haematology and Transfusiology, Federal Medical and Biological Agency, St. Petersburg, Russian Federation

Terentyeva M.A., Doctor of Clinical Laboratory Diagnostics of the Hematopoietic Stem Cell Donors Register, Center of Tissues Typing, Russian Research Institute of Haematology and Transfusiology, Federal Medical and Biological Agency, St. Petersburg, Russian Federation

Поступила 27.06.2022
Принята к печати 29.07.2022

Received 27.06.2022
Accepted 29.07.2022

ВЛИЯНИЕ РАСТВОРИМЫХ ФАКТОРОВ МАКРОФАГОВ M2-ФЕНОТИПА НА ГЕМОПОЭЗ ПРИ ДЕПРЕССИВНО- ПОДОБНОМ СОСТОЯНИИ

**Орловская И.А., Топоркова Л.Б., Княжева М.А., Савкин И.В.,
Серенко Е.В., Гойман Е.В., Шевченко Ю.А., Маркова Е.В.**

*ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии»,
г. Новосибирск, Россия*

Резюме. Психологический хронический социальный стресс провоцирует тревожное поведение и депрессивные расстройства. Вызванные длительным стрессом нейроэндокринные сигналы изменяют функционирование иммунных (центральных и периферических) органов. В костном мозге наблюдается усиленный миелопоэз, в ущерб лимфо- и эритропоэзу, с усиленной эмиграцией костномозговых клеток моноцитарного ряда на периферию и приобретением ими «воспалительного» фенотипа. Последующая миграция таких моноцитов в мозг с дифференцированием в макрофаги первого типа (M1), формирующие воспалительные сигналы, их воздействие на эндотелиальные клетки и микроглию, приводит к повышенной продукции цитокинов, хемокинов, молекул адгезии, что ускоряет аккумуляцию мигрирующих в мозг костномозговых моноцитов. Сигналы от костномозговых моноцитов и активированной микроглии обеспечивают нейровоспалительный статус, что и ведет к изменению поведения. Данные о присутствии в мозге у депрессивных пациентов нерезидентных костномозговых макрофагов обосновывают необходимость исследования гемопоэза при депрессивно-подобных состояниях. Характерной особенностью макрофагов является выраженная пластичность, способность приобретать M1- или M2-фенотип в зависимости от сигналов микроокружения. M1 проявляют высокую провоспалительную активность и обладают нейродеструктивными свойствами, тогда как M2 характеризуются низкой провоспалительной активностью и выраженным регенераторным потенциалом за счет продукции комплекса растворимых медиаторов и цитокинов, включая нейротрофические и иммунорегуляторные, в том числе противовоспалительные факторы, обеспечивающие нейропротекцию, стимулирующие нейрогенез, синаптогенез, рост и миелинизацию аксонов, что теоретически обосновывает возможность использования потенциала M2-макрофагов в терапии депрессии. В настоящей работе исследовалось влияние растворимых факторов человеческих макрофагов, поляризованных в клетки с M2-фенотипом в условиях депривации сыворотки, на костномозговую гемопоэз и показатели периферической крови в модели стресс-индуцированной депрессии. Показано усиление гранулоцитарно-макрофагального (КОЕ-ГМ) направления дифференцировки ГСК и нарастание популяции моноцитов в периферической крови у депрессивно-подобных мышей. Формирование у животных депрессивно-подобного состояния сопровождалось снижением количества как эритроидных предшественников в костном мозге, так и эритроцитов/гемоглобина периферической крови.

Адрес для переписки:

Орловская Ирина Анатольевна
ФГБНУ «Научно-исследовательский институт
клинической и фундаментальной иммунологии»
630099, Россия, г. Новосибирск., ул. Ядринцевская, 14.
Тел.: 8 (913) 474-09-30.
E-mail: irorl@mail.ru

Address for correspondence:

Orlovskaya Irina A.
Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology
630099, Russian Federation, Novosibirsk,
Yadrintsevskaya str., 14.
Phone: 8 (913) 474-09-30.
E-mail: irorl@mail.ru

Образец цитирования:

И.А. Орловская, Л.Б. Топоркова, М.А. Княжева,
И.В. Савкин, Е.В. Серенко, Е.В. Гойман, Ю.А. Шевченко,
Е.В. Маркова «Влияние растворимых факторов
макрофагов M2-фенотипа на гемопоэз при
депрессивно-подобном состоянии» // Медицинская
иммунология, 2022. Т. 24, № 5. С. 1057-1064.
doi: 10.15789/1563-0625-IOS-2516
© Орловская И.А. и соавт., 2022

For citation:

I.A. Orlovskaya, L.B. Toporkova, M.A. Knyazheva,
I.V. Savkin, E.V. Serenko, E.V. Goiman, Yu.A. Shevchenko,
E.V. Markova "Influence of soluble factors from the M2
phenotype macrophages on hematopoiesis in depression-
like state", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya
Immunologiya, 2022, Vol. 24, no. 5, pp. 1057-1064.
doi: 10.15789/1563-0625-IOS-2516
DOI: 10.15789/1563-0625-IOS-2516

Интраназальное введение растворимых факторов макрофагов (M2-SFs) в течение 7 дней оказывало корректирующее воздействие на упомянутые показатели, достоверное в отношении моноцитов периферической крови. Полученные данные свидетельствуют об эффективности противовоспалительных эффектов M2-SFS в коррекции изменений гемопоэза, обусловленных социальным стрессом, у депрессивно-подобных животных.

Ключевые слова: депрессия, мыши, M2-макрофаги, гемопоэз, костный мозг, клетки периферической крови

INFLUENCE OF SOLUBLE FACTORS FROM THE M2 PHENOTYPE MACROPHAGES ON HEMATOPOIESIS IN DEPRESSION-LIKE STATE

Orlovskaya I.A., Toporkova L.B., Knyazheva M.A., Savkin I.V., Serenko E.V., Goiman E.V., Shevchenko Yu.A., Markova E.V.

Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

Abstract. Chronic psychosocial stress provokes anxious behavior and depressive disorders. The longitudinal stress-induced neuroendocrine signals may alter functioning of immune (central and peripheral) organs. Increased myelopoiesis is observed in bone marrow, being detrimental to lympho- and erythropoiesis, with increased emigration of monocytic bone marrow cells to the periphery and their acquisition of “inflammatory” phenotype. The subsequent migration of such monocytes to the brain with differentiation into the M1 type macrophages which form inflammatory signals, and their effect upon endothelial cells and microglia leads to increased production of cytokines, chemokines, and adhesion molecules, thus accelerating accumulation of bone marrow-derived monocytes migrating to the brain. The signals from bone marrow monocytes and activated microglia promote neuroinflammatory condition which leads to behavioral changes. Current data on the presence of non-resident bone marrow macrophages in the brain of depressed patients require studies of hematopoiesis in depression-like states. Pronounced plasticity is a characteristic feature of macrophages, i.e., their ability to acquire M1 or M2 phenotype depending on the microenvironment signals. M1 exhibit high pro-inflammatory activity and have neurodestructive properties, whereas M2 cells are characterized by low pro-inflammatory activity and pronounced regenerative potential, due to the production of multiple soluble mediators and cytokines, including neurotrophic and immunoregulatory factors, anti-inflammatory substances that provide neuroprotection, stimulate neurogenesis, synaptogenesis, growth and myelination of axons, thus theoretically substantiating an opportunity of using the potential of M2 macrophages in the treatment of depression. In this work, we studied the effect of soluble factors of human macrophages, polarized into cells with M2 phenotype under the conditions of serum deprivation, upon bone marrow hematopoiesis and peripheral blood cells in a model of stress-induced depression. We have shown enhanced differentiation of hematopoietic stem cells into the granulocyte-macrophage (CFU-GM) lineage, along with increased monocyte population in peripheral blood in the depressive-like murine model. Development of a depressive-like state in the animals was associated with reduced amounts of both erythroid precursors in bone marrow and erythrocytes/hemoglobin in peripheral blood. Intranasal administration of soluble M2 macrophage factors (M2-SFs) for 7 days was accompanied by a corrective effect on the above parameters, being significant for peripheral blood monocytes. The data obtained suggest effectiveness of the M2-SFS anti-inflammatory effects in correcting changes in hematopoiesis caused by social stress in depressive-like animals.

Keywords: psychosocial depression, mice, M2 macrophages, hematopoiesis, bone marrow, peripheral blood cells

Введение

Психологический хронический социальный стресс провоцирует тревожное поведение и депрессивные расстройства; при этом в последние годы существенная роль в формирова-

нии характерного для стресса поведения отводится костномозговым клеткам моноцитарного ряда, мигрирующим в мозг [13, 15]. Во многих моделях стресса микроглия (резидентные иммунные клетки) рассматривается как источник

нейровоспалительных сигналов. Следствием стресса является активация микроглии с повышением продукции в мозге провоспалительных цитокинов — ключевых регуляторов настроения и поведения [10]. Активация ЦНС индуцирует нейроэндокринные сигналы, изменяющие функционирование иммунных (центральных и периферических) органов. В костном мозге исследователи наблюдают усиленный миелопоэз, в ущерб лимфо- и эритропоэзу, с усиленной эмиграцией костномозговых клеток моноцитарного ряда на периферию и приобретением ими «воспалительного» фенотипа [8]. Доказано, что такие моноциты мигрируют в мозг и дифференцируются в макрофаги, формирующие воспалительные сигналы (M1); следствием их воздействия на эндотелиальные клетки и микроглию является повышенная продукция цитокинов, хемокинов, молекул адгезии, что ускоряет аккумуляцию мигрирующих в мозг костномозговых моноцитов. Сигналы от костномозговых моноцитов и активированной микроглии обеспечивают нейровоспалительный статус, что и ведет, в частности, к изменению поведения [11]. Смещение баланса в сторону макрофагов с M2-фенотипом обсуждается в последние годы в качестве новой терапевтической стратегии в коррекции психо-неврологических расстройств. M2-макрофаги обладают низкой провоспалительной активностью и выраженным регенераторным потенциалом за счет высокого уровня продукции целого комплекса нейротрофических, нейропротективных и ангиогенных факторов [12]. Показано, что внутривенное введение растворимых факторов M2-макрофагов значительно улучшает обучаемость и память у иммунодефицитных мышей с исходно сниженными когнитивными параметрами [3]. Охарактеризован антидепрессивный эффект интраназального введения растворимых факторов M2-макрофагов (M2-SFs): у депрессивно-подобных мышей регистрируется стимуляция двигательной и исследовательской активностей при сниженной эмоциональной реактивности, ослабление проявлений депрессивно-подобного поведения, тревожности и ангедонии; коррекция поведенческих расстройств сопровождается снижением содержания IL-1 β , IL-6, TNF α , IFN γ в патогенетически значимых структурах головного мозга [2, 6].

Целью настоящей работы была оценка влияния M2-SFs на костномозговую гемопоэз и клеточный состав периферической крови в модели стресс-индуцированной депрессии. Использование для моделирования депрессии фактора длительного социального стресса, вызванного многократным опытом поражений, позволяло индуцировать у мышей-самцов тревожно-депрессивное состоя-

ние, сходное по симптоматике, этиологии и чувствительности к антидепрессантам с аналогичной патологией у людей [1, 5].

Материалы и методы

Исследование выполнено на мышах-самцах (CBA $\times$ C57Bl/6)F1 в возрасте 3,5-4 мес., массой 25-30 г, полученных из питомника НИИ фармакологии и регенеративной медицины Томского НИМЦ РАН. Животных содержали в условиях вивария в клетках по 10 особей в каждой, не менее двух недель до начала эксперимента на стандартной диете, при свободном доступе к воде и нормальном световом режиме. Содержание экспериментальных животных соответствовало правилам, принятым Европейской конвенцией по защите животных, используемых для экспериментальных и иных научных целей (Страсбург, 1986) и одобрено комитетом по биомедицинской этике НИИФКИ.

Учитывая наличие в популяции мышей (CBA $\times$ C57BL/6)F1 особей с активным и пассивным типами поведения, представители которых характеризуются определенными структурно-функциональными характеристиками нервной и иммунной систем и различной психофизиологической реакцией на стресс [1], все мыши были предварительно протестированы в «открытом поле», и в исследование были включены только особи с пассивным типом поведения, наиболее чувствительные к стрессовым воздействиям. Депрессивно-подобное состояние было сформировано у мышей в результате повторного опыта поражений в ежедневных (20 дней) агонистических взаимодействиях с агрессивным партнером (метод парного дистантного сенсорного контакта) [4, 5]. Формирование депрессивно-подобного поведения было подтверждено поведенческим фенотипированием (тест вынужденного плавания, тест «открытое поле», приподнятый крестообразный лабиринт с использованием современного аппаратно-программного комплекса EthoVision XT (Noldus Information Technology, Нидерланды); ангедонии оценивали с помощью теста предпочтения сахарозы), как это было описано ранее [1, 7]. Далее депрессивно-подобные животные были индивидуально рассажены в клетки для исключения агонистического взаимодействия и разделены на 2 группы: первой группе депрессивно-подобных мышей интраназально вводилась M2-SFs (30 мкл в каждый носовой ход, дважды в день, в течение 7 дней); второй группе — в аналогичных условиях эксперимента вводилась среда RPMI-1640 (контроль 2). Контрольную группу составили также интактные самцы (CBA $\times$ C57Bl/6)F1 аналогичного возраста (контроль 1).

М2-макрофаги человека генерировали в течение 7 сут. из адгезивной фракции моноклеарных клеток периферической крови доноров в присутствии GM-CSF (50 нг/мл; Sigma-Aldrich) в условиях дефицита сыворотки (2% аутоплазмы) [12]. Аликвоты кондиционированной среды (M2-SFs) замораживали при -80°C до исследования.

Для оценки количества костномозговых гемопоэтических предшественников костный мозг вымывали из бедренной кости с помощью шприца кондиционной средой RPMI1640, содержащей 10% FCS. Подсчитывали количество клеток костного мозга в 1 мл с помощью гематологического анализатора PCE-90 (ERMA Inc., Japan). Для определения количества коммитированных предшественников клетки костного мозга животных в концентрации $2,0 \times 10^4/\text{мл}$ инкубировали в 24-луночных планшетах в метилцеллюлозной среде M 3434 (Stem Cell Technology, Canada), содержащей цитокины SCF, EPO, IL-3, IL-6. Гранулоцитарно-макрофагальные (КОЕ-ГМ), эритроидные (ранние БОЕ-Э, поздние КОЕ-Э) и гранулоцитарно-эритроидно-макрофагально-мегакариоцитарные

(КОЕ-ГЭММ) колонии подсчитывали под инвертированным микроскопом после 14-дневной инкубации при температуре 37°C , во влажной атмосфере, содержащей 5% CO_2 , согласно рекомендациям Stem Cell Technologies, Canada. Данные представлены как количество КОЕ/ 10^5 ККМ.

Клеточный состав периферической крови мышей оценивали с помощью гематологического анализатора PCE-90 (ERMA Inc., Япония). Относительное количество форменных элементов крови подсчитывали в мазках, окрашенных по Романовскому–Гимзе.

Статистическая обработка осуществлялась с помощью пакета лицензированных программ Statistica 8.0 с использованием критерия Манна–Уитни, различия считались достоверными при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Формирование депрессивно-подобного состояния у мышей сопровождалось оживлением миелоидной дифференцировки: количество гра-

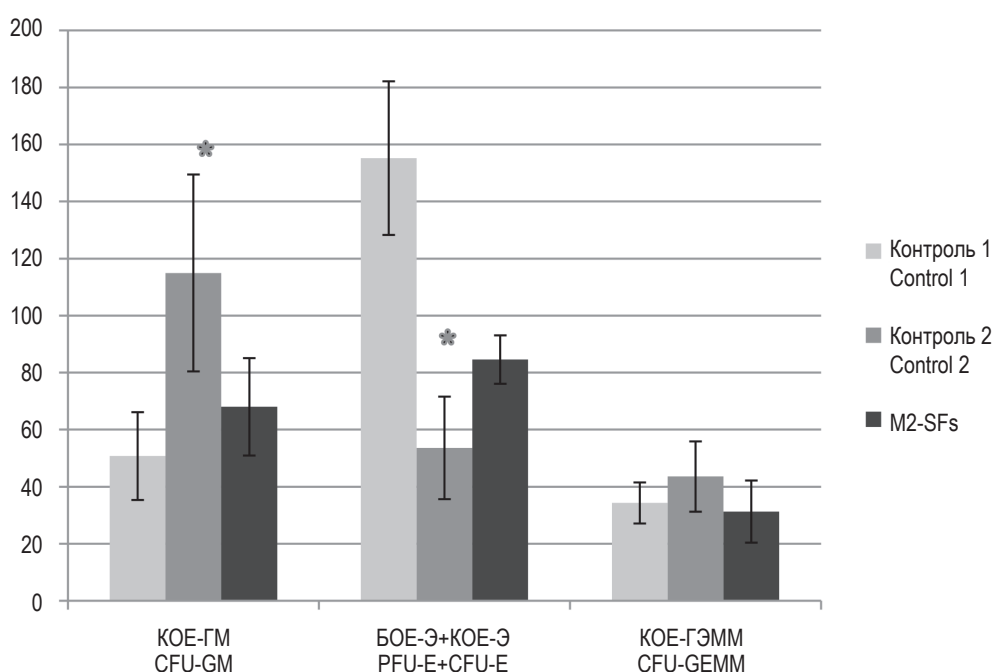


Рисунок 1. Колониеобразующая активность костномозговых гемопоэтических предшественников депрессивноподобных мышей (CBA×C57Bl/6)F1 после интраназального введения M2-Sfs

Примечание. Светло-серые столбики – Контроль 1 (интактные мыши). Темно-серые столбики – Контроль 2 (депрессивно-подобные мыши, которым в аналогичных условиях эксперимента интраназально вводили среду RPMI-1640). Черные столбики – M2-SFs (депрессивно-подобные мыши после интраназального введения M2-Sfs).

* – достоверные различия между показателями интактных и депрессивно-подобных животных ($p < 0,05$).

Figure 1. Colony-forming activity of bone marrow hematopoietic precursors in depressive-like (CBA×C57Bl/6)F1 mice after M2-SFs intranasal administration

Note. Light grey bars, Control 1 (intact mice). Dark grey bars, Control 2 (depressive-like mice, which were intranasal injected with RPMI-1640 medium under similar experimental conditions). Black bars, M2-SFs (depressive-like mice, which were intranasal treated with M2-SFs);

*, significant differences between the parameters of intact and depressive-like animals ($p < 0.05$).

нулоцитарно-макрофагальных предшественников в костном мозге значительно превышало контрольные показатели (рис. 1).

Количество моноцитов в периферической крови депрессивно-подобных мышей также достоверно превышало их уровень в контрольной группе интактных животных; аналогичным образом на стресс реагировали гранулоциты, количество которых повышалось, хотя и недостоверно. При этом среди гранулоцитов наблюдалось повышенное количество сегментоядерных нейтрофилов (табл. 1), что наблюдается при воспа-

лительных, в том числе связанных со стрессом, состояниях [9].

Усиление миелоидного направления дифференцировки при хроническом социальном стрессе показано ранее во множестве работ [9, 11]. Показано также, что усиленный миелопоэз, обусловленный социальным стрессом, может сопровождаться угнетением лимфопоэза [8]. В данном исследовании мы не обнаружили вышеобозначенных изменений у депрессивно-подобных самцов (CBA×C57Bl/6)F1 (табл. 1).

ТАБЛИЦА 1. ОТНОСИТЕЛЬНОЕ КОЛИЧЕСТВО ФОРМЕННЫХ ЭЛЕМЕНТОВ КРОВИ ДЕПРЕССИВНО-ПОДОБНЫХ МЫШЕЙ (CBA×C57Bl/6)F1 ПОСЛЕ ИНТРАНАЗАЛЬНОГО ВВЕДЕНИЯ M2-SFs

TABLE 1. RELATIVE AMOUNT OF BLOOD CELLS IN DEPRESSIVE-LIKE (CBA×C57Bl/6)F1 MICE AFTER M2-SFs INTRANASAL ADMINISTRATION

Группы мышей Mouse groups	Моноциты Monocytes	Палочкоядерные нейтрофилы Stab neutrophils	Сегментоядерные нейтрофилы Segmented neutrophils	Лимфоциты Lymphocytes
Контроль 1 Control 1	0,71±0,30	1,30±0,45	22,0±3,8	71,0±4,6
Контроль 2 Control 2	3,20±0,55*	2,0±0,4	34,20±7,79	61,00±7,01
M2-SFs	2,20±0,34**	1,83±0,34	30,2±5,3	65,2±5,8

Примечание. Контроль 1 – интактные мыши. Контроль 2 – депрессивно-подобные, мыши, которым в аналогичных условиях эксперимента интраназально вводили среду RPMI-1640. * – достоверные различия ($p < 0,05$) между соответствующими показателями в группах контроля (интактных и депрессивно-подобных животных); ** – достоверные различия между соответствующими показателями депрессивно-подобных животных (Контроль 2) и после введения M2-SFs ($p < 0,05$).

Note. Control 1, intact mice. Control 2, depressive-like mice, which were intranasally injected with RPMI-1640 medium under similar experimental conditions. *, significant differences ($p < 0.05$); between the corresponding indicators in the control groups (intact and depressive-like animals); **, significant differences between the corresponding indicators of depressive-like animals (Control 2) and after the introduction of M2-SFs ($p < 0.05$).

ТАБЛИЦА 2. ПОКАЗАТЕЛИ КОЛИЧЕСТВА ЭРИТРОЦИТОВ/ГЕМОГЛОБИНА ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ДЕПРЕССИВНО-ПОДОБНЫХ МЫШЕЙ (CBA×C57Bl/6)F1 ПОСЛЕ ИНТРАНАЗАЛЬНОГО ВВЕДЕНИЯ M2-SFs

TABLE 2. PERIPHERAL BLOOD ERYTHROCYTE/HEMOGLOBIN VALUES IN DEPRESSIVE-LIKE (CBA×C57Bl/6)F1 MICE AFTER M2-SFs INTRANASAL ADMINISTRATION

Группы мышей Mouse groups	Эритроциты Erythrocytes	Гемоглобин Hemoglobin
Контроль 1 Control 1	7,05±0,10	44,76±10,26
Контроль 2 Control 2	5,93±0,23*	104,17±3,72*
M2-SFs	6,25±0,15	107,17±2,24

Примечание. Контроль 1 – интактные мыши. Контроль 2 – депрессивно-подобные, мыши, которым в аналогичных условиях эксперимента интраназально вводили среду RPMI-1640. * – достоверные различия между показателями интактных (Контроль 1) и депрессивно-подобных (Контроль 2) животных ($p < 0,05$).

Note. Control 1, intact mice. Control 2, depressive-like mice, which were intranasally injected with RPMI-1640 medium under similar experimental conditions. *, significant differences between the parameters of intact (Control 1) and depressive-like (Control 2) animals ($p < 0.05$).

После интраназального введения M2-SFs мы наблюдали ощутимое снижение объема популяции гемопоэтических предшественников, хотя и не достигающее такового в группе интактного контроля (рис. 1). Количество моноцитов периферической крови снижалось достоверно; также мы наблюдали недостоверное снижение количества гранулоцитов (табл. 1). Полученные данные могут свидетельствовать о корректирующем эффекте M2-SFs на миелопоэз депрессивно-подобных мышей. Вероятно, коррекция нейровоспалительного статуса со снижением содержания провоспалительных цитокинов в структурах головного мозга под воздействием M2-SFs, показанная нами ранее [2, 6], обеспечивает снижение интенсивности продукции гемопоэтических предшественников в костном мозге и моноцитов крови [11].

Известно, что усиленный миелопоэз, наблюдаемый при ряде иммуноопосредованных заболеваний, способствует «удержанию» ГСК/ранних гемопоэтических предшественников в костномозговой нише, блокируя их миграцию на периферию и отменяя их участие в воспалении (в том числе противовоспалительные эффекты) [14]. Можно предполагать участие аналогичного механизма при формировании нейровоспалительных и нейродегенеративных изменений, характерных для депрессивных расстройств и показанных также на используемой модели стресс-индуцированной депрессии [5, 6, 7]. В настоящем исследовании мы наблюдали лишь недостоверное увеличение популяции ранних предшественников (КОЕ-ГЭММ) в костном мозге депрессивно-подобных мышей; интраназальное введение

M2-SFs приводило к недостоверному снижению количества КОЕ-ГЭММ (рис. 1).

Ранее показано, что усиленный миелопоэз в условиях социального стресса сопровождается угнетением эритропоэза с мобилизацией гемопоэтических предшественников в селезенку [8, 9]. Настоящая работа подтверждает эти данные: хронический стресс, индуцировавший депрессивно-подобное состояние у мышей, способствовал как достоверному снижению количества эритроидных предшественников (КОЕ-Э + БОЕ-Э) в костном мозге (рис. 1), так и эритроцитов периферической крови. Гемоглобин крови также достоверно снижался у депрессивно-подобных животных (табл. 2).

После интраназального введения M2-SFs мы наблюдали недостоверное повышение показателей, характеризующих эритроидный росток.

Заключение

Таким образом, социальный стресс существенно усиливал гранулоцитарно-макрофагальное (КОЕ-ГМ) направление дифференцировки ГСК, что сопровождалось нарастанием популяции моноцитов в периферической крови у депрессивно-подобных мышей. Формирование у животных депрессивно-подобного состояния сопровождалось также снижением количества как эритроидных предшественников в костном мозге, так и эритроцитов/гемоглобина в периферической крови. Интраназальное введение M2-SFs оказывало корректирующее воздействие на упомянутые показатели, достоверное в отношении моноцитов периферической крови.

Список литературы / References

1. Маркова Е.В. Иммунокомпетентные клетки и регуляция поведенческих реакций в норме и патологии. Красноярск: Научно-инновационный центр, 2021. 184 с. [Markova E.V. Immune cells and regulation of behavioral reactions in health and disease]. Krasnoyarsk: Scientific and Innovation Center, 2021. 184 p.
2. Маркова Е.В., Шевела Е.Я., Княжева М.А., Савкин И.В., Серенко Е.В., Ращупкин И.М., Амстиславская Т.Г., Останин А.А., Черных Е.Р. Влияние растворимых факторов макрофагов M2-фенотипа на поведенческий паттерн и продукцию цитокинов в головном мозге депрессивноподобных мышей // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины, 2021. Т. 172, № 9. С. 334-338. [Markova E.V., Shevela E.Y., Knyazeva M.A., Savkin I.V., Serenko E.V., Rashchupkin I.M., Amstislavskaya T.G., Ostanin A.A., Chernykh E.R. Effect of M2 macrophage-derived soluble factors on behavioral patterns and cytokine production in various brain structures in depression-like mice. *Byulleten eksperimentalnoy biologii i meditsiny = Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 2022, Vol. 172, no. 3, pp. 341-344. (In Russ.)]
3. Derecki N.C., Quinlins K.M., Kipnis J. Alternatively activated myeloid (M2) cells enhance cognitive function in immune compromised mice. *Brain. Behav. Immun.*, 2011, Vol. 25, no. 3, pp. 379-385.
4. Idova G.V., Markova E.V., Gevorgyan M.M., Alperina E.L., Zhanaeva S.Y., Cytokine production by splenic cells in C57Bl/6J mice with depression-like behaviour depends on the duration of social stress. *Bull. Exp. Biol. Med.*, 2018, Vol. 164, no. 5, pp. 645-649.
5. Kudryavtseva N.N., Smagin D.A., Kovalenko I.L., Vishnivetskaya G.B. Repeated positive fighting experience in male inbred mice. *Nat. Protoc.*, 2014, Vol. 9, no. 11, pp. 2705-2717.

6. Markova E., Shevela K., Knyazheva M., Savkin I., Amstislavskaya T., Ostanin A., Chernykh E.. Human type 2 macrophages biologically active soluble products in the editing of stress-induced depressive-like behavior. *Eur. Psych.*, 2021, Vol. 64, no. S 1, 764. doi: 10.1192/j.eurpsy.2021.2023.
7. Markova E.V., Knyazheva M.A. Immune cells as a potential therapeutic agent in the treatment of depression. *Medical Immunology (Russia)*, 2021, Vol. 23, no. 4, pp. 699-704. doi: 10.15789/1563-0625-ica-2277.
8. McKim D.B., Yin W., Wang Y., Cole S.W., Godbout J.P., Sheridan J.F. Social stress mobilizes hematopoietic stem cells to establish persistent splenic myelopoiesis. *Cell Rep.*, 2018, Vol. 25, no. 9, pp. 2552-2562. doi: 10.1016/j.celrep.2018.10.102
9. Orlovskaya I.A., Toporkova L.B., Lvova M.N., Sorokina I.V., Katokhin A.V., Vishnivetskaya G.B., Goiman E.V., Kashina E.V., Tolstikova T.G., Mordvinov V.A., Avgustinovich D.F. Social defeat stress exacerbates the blood abnormalities in *Opisthorchis felinus*-infected mice. *Exp. Parasitol.*, 2018, Vol. 193, pp. 33-44.
10. Quinn M.E., Stanton C.H., Slavich G.M., Joormann J. Executive control, cytokine reactivity to social stress, and depressive symptoms: testing the social signal transduction theory of depression. *Stress*, 2020, Vol. 23, no. 1, pp. 60-68.
11. Reader B.F., Jarrett B.L., McKim D.B., Wohleb E.S., Godbout J.P., Sheridan J.F. Peripheral and central effects of repeated social defeat stress: monocyte trafficking, microglial activation, and anxiety. *Neuroscience*, 2015, Vol. 289, pp. 429-442.
12. Sakhno L.V., Shevela E.Y., Tikhonova M.A., Ostanin A.A., Chernykh E.R. The phenotypic and functional features of human M2 macrophages generated under low serum conditions. *Scand. J. Immunol.*, 2016, Vol. 83, no. 2, pp. 151-159.
13. Torres-Platas S.G., Cruceanu C., Chen G.G., Turecki G., Mechawar N. Evidence for increased microglial priming and macrophage recruitment in the dorsal anterior cingulate white matter of depressed suicides. *Brain Behav. Immun.*, 2014, Vol. 42, pp. 50-59.
14. Winkler I.G., Sims N.A., Pettit A.R., Barbier V., Nowlan B., Helwani F., Poulton I.J., van Rooijen N., Alexander K.A., Raggatt L.J., Lévesque J.P. Bone marrow macrophages maintain hematopoietic stem cell (HSC) niches and their depletion mobilizes HSCs. *Blood*, 2010, Vol. 116, no. 23, pp. 4815-4828.
15. Wohleb E.S., McKim D.B., Sheridan J.F., Godbout J.P. Monocyte trafficking to the brain with stress and inflammation: a novel axis of immune-to-brain communication that influences mood and behavior. *Front. Neurosci.*, 2015, Vol. 8, 447. doi: 10.3389/fnins.2014.00447.

Авторы:

Орловская И.А. — д.м.н., главный научный сотрудник лаборатории молекулярной иммунологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

Топоркова Л.Б. — к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории молекулярной иммунологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

Князева М.А. — младший научный сотрудник лаборатории нейробиологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт клинической и фундаментальной иммунологии», Новосибирск, Российская Федерация

Authors:

Orlovskaya I.A., PhD, MD (Medicine), Chief Research Associate, Laboratory of Molecular Immunology, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

Toporkova L.B., PhD (Biology), Senior Research Associate, Laboratory of Molecular Immunology, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

Knyazheva M.A., Junior Research Associate, Laboratory of Neuroimmunology, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

Савкин И.В. — научный сотрудник лаборатории нейроиммунологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

Серенко Е.В. — аспирант лаборатории нейроиммунологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

Гойман Е.В. — к.б.н., научный сотрудник лаборатории экспериментальной иммунотерапии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

Шевченко Ю.А. — к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории молекулярной иммунологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

Маркова Е.В. — д.м.н., главный научный сотрудник и руководитель лаборатории нейроиммунологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

Savkin I.V., Research Associate, Laboratory of Neuroimmunology, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

Serenko E.V., Postgraduate Student, Laboratory of Neuroimmunology, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

Goiman E.V., PhD (Biology), Research Associate, Laboratory of Experimental Immunotherapy, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

Shevchenko Yu. A., PhD (Biology), Senior Research Associate, Laboratory of Molecular Immunology, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

Markova E.V., PhD, MD (Medicine), Chief Research Associate, Head, Laboratory of Neuroimmunology, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

Поступила 12.05.2022
Принята к печати 22.05.2022

Received 12.05.2022
Accepted 22.05.2022

ОСНОВА ПРОТИВОВИРУСНОЙ ЗАЩИТЫ ЧЕЛОВЕКА – РНК-ИНТЕРФЕРЕНЦИЯ

Муратходжаев Д.Н., Арипова Т.У.

Институт иммунологии и геномики человека Академии наук Республики Узбекистан, г. Ташкент,
Республика Узбекистан

Резюме. Сравнительный анализ механизмов противовирусной защиты простейших и РНК-интерференции многоклеточных организмов выявил не только их сходство, но и дал ключ к пониманию адаптивного иммунитета. Представлены последние данные, подтверждающие роль РНК-управляемой регуляции генов в противовирусной защите человека. Рассмотрена работа интерфероновой системы и роль нейтрализующих антител при вирусной инвазии. Обоснована новая концепция — основой противовирусной защиты всех организмов является внутриклеточные РНК-управляемые механизмы подавления вирусного размножения. Простая и эффективная защита от вирусов состоит в том, что часть ДНК вируса (спейсер) встраивается в геном клетки, и при повторном заражении, РНК-транскрипт этого спейсера направляет ферменты нуклеазы на чужеродный геном. Это настоящая адаптивная противовирусная защита, которой потенциально обладает каждая клетка. Главная цель эволюционно более молодых специализированных иммунных клеток это поддержание целостности и борьба с чужеродными организмами. Основной ролью интерфероновой системы является раннее предупреждение организма о внедрении вируса, с последующим переводом клеток в режим тревоги.

Соответственно, настоящим обретенным противовирусным иммунитетом будут не наличие В- и Т-клеток памяти, не нейтрализующие антитела, а наличие специфических спейсеров в ДНК переболевших людей. Данная статья, описывающая работу этих защитных механизмов, предназначена в первую очередь для широкой медицинской общественности, и практические выводы для врачей следующие:

1. Наличие или отсутствие специфичных антител к SARS-CoV-2 АТ не является прогностическим признаком болезни. Наличие в крови антител лишь отражает факт контакта этого человека с вирусом. Отсутствие антител не говорит об отсутствии контакта, а люди, имеющие высокий титр специфичных антител не защищены от повторной инфекции SARS-CoV-2.
2. ПЦР-тесты. У переболевших COVID-19 тесты могут оставаться «ложно положительными» при условии забора генного материала из мест проникновения вируса. На наш взгляд, правильным показателем отсутствия болезни будут отрицательные тесты ПЦР на COVID-19 плазмы крови и мочи, даже при положительном результате при заборе из носоглотки.
3. Необходимо привлечь внимание врачей к возможному использованию витамина А в профилактике и лечении COVID-19, учитывая важность RLR рецепторов в распознавании вирусных РНК и положительный опыт применения витамина А при другом опасном вирусном заболевании — кори.

Ключевые слова: РНК-интерференция, противовирусный иммунитет, COVID-19, интерфероны, антителозависимое усиление инфекции

Адрес для переписки:

Муратходжаев Джавдат Нариманович
Институт иммунологии и геномики человека
Академии наук Республики Узбекистан
100060, Узбекистан, г. Ташкент, ул. Яхье Гулямова, 74.
Тел.: +998-93 180-12-87.
E-mail: javdat_m@yahoo.com

Address for correspondence:

Muratkhodjaev Javdat N.
Institute of Immunology and Human Genomics, Academy
of Sciences of the Republic of Uzbekistan
100060, Uzbekistan, Tashkent, Yahye Gulyamov str., 74.
Phone: +998-93 180-12-87.
E-mail: javdat_m@yahoo.com

Образец цитирования:

Д.Н. Муратходжаев, Т.У. Арипова «Основа противовирусной защиты человека — РНК-интерференция» // Медицинская иммунология, 2022. Т. 24, № 5. С. 1065-1074.
doi: 10.15789/1563-0625-RII-2331
© Муратходжаев Д.Н., Арипова Т.У., 2022

For citation:

J.N. Muratkhodjaev, T.U. Aripova "RNA interference is the basis of human antiviral defense", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2022, Vol. 24, no. 5, pp. 1065-1074.
doi: 10.15789/1563-0625-RII-2331
DOI: 10.15789/1563-0625-RII-2331

RNA INTERFERENCE IS THE BASIS OF HUMAN ANTIVIRAL DEFENSE

Muratkhodjaev J.N., Aripova T.U.

Institute of Immunology and Human Genomics, Academy of Sciences of the Republic of Uzbekistan, Tashkent, Republic of Uzbekistan

Abstract. Comparative analysis of antiviral protective mechanisms in protozoa and RNA interference of multicellular organisms has revealed their similarity, also providing a clue to understanding the adaptive immunity. In this article, we present the latest evidence on the importance of RNA-guided gene regulation in human antiviral defense. The role of neutralizing antibodies and interferon system in viral invasion is considered. The new concept has been introduced, i.e., antiviral protection of any living organism is based on the intracellular RNA-guided mechanisms. Simple and effective defense against viruses is that spacer segment of the viral DNA is inserted into the cellular chromosomes. Upon re-infection, the RNA transcript of the spacer directs nuclease enzymes against the foreign genome. This is a really adaptive immune defense that any cell potentially possesses. In humans, the interferon system provides an additional tool for early suppression of viral infections which shifts the cells to the alert regimen, thus preventing further spread of infection. The main task of the human central immune system is to maintain integrity and combat foreign organisms. Accordingly, a suitable index of acquired antiviral immunity should be a presence of specific spacer markers in DNA samples from reconvalescent persons, rather than detection of neutralizing antibodies, B and T memory cells.

This article is addressed primarily to general medical community, and its practical conclusions are as follows:

1. Presence or absence of specific antibodies to SARS-CoV-2 is not a prognostic sign of the disease. Detection of specific antibodies in blood simply reflects the fact that the person has contacted with the viral agent. Absence of antibodies does not mean a lack of such contact, and the persons with high titers of specific antibodies are not protected from re-infection with SARS-CoV-2.

2. PCR testing: The PCR results may remain “false positive” in those subjects who have had COVID-19, if the genetic material is taken from the site of initial virus contraction (mainly, nasopharynx). In our opinion, negative PCR tests for COVID-19 in blood plasma and urine will be a more correct index for the absence of the disease, even with positive PCR tests from the nasopharyngeal samples.

3. It is necessary to draw attention of general practitioners to potential usage of retinol in prevention and treatment of COVID-19, given the importance of RLR receptors in recognition of viral RNAs and positive experience of vitamin A administration in measles, another dangerous viral disease.

Keywords: RNA-I, antiviral immunity, Interferon, COVID-19, SARS-CoV-2 spacers, antibody-dependant enhancement

Введение

Текущая пандемия COVID-19 стала настоящим испытанием для всех врачей и проверкой истинности наших знаний о работе иммунной системы. Повсеместный рост числа инфицированных людей, определяемый по показателям ПЦР и титров антител, заставляют не только вводить повторные карантинные меры, но и пересмотреть некоторые догмы иммунологии. Одна из таких догм состоит в том, что память о перенесенной инфекции формируется только Т- и В-клетками памяти. Множество работ, доказывающих наличие памяти у врожденного неспецифического иммунитета уже должны изменить наш взгляд (прекрасные обзоры по этой теме (Netea Mihai G. и соавт., 2011, Reimer-Michalski E.M., Conrath U., 2016) [30, 32]. С другой стороны масса научных данных, связанных с

РНК- управляемой регуляцией генов, позволяет по-новому оценить функционирование иммунной системы при вирусных инфекциях. Отталкиваясь от этих результатов, мы задались целью описать роль РНК-интерференции в противовирусной защите человека.

1. РНК-управляемая противовирусная защита

Для понимания механизма работы РНК-управляемой защиты, необходимо начать с одноклеточных, поскольку без выработки ими надежных механизмов борьбы с вирусами переход к многоклеточности был бы невозможен. Отметим, что для такого перехода понадобилось два миллиарда лет эволюции, в результате которой бактерии и археи смогли создать внутриклеточную защитную систему, которая хранит память о прошлых встречах с вирусами. Эта информация хранится в особых участках ДНК, которые появляются после встречи с чужеродным геномом ви-

руса или плазмиды и образуют массивы CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats — короткие палиндромные повторы, регулярно расположенные группами). Вирус, проникший в клетку бактерии, обнаруживается белками Cas (CRISPR-associated), разновидностью нуклеаз, которые выполняют функцию ножниц и разрезают вирусные нуклеиновые последовательности. CRISPR-Cas — это настоящая адаптивная иммунная система с памятью о прошлых встречах с чужеродными вирусами, которая хранится в уникальных спейсерных последовательностях, полученных из вирусных и плазмидных геномов и вставленных в массивы CRISPR [2]. Транскрипты спейсеров вместе с частями окружающих повторов используются в качестве направляющих РНК для распознавания родственных последовательностей в чужеродных геномах и, таким образом, указывая нуклеазам Cas специфичные сайты расщепления [21].

Упрощая, можно сказать, что простая и эффективная защита от вирусов состоит в том, что часть ДНК вируса (спейсер) встраивается в геном клетки, и, при повторном заражении, копия этого спейсера в виде малой РНК направляет ферменты нуклеазы на уничтожение чужеродного генома (рис. 1).

В многоклеточных организмах имеется сходный механизм регуляции активности различных генов, называемый РНК-интерференцией. Мы полагаем, что он остается важнейшим компонентом адаптивной иммунной системы многоклеточных, в том числе человека. Впервые эта система была открыта в 1998 году у *Caenorhabditis elegans* Файером и соавт. [10], которые впоследствии были удостоены Нобелевской премии 2006 года по физиологии и медицине.

Механизм интерференции уже подробно изучен, ей широко пользуются в экспериментальной биологии для нокдауна определенных генов, и уже используют в клинике для лечения определенных онкологических заболеваний [1, 9, 14].

Сама интерференция заключается в остановке трансляции вирусных генов, путем их разрезания или модификации. Для этого в клетках имеется специальный комплекс ферментов-нуклеаз, который направляется малыми РНК, теми же транскриптами спейсеров. Конечным этапом «вакцинации» клетки-мишени после вирусной инвазии является встраивание спейсера в ДНК самой клетки. При повторном попадании этого вируса в клетку, синтезируемые при этом малые РНК загружаются в комплекс нуклеаз и направляют их на разрезание чужеродного генома (подробности — на рис. 1).

Таким образом, имеется полная аналогия между этими двумя системами РНК — управляемого

противовирусного иммунитета клеток. На современном этапе научных знаний, только вопрос деталей встраивания частей вирусного материала в ДНК клеток остается еще до конца не выясненным. Само существование таких механизмов уже описано в исследовании ретротранспозонов и псевдогенов [13, 39], где внутриклеточная обратная транскриптаза преобразует цитоплазматическую РНК и транскрипты ретроэлементов в комплементарные части ДНК. Человеческая теломераза, являющаяся по сути своей обратной транскриптазой, активно использует белки, участвующие в РНК-интерференции для синтеза теломера с последующей интеграцией их в ДНК хромосом. Надо отметить, что ретроэлементы составляют половину человеческой ДНК [23, 40], и закономерно предположить, что значительная часть генома человека является закодированными фрагментами ДНК ранее встречавшихся вирусных геномов — теми самыми спейсерами.

Уже доказана роль РНК интерференции при многих инфекциях, вызываемых респираторно-синцитиальным вирусом человека [4], вирусом иммунодефицита человека типа 1 [6], вирусом гепатита В [29] вирусом гепатита С [22, 43], вирусом гриппа [12] и коронавирусом SARS-CoV-1 [16]. Наличие таких спейсеров эффективно препятствует вирусной инфекции у млекопитающих. Было показано, что именно спейсеры в ДНК клеток-мишеней ингибируют размножение борнавирусов [11, 18].

Перечисленные выше данные, прямо указывают на способность самих клеток противостоять вирусной инвазии. Каждая клетка человеческого организма потенциально сохранила древнюю систему противодействия вирусам, основанную на использовании малых РНК. Причем, защита является адаптивной, т. е. подстраивается под конкретный вирус, и формирует полноценную внутриклеточную иммунную память!

2. Система раннего оповещения — интерфероновая противовирусная защита

Еще одним важным механизмом клеточной защиты является интерфероновая система, основанная на производстве специальных белков, препятствующих распространению вирусной инфекции [25, 41]. Мы полагаем, что эта дополнительная система понадобилась высокоорганизованным организмам для быстрого реагирования на вирусное вторжение. Само увеличение количества плотно сгруппированных однотипных клеток облегчает распространение вирусов — размножившись в одной чувствительной клетке, вирионы легко могут инфицировать и близлежащие. Соответственно, врожденная РНК-управляемая защита может и не справиться с высокой вирусной нагрузкой. Для предотвра-

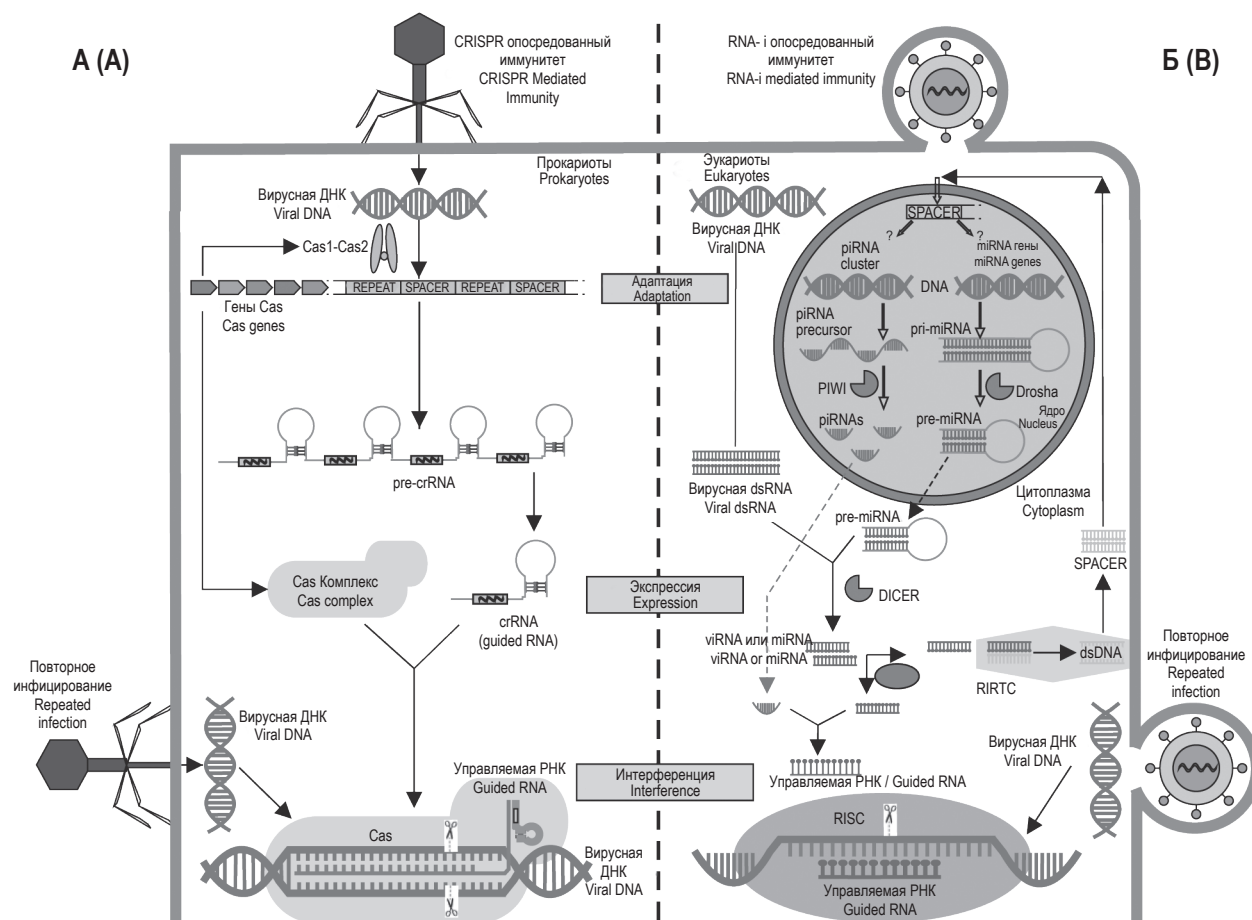


Рисунок 1. Ключевые этапы – адаптация, экспрессия и интерференция – противовирусных систем защиты простейших и человека

Примечание. А) Слева показана CRISPR-Cas иммунная система бактерий и архей. В процессе адаптации фаговая ДНК разрезается ферментами Cas1-Cas2 на спейсеры и интегрируется в специальный CRISPR-локус. Происходит формирование специфической адаптивной памяти о прошедшей инфекции. При повторном заражении РНК транскрипты этих спейсеров направляются в комплексы, образованные другими Cas-нуклеазами (здесь показан CRISPR-Cas9 комплекс), где служат матрицей для ферментов, по которой разрезают сходные нуклеотидные последовательности вирусного генома. Б) Этапы РНК-интерференции в клетках человека. При заражении клеток РНК- или ДНК-вирусами (полимеразы ДНК вирусов генерируют РНК последовательности) в цитоплазме образуются длинные двухцепочечные РНК, которые разрезаются нуклеазами DICER на короткие двухцепочечные viRNAs. После этого фермент AGO2 раскручивает цепочки viRNA и загружает их, соответственно, или в РНК-индуцируемый сайленсинговый комплекс (RISC), или в РНК-индуцируемый реверс транскрипционный комплекс (RIRC). В комплексе RISC осуществляется разрезание вирусных РНК, а в RIRC осуществляется синтез спейсера – двухцепочечной ДНК с РНК шаблона. Мы предполагаем, что здесь задействован комплекс обратной транскрипции, схожий с теломеразным TERT, в котором белок AGO2 направляет РНК-последовательность на формирование новых ДНК-теломер [37]. Спейсер интегрируется в ДНК-клетки, образуя специфическую память о прошедшей инфекции. (Остается неясным, где в хромосомах человека формируются спейсерные последовательности – в piRNA-кластерах или среди генов, отвечающих за образование miRNAs).

При повторном попадании вирусов в эту клетку, происходит транскрипция спейсера в pri-miRNA, которая под действием фермента DROSHA, укорачивается до pre-miRNA и уже в цитоплазме после разрезания DICER, загружается с помощью AGO2 в RISC и служит матрицей для разрезания вирусных РНК. РНК-и – РНК-интерференция; piRNA (Piwi-interacting RNA) кластер и miRNA (microRNA) гены – участки ДНК, кодирующие эти малые РНК; dsRNA – двухцепочечная РНК; dsDNA – двухцепочечная ДНК; viRNA – малые вирусные РНК; PIWI, DROSHA, DICER, AGO-2 – РНК-связывающие ферменты; RISC (RNA induced silencing complex) – РНК-направляемый комплекс выключения гена; RIRC (RNA induced reverse transcription complex) – РНК-направляемый комплекс обратной транскрипции; crRNA (guided RNA) – геновая РНК, распознающая и направляющая нуклеазы.

Figure 1. Key stages – adaptation, expression and interference of antiviral defense systems of protozoa and humans

Note. A) The left shows the immune system of bacteria and archaea CRISPR-Cas. During adaptation, phage DNA is cleaved by Cas1-Cas2 enzymes into spacers and integrated into a special CRISPR locus. There is a formation of a specific adaptive memory of the previous infection. Upon re-infection, RNA transcripts from these spacers are directed into complexes formed by other Cas nucleases (the CRISPR-Cas9 complex is shown here), where they serve as a template for enzymes that are used to cut similar nucleotide sequences in the viral genome.

B) Stages of RNA interference in human cells. When cells are infected with RNA or DNA viruses (DNA polymerases of viruses generate RNA sequences), long double-stranded RNAs are formed in the cytoplasm, which are cut by DICER nucleases into short double-stranded viRNAs. Thereafter, the AGO2 enzyme unwinds the viRNA strands and loads them, respectively, either into an RNA-induced silencing complex (RISC) or into an RNA-induced reverse transcriptional complex (RIRC). In the RISC complex, the viral RNAs are cleaved, and in the RIRC a spacer is synthesized – double-stranded DNA from the RNA template. We assume that this involves a reverse transcription complex similar to telomerase TERT, in which the AGO2 protein directs the RNA sequence to form new DNA telomeres [37]. The spacer integrates into the DNA of the cell, forming a specific memory of a past infection. (It remains unclear where exactly in human chromosomes spacer sequences are formed in piRNA clusters or at miRNA loci). When viruses enter this cell again, the spacer is transcribed into pri-miRNA, which, under the action of the DROSHA is shortened to pre-miRNA and already in the cytoplasm after DICER cutting, loaded by AGO2 into RISC and serves as a template for cleaving viral RNAs.

RNA-i – RNA interference; piRNA – Piwi-interacting RNA; miRNA – microRNA; dsRNA – double stranded RNA; dsDNA – double stranded DNA; viRNA – viral short RNA; PIWI, DROSHA, DICER, AGO-2 – RNA binding proteins; RISC (RNA induced silencing complex); RIRC – RNA induced reverse transcription complex; crRNA – crisp RNA.

ния такой возможности и была создана система раннего оповещения, использующая интерфероны как сигналы тревоги.

Все ядерные клетки имеют рецепторы к интерферону I. После связывания рецептора с интерфероном, происходит активация множества генов и клетка переходит в режим тревоги, при котором практически останавливается синтез белка, тормозится эндо- и экзоцитоз, что естественно препятствует как входу так и выходу вирусных частиц. Сам же интерферон вырабатывается клетками, в которые уже попали вирусы. Каждая клетка человека обладает большим арсеналом специальных рецепторов, распознающие определенные патогенные мотивы. В случае вирусной инвазии, имеются специальные цитоплазматические RLR рецепторы, распознающие вирусные двухцепочечные РНК. Их активация запускает целый каскад внутриклеточных механизмов, заканчивающихся синтезом интерферонов и провоспалительных цитокинов (рис. 2).

Сами интерфероны в свою очередь регулируют работу более 2000 ISG генов (Interferon Stimulated Gene), имеется отдельная база данных этих генов — «Интерфером» (<http://www.interferome.org/interferome/home.aspx>), освещающая их влияние на метаболизм клеток. В рамках нашего обзора хотелось бы только отметить несколько моментов. Во-первых, эпителиальные клетки, первыми встречающие различные патогены, дополнительно имеют и рецепторы к интерферону III, что подчеркивает необходимость быстрой и слаженной работы при вирусных инвазиях этих пограничных клеток организма. Во-вторых, при длительном контакте с интерфероном, клетка запускает процесс апоптоза, т.е. самоуничтожения. И третье — ряд ферментов, вырабатываемых под действием интерферона, блокируют нуклеазы, необходимые для полноценной работы РНК управляемой системы [37]. То есть добавочная страховочная интерфероновая система может не только мешать работе РНК управляемой защите но, и более того вызывать гибель клеток. Этот определенного рода антагонизм в работе интерфероновой и РНК управляемой систем противовирусной защиты рассматривается во многих научных статьях, обзор которых рассмотрен здесь [27]. Наше же видение следующее. Первая линия клеток, которые сталкиваются с проникновением вируса, представляет собой хорошо дифференцированные поверхностные эпителиальные или эндотелиальные клетки. При проникновении вируса внутрь этих клеток нуклеазы DICER сразу же начинают разрезать вирусный геном, TLR и RLR рецепторы в свою очередь запускают каскад синтеза интерферона. Эта первая неспецифичная фаза противодействия

вирусной инвазии. На этом этапе, все зависит от уровня вирусной нагрузки, если он небольшой, то инфицированные клетки справляются сами и, предупредив соседние интактные клетки об инфекции, помогают последним уменьшить восприимчивость к вирусам. Инфекция прерывается без выраженной клинической картины. При большей нагрузке, инфицированные клетки уходят в апоптоз, а соседние под действием возрастающих доз интерферона останавливают синтез белка, экзо- и эндоцитоз, останавливается работа практически всех ферментов, клетки как бы замирают. Под действием интерферонов и других цитокинов активируется центральная иммунная система, появляются первые антитела и симптомы воспаления. Инфицированные клетки, несущие на своей поверхности вирусные антигены, привлекают Т-киллеров, происходит опсонизация этих клеток антителами, активируется система комплимента. Происходит манифестация всех признаков инфекции. Отметим, пока на плазматической мембране клеток будут находиться вирусные белки иммунная система находится в активированном состоянии. И более того, все эти клетки подлежат уничтожению.

В то же самое время в базальных слоях этих тканей, где находятся активно пролиферирующие и унипотентные клетки, при попадании самих вирусов и/или спейсеров от зараженных выше клеток, начинает формироваться адаптивная внутриклеточная противовирусная защита. Ранее было показано, что низкодифференцированные клетки, под действием интерферона не останавливают РНК и белковый синтез [8]. Соответственно, здесь остается место для полноценной работы РНК интерференции, не нарушаемой блокирующими сигналами интерферона. Соответственно, иммунная память формируется в унипотентных клетках-предшественниках, когда в них проникает вирус или спейсерные РНК через внеклеточные везикулы (более подробно о роли везикул в разделе дискуссия) [17]. После созревания эти клетки уже будут обладать специфической антивирусной памятью, что дает им мощный инструмент для эффективного устранения новых инвазий вирусов.

Вновь образованный слой клеток, легко справляется с остаточной вирусной нагрузкой и уже не несет антигенов вируса, центральная иммунная система не получая стимуляции, возвращается в обычный режим. Такая смена эндотелиальных и эпителиальных клеток обычно занимает несколько дней, что и составляет время, необходимое для формирования специфической локальной противовирусной памяти.

Таким образом, мы полагаем, что истинной противовирусной защитой потенциально обла-

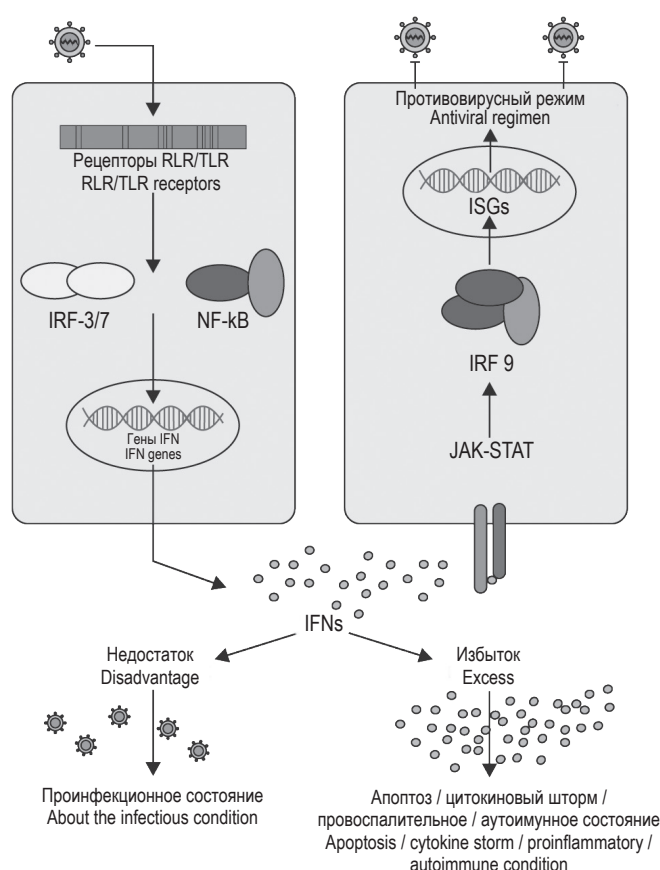


Рисунок 2. Интерфероновая система оповещения (адаптировано по [31])

Примечание. Активация внутриклеточных рецепторов RIG-1 и MDA5 вирусными dsRNA, а также TLR 7/8 ssRNA приводит к фосфорилированию интерферон регуляторных факторов 3/7 (IRF3/7) и провоспалительных факторов NF-κB. Эти транскрипционные факторы вызывают экспрессию интерфероновых генов и провоспалительных цитокинов после перемещения внутрь ядра.

Вновь синтезированные интерфероны связываются с своими рецепторами на соседних клетках и индуцирует экспрессию IFN-стимулированных генов (ISGs) через сигнальные трансдукторы и активаторы транскрипции (STAT), активируемой Янусом (Jak). Под действием продуктов этих генов – рестрикционных факторов, клетка переходит в режим тревоги, приостанавливая синтез белка, в том числе вирусных, и помечая все вновь синтезированные белки для последующей их деградации при дополнительном подтверждении. Замедляется везикулярный транспорт, что приводит к препятствованию сборки и выходу из клетки вирионов.

Избыток выработки интерферонов вызывает апоптоз клеток и генерализованный цитокиновый шторм. Возникает риск аутоиммунных заболеваний. Недостаток выработки интерферонов не подготавливает клетки к вирусной инвазии, соответственно ухудшает течение инфекционного заболевания.

IFNs – интерфероны; RIG-1 (retinoic acid inducible gene-1), MDA5 (Melanoma Differentiation Associated protein-5) входят в группу RLR (RIG-I-like receptors) рецепторов; TLR 7/8 – (Toll-like receptors) – эндосомальные рецепторы одноцепочечной РНК; IRF (interferon regulatory factor); NF-κB (nuclear factor kappa B) – транскрипционные факторы; JAK-STAT, Janus Kinases – преобразователь сигналов и активатор транскрипционных белков; ISGs – гены, стимулируемые интерфероном.

Figure 2. Interferon alarm system (adopt from Onomoto et al. [31])

Note. Activation of cytoplasm receptors RIG-1 and MDA5 by viral dsRNAs, as well as endosomal receptors TLR 7/8 by ssRNAs, lead to phosphorylation of interferon regulatory factors 3/7 (IRF3/7) and pro-inflammatory factors NF-κB. These transcription factors induce the expression of interferon genes and inflammatory cytokines upon the nuclear translocation. Newly synthesized interferons bind to their receptors on neighboring cells and induce the expression of IFN-stimulated genes (ISGs) through signal transducers and transcriptional activators (STAT) activated by Janus (Jak). Under the influence of the products of these genes - restriction factors - the cell goes into alarm mode, stops the proteins synthesis, including viral ones, and marks all newly synthesized proteins for their subsequent degradation with additional confirmation. Vesicular transport slows down, which leads to inhibition of virion assembly and release. Excessive production of IFN induces cell apoptosis and is associated with the development of a cytokine storm.

In this condition, there is a risk of autoimmune diseases. The lack of interferon production does not prepare cells for viral invasion and, as a result, exacerbates an infectious disease.

IFNs – Interferons; IFN genes – Interferon Genes; RIG-1 – Retinoic acid inducible gene-1; MDA5 – Melanoma Differentiation Associated protein-5; TLR 7/8 – Toll-like receptors; IRF – interferon regulatory factor; NF-κB – nuclear factor kappa B; JAK (Janus Kinases) – STAT (Signal Transducer and Activator of Transcription proteins); ISGs – Interferon Stimulated Genes.

дает каждая клетка организма. И именно работа РНК интерференции определяет течение вирусного заболевания.

Обсуждение

Система CRISPR-Cas оказалась настолько эффективной в борьбе с мобильными генетическими элементами, что сохранила свою роль и у многоклеточных организмов слегка изменившись, с учетом наличия ядерной мембраны и концевых хромосом. Основной целью, вновь созданной высшими животными центральной иммунной системы, основанной на Т- и В-клетках, является поддержание целостности и борьба с чужеродными организмами. Для выполнения этой цели иммунная система обладает фагоцитирующими, регуляторными, антигенпредставляющими и киллерными клетками, а также системой комплемента и, конечно, разнообразными антителами. Система комплемента представляет собой группу белков, при активации которых, образуются мембранолитические каскады, разрушающие клетки-мишени. Классическим путем активации комплемента является присоединение к Fc-фрагменту антител (это неизменная часть всех антител организма). Хотелось бы подчеркнуть, антитела не являются защитным средством, даже в высоких концентрациях, они выполняют лишь диагностическую и направляющую роль. В многотриллионном человеческом организме антитела помогают иммунным клеткам найти «чужих», связываясь со специфическими чужеродными антигенами (опсонизация). Именно, Fc-фрагмент антител является «черной меткой» для иммунных клеток и комплемента, которые воспринимают ее как сигнал к уничтожению этого объекта. В случае с бактериями, простейшими, грибами и гельминтами это рабочая стратегия, помеченные антителами они уничтожаются. Это срабатывает и для борьбы с мутантными, в том числе опухолевыми клетками, где антитела связываются с раковыми антигенами и такие клетки также выбраковываются. Но, что происходит в случае вирусной инфекции. Априори, вирусы размножаются только внутри клеток, и при связывании вирусных антигенов на плазматической мембране антителами, они также уничтожаются. Для целого организма это благо — нашли чужого, пусть даже внутри своих клеток, и уничтожили, пожертвовали частным ради целого. Отметим, другой судьбы у этих зараженных клеток нет — они все уничтожаются.

Пока вирусы не проникли внутрь клеток, они представляют собой лишь набор нуклеиновых кислот и белков, не размножаются и не оказывают никакого патологического влияния на организм. При связывании вирусов антитела-

ми, они конечно теряют способность поражать клетки-мишени, затрудняя их связь с клеточными рецепторами. Именно этим обосновывается стратегия вакцинаций. Но рассмотрим дальнейший ход событий. Образовавшийся комплекс вирус-антитело должен быть уничтожен путем фагоцитоза иммунными клетками, несущими рецептор к Fc-фрагменту. Во многих случаях это так и происходит, но если фагоцитоз оказывается не эффективным, и вирус остался жизнеспособным внутри этих клеток, то инфекция лишь усиливается, так как вирус заразил клетки, не несущие к нему рецепторы, и этот феномен называется антитело-зависимым усилением инфекции (antibody-dependent enhancement — ADE) [15, 33, 36]. В ADE вирус не только заражает восприимчивые клетки через соответствующий рецептор, но и проникает внутрь моноцитов/макрофагов, гранулоцитов, тромбоцитов, тучных клеток и многих других клеток-хозяев посредством взаимодействия с рецепторами к Fc-фрагменту или комплементу [20]. Существует множество примеров ADE, вызванных альфа- и бета-коронавирусами [38, 42]. Текущие клинические данные о протекании COVID-19 явно указывают на вовлечение антител в усиление клинических проявлений болезни. У наиболее тяжелых больных отмечалось наивысшие титры антител [5]. Характерная черта COVID-19 — коагулопатия явно указывает на гиперактивность комплемента [26]. И этот процесс уничтожения собственных клеток не останавливается до тех пор, пока они несут на своей поверхности вирусные антигены. Лишь в результате работы РНК-направляемых нуклеаз, клетка очищается от вирусного генома и, соответственно, от вирусных белков. Активация центральной иммунной системы прекращается, титры антител падают, наступает выздоровление.

Описывая противовирусный иммунитет человека нельзя не остановиться на механизмах защиты в раннем младенческом возрасте. Как показали последние данные в состав грудного молока наряду с антителами входят до 1400 различных типов микроРНК [3]. Учитывая способность каждой из этих молекул изменять активность в среднем 15–20 генов, появляется огромная возможность для подавления или усиления активности генов грудных детей. Подавляющее количество этих микроРНК находятся в составе внеклеточных везикул. Было показано, что эти микроРНК после всасывания регистрируются в кровотоке и во всех тканях организма, включая головной мозг [28, 44]. Так что, говоря о противовирусном иммунитете необходимо подчеркнуть наличие такой передачи защиты через молоко ребенку.

Таким образом, классический адаптивный Т- и В-клеточный иммунитет, на показатели ко-

того в основном ориентируются при прогнозе инфекционного заболевания, именно при вирусных инвазиях не является основным компонентом борьбы. И по нашему мнению, чем меньше он вовлечен в развитие вирусной инвазии, тем легче протекает заболевание и лучше прогноз. Возвращаясь, к роли РНК-управляемого клеточного иммунитета, надо подчеркнуть, именно этот механизм дает полноценную адаптивную защиту от вирусов.

Выводы

РНК управляемое регулирование активности генов, как своих, так и чужеродных является основным механизмом борьбы с вирусами на протяжении всей эволюции живого на Земле.

Интерфероновая система, направленная на предупреждение об опасности, дополняет ее, а «классическая» иммунная система, основанная на Т- и В-клетках направлена на поддержание целостности и борьбу с чужеродными организмами. Настоящим обретенным противовирусным иммунитетом будут не наличие В- и Т-клеток памяти, не нейтрализующие антитела, а наличие специфических спейсеров в ДНК переболевших людей.

Данная статья, описывающая работу этих защитных механизмов, предназначена в первую очередь для широкой медицинской обществен-

ности, и практические выводы для врачей следующие:

1. Наличие или отсутствие специфических антител к SARS-CoV-2 АТ не является прогностическим признаком болезни. Наличие в крови антител лишь отражает факт контакта этого человека с вирусом. Отсутствие антител не говорит об отсутствии контакта. Имеющие высокий титр специфических антител люди не защищены от повторной инфекции SARS-CoV-2, а скорее всего перенесут инфекцию тяжелее из-за ADE.

2. ПЦР-тесты. У переболевших COVID-19 ПЦР тест может быть ложно положительными при условии забора материала из мест проникновения вируса. На наш взгляд, правильным показателем отсутствия болезни будут отрицательные тесты ПЦР на COVID-19 плазмы крови и мочи, даже при положительном результате при заборе из носоглотки.

3. Надо привлечь внимание врачей к возможному использованию витамина А в профилактике и лечении COVID-19, учитывая важность RLR рецепторов в распознавании вирусных РНК. Учитывая положительный опыт применения витамина А при другом опасном вирусном заболевании – кори. При этой инфекции было показано, что дефицит витамина А четко коррелировал с тяжестью течения, а своевременное лечение кори с помощью двух доз ретинола (200 000 МЕ) резко снижало заболеваемость и смертность [7, 19, 34].

Список литературы / References

1. Abdelrahim M., Safe S., Baker C., Abudayyeh A. RNAi and cancer: Implications and applications. *J RNAi Gene Silencing*, 2006, Vol. 2, no. 1, pp.136-145.
2. Barrangou R. The Roles of CRISPR-Cas Systems in Adaptive Immunity and Beyond. *Curr. Opin. Immunol.*, 2015, Vol. 32, pp. 36-41.
3. Benmoussa A., Provost P. Milk MicroRNAs in Health and Disease. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.*, 2019, Vol. 18, no. 3, pp. 703-722.
4. Bitko V., Barik S. Phenotypic silencing of cytoplasmic genes using sequence-specific double-stranded short interfering RNA and its application in the reverse genetics of wild type negative-strand RNA viruses. *BMC Microbiol.*, 2001, Vol. 1, 34. doi: 10.1186/1471-2180-1-34.
5. Chen X., Pan Z., Yue S., Yu F., Zhang J., Yang Y., Li R., Liu B., Yang X., Gao L., Li Z., Lin Y., Huang Q., Xu L., Tang J., Hu L., Zhao J., Liu P., Zhang G., Chen Y., Deng K., Ye L. Disease severity dictates SARS-CoV-2-specific neutralizing antibody responses in COVID-19. *Signal Transduct Target Ther.* 2020, Vol. 5, no. 1, 180. doi: 10.1038/s41392-020-00301-9.
6. Coburn G.A., Cullen B.R. Potent and specific inhibition of human immunodeficiency virus type 1 replication by RNA Interference. *J. Virol.*, 2002, Vol. 76, no. 18, pp. 9225-9231.
7. D'Souza R.M., D'Souza R. Vitamin A for the treatment of children with measles—a systematic review. *J. Trop. Pediatr.*, 2002, 48, pp. 323-327.
8. Eggenberger J., Blanco-Melo D., Panis M., Brennand K.J., ten Oever B.R. Type I interferon response impairs differentiation potential of pluripotent stem cells. *PNAS*, 2019, Vol. 116, no. 4, pp. 1384-1393.
9. Elbashir S.M., Harborth J., Lendeckel W., Yalcin A., Weber K., Tuschl T. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature*, 2001, Vol. 411, no. 6836, pp. 494-498.
10. Fire A., Xu S., Montgomery M., Kostas S., Driver S., Mello C. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 1998, Vol. 391, 6669, pp. 806-811.

11. Fujino K., Masayuki H., Tomoyuki H., Merriman D.K., Keizo T. Inhibition of Borna disease virus replication by an endogenous bornavirus-like element in the ground squirrel genome. *PNAS*, 2014, Vol. 111, no. 36, pp. 13175-1318. doi: 10.1073/pnas.1407046111.
12. Ge Q., McManus M.T., Nguyen T., Shen C.-H., Sharp P.A., Eisen H.N., Chen J. RNA interference of influenza virus production by directly targeting mRNA for degradation and indirectly inhibiting all viral RNA transcription. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 2003, Vol. 100, no. 5, pp. 2718-2723.
13. Habibi, L., Salmani, H. Pivotal impacts of retrotransposon based invasive RNAs on evolution. *Front. Microbiol.*, 2017, Vol. 8, 1957. doi:10.3389/fmicb.2017.01957.
14. Han H. RNA Interference to knock down gene expression. *Methods Mol. Biol.* 2018, 1706, pp. 293-302.
15. Hawkes RA. Enhancement of the infectivity of arboviruses by specific antisera produced in domestic fowls. *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.* 1964, Vol. 42, pp. 465-482.
16. He M.L., Zheng B., Peng Y., Peiris J.S., Poon L.L., Yuen K.Y., Lin M.C., Kung H.F., Guan Y. Inhibition of SARS-associated coronavirus infection and replication by RNA interference. *JAMA*, 2003, Vol. 290, no. 20, pp. 2665-2666.
17. Holtzman J., Lee H. Emerging role of extracellular vesicles in the respiratory system. *Exp. Mol. Med.*, 2020, Vol. 52, no. 6, pp. 887-895.
18. Honda T., Keizo T. Endogenous Non-Retroviral RNA Virus Elements Evidence a Novel Type of Antiviral Immunity. *Comment Mob. Genet. Elements*, 2016, Vol. 6, no. 3, e1165785. doi:10.1080/2159256X.2016.1165785.
19. Huiming Y., Chaomin W., Meng M. Vitamin A for treating measles in children. *Cochrane Database Syst. Rev.*, 2005, Vol. 4, CD001479. doi: 10.1002/14651858.CD001479.pub3.
20. Khandia R., Munjal A., Dhama K., Karthik K., Tiwari R., Malik Y.S., Singh R.K., Chaicumpa W. Modulation of Dengue/Zika virus pathogenicity by antibody-dependent enhancement and strategies to protect against enhancement in Zika virus infection. *Front. Immunol.*, 2018, Vol. 9, 597. doi:10.3389/fimmu.2018.00597.
21. Koonin E., Makarova K.S. Mobile Genetic Elements and Evolution of CRISPR-Cas Systems: All the Way There and Back. *Genome Biol. Evol.*, 2017, Vol. 9, no. 10, pp. 2812-2825.
22. Krönke J., Ralf K., Buchholz F., Windisch M.P., Pietschmann T., Bartenschlager R., Frese M. Alternative Approaches for Efficient Inhibition of Hepatitis C Virus RNA Replication by Small Interfering RNAs. *J. Virol.*, 2004, Vol. 78, no. 7, pp. 3436-3446.
23. Lander E.S., Linton L.M., Birren B., Nusbaum C., Zody M.C., Baldwin J., Devon K., Dewar K., Doyle M., FitzHugh W., Funke R., Gage D., Harris K., Heaford A., Howland J., Kann L., Lehoczky J., LeVine R., McEwan P., McKernan K., Meldrim J., Mesirov J.P., Miranda C., Morris W., Naylor J., Raymond C., Rosetti M., Santos R., Sheridan A., Sougnez C., Stange-Thomann Y., Stojanovic N., Subramanian A., Wyman D., Rogers J., Sulston J., Ainscough R., Beck S., Bentley D., Burton J., Clee C., Carter N., Coulson A., Deadman R., Deloukas P., Dunham A., Dunham I., Durbin R., French L., Grafham D., Gregory S., Hubbard T., Humphray S., Hunt A., Jones M., Lloyd C., McMurray A., Matthews L., Mercer S., Milne S., Mullikin J.C., Mungall A., Plumb R., Ross M., Shownkeen R., Sims S., Waterston R.H., Wilson R.K., Hillier L.W., McPherson J.D., Marra M.A., Mardis E.R., Fulton L.A., Chinwalla A.T., Pepin K.H., Gish W.R., Chisoe S.L., Wendl M.C., Delehaunty K.D., Miner T.L., Delehaunty A., Kramer J.B., Cook L.L., Fulton R.S., Johnson D.L., Minx P.J., Clifton S.W., Hawkins T., Branscomb E., Predki P., Richardson P., Wenning S., Slezak T., Doggett N., Cheng J.F., Olsen A., Lucas S., Elkin C., Uberbacher E., Frazier M., Gibbs R.A., Muzny D.M., Scherer S.E., Bouck J.B., Sodergren E.J., Worley K.C., Rives C.M., Gorrell J.H., Metzker M.L., Naylor S.L., Kucherlapati R.S., Nelson D.L., Weinstock G.M., Sakaki Y., Fujiyama A., Hattori M., Yada T., Toyoda A., Itoh T., Kawagoe C., Watanabe H., Totoki Y., Taylor T., Weissenbach J., Heilig R., Saurin W., Artiguenave F., Brottier P., Bruls T., Pelletier E., Robert C., Wincker P., Smith D.G., Doucette-Stamm L., Rubenfield M., Weinstock K., Lee H.M., Dubois J., Rosenthal A., Platzer M., Nyakatura G., Taudien R., Rump A., Yang H., Yu J., Wang J., Huang G., Gu J., Hood L., Rowen L., Madan A., Qin S., Davis R.W., Federspiel N.A., Abola A.P., Proctor M.J., Myers R.M., Schmutz J., Dickson M., Grimwood J., Cox D.R., Olson M.V., Kaul R., Raymond C., Shimizu N., Kawasaki K., Minoshima S., Evans G.A., Athanasiou M., Schultz R., Roe B.A., Chen F., Pan H., Ramser J., Lehrach H., Reinhardt R., McCombie W.R., de la Bastide M., Dedhia N., Blöcker H., Hornischer K., Nordsiek G., Agarwala R., Aravind L., Bailey J.A., Bateman A., Batzoglu S., Birney E., Bork P., Brown D.G., Burge C.B., Cerutti L., Chen H.C., Church D., Clamp M., Copley R.R., Doerks T., Eddy S.R., Eichler E.E., Furey T.S., Galagan J., Gilbert J.G., Harmon C., Hayashizaki Y., Haussler D., Hermjakob H., Hokamp K., Jang W., Johnson L.S., Jones T.A., Kasif S., Kasprzyk A., Kennedy S., Kent W.J., Kitts P., Koonin E.V., Korf I., Kulp D., Lancet D., Lowe T.M., McLysaght A., Mikkelsen T., Moran J.V., Mulder N., Pollara V.J., Ponting C.P., Schuler G., Schultz J., Slater G., Smit A.F., Stupka E., Szustakowski J., Thierry-Mieg D., Thierry-Mieg J., Wagner L., Wallis J., Wheeler R., Williams A., Wolf Y.I., Wolfe K.H., Yang S.P., Yeh R.F., Collins F., Guyer M.S., Peterson J., Felsenfeld A., Wetterstrand K.A., Patrinos A., Morgan M.J., de Jong P., Catanese J.J., Osoegawa K., Shizuya H., Choi S., Chen Y.J., Szustakowski J., International Human Genome Sequencing Consortium. International Human Genome Sequencing Consortium (2001) Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*, 2001, vol. 409, no. 6822, pp. 860-921.
24. Laudadio I., Orso F., Azzalin G., Calabrò C., Berardinelli F., Coluzzi E., Gioiosa S., Taverna D., Sgura A., Carissimi C., Fulci V. AGO2 promotes telomerase activity and interaction between the telomerase components TERT and TERC. *EMBO Rep.*, 2019, Vol. 20, no. 2, e45969. doi: 10.15252/embr.201845969.

25. Levy D.E. Whence Interferon? Variety in the Production of Interferon in Response to Viral Infection. *J. Exp. Med.*, 2002, Vol. 195, no. 4, pp. 15-18.
26. Lo M.W., Kemper C., Woodruff T.M. COVID-19: Complement, Coagulation, and Collateral Damage. *J. Immunol.*, 2020, Vol. 205, no. 6, pp. 1488-1495.
27. Maillard P.V., van der Veen A.G., Poirier E.Z., Reis e Sousa C. Slicing and dicing viruses: antiviral RNA interference in mammals. *EMBO J.*, 2019, Vol. 38, no. 8, e100941. doi: 10.15252/embj.2018100941.
28. Manca S., Upadhyaya B., Mutai E., Desaulniers A.T., Cederberg R.A., White B.R., Zemleni J. Milk exosomes are bioavailable and distinct microRNA cargos have unique tissue distribution patterns. *Sci. Rep.*, 2018, Vol. 8, no. 1, 11321. doi: 10.1038/s41598-018-29780-1.
29. McCaffrey A.P., Nakai H., Pandey K., Huang Z., Salazar F.H., Xu H., Wieland S.F., Marion P.L., Kay M.A. Inhibition of hepatitis B virus in mice by RNA interference. *Nat. Biotechnol.*, 2003, Vol. 21, no. 6, pp. 639-644.
30. Netea M.G., Quintin J., van der Meer J.W.M. Trained Immunity: A Memory for Innate Host Defense. *Cell Host Microbe*, 2011, Vol. 9, no. 5, pp. 355-361.
31. Onomoto K., Onoguchi K., Yoneyama M. Regulation of RIG-I-like receptor-mediated signaling: interaction between host and viral factors. *Cell. Mol. Immunol.*, 2021, Vol. 18, no. 3, pp. 539-555.
32. Reimer-Michalski E.M., Conrath U. Innate immune memory in plants. *Semin. Immunol.*, 2016, Vol. 28, no. 4, pp. 319-327.
33. Smatti M.K., Asmaa A., Thani A., Yassine H.M. Viral-induced enhanced disease illness. *Front. Microbiol.* 2018, Vol. 9, 2991. doi: 10.3389/fmicb.2018.02991.
34. Soye K.J., Trottier C., Richardson C.D., Ward B.J., Miller W.H. Jr. RIG-I is required for the inhibition of measles virus by retinoids. *PLoS One*, 2011, Vol. 6, no. 7, e22323. doi: 10.1371/journal.pone.0022323.
35. Stetson D.B., Medzhitov R. Type I interferons in host defense. *Immunity*. 2006, Vol. 25, no. 3, pp. 373-381.
36. Tirado S.M., Yoon K.J. Antibody-dependent enhancement of virus infection and disease. *Viral Immunol.*, 2003, Vol. 16, no. 1, pp. 69-86.
37. van der Veen A.G., Maillard P.V., Schmidt J.M., Lee S.A., Deddouche-Grass S., Borg A., Kjær S., Snijders A.P., Reis e Sousa C. The RIG-I-like receptor LGP2 inhibits Dicer-dependent processing of long double-stranded RNA and blocks RNA interference in mammalian cells. *EMBO J.*, 2018, Vol. 37, no. 4, e97479. doi:10.15252/embj.201797479.
38. Wan Y., Shang J., Sun S., Tai W., Chen J., Geng Q., He L., Chen Y., Wu J., Shi Z., Zhou Y., Du L., Li F. Molecular mechanism for antibody-dependent enhancement of coronavirus entry. *J. Virol.*, 2020, Vol. 94, no. 5, pp. 2015-2019.
39. Wei W., Morrish T.A., Alisch R.S., Moran J.V. A transient assay reveals that cultured human cells can accommodate multiple LINE-1 retrotransposition events. *Anal. Biochem.*, 2000, Vol. 284, no. 2, pp. 435-438.
40. Wicker T., Sabot F., Hua-Van A., Bennetzen J.L., Capy P., Chalhoub B., Flavell A., Leroy P., Morgante M., Panaud O., Paux E., SanMiguel P., Schulman A. A unified classification system for eukaryotic transposable elements. *Nat. Rev. Genet.*, 2007, Vol. 8, no. 12, pp. 973-982.
41. Wu J., Chen Z.J. Innate immune sensing and signaling of cytosolic nucleic acids. *Annu. Rev. Immunol.*, 2014, Vol. 32, pp. 461-488.
42. Yip M.S., Cheung C.Y., Li P.H., Bruzzone R., Malik P.J.S., Martial J. Investigation of Antibody-Dependent Enhancement (ADE) of SARS coronavirus infection and its role in pathogenesis of SARS. *BMC Proc.*, 2011, Vol. 5, P80. doi: 10.1186/1753-6561-5-s1-p80.
43. Yokota T., Sakamoto N., Enomoto N., Tanabe Y., Miyagishi M., Maekawa S., Yi L., Kurosaki M., Taira K., Watanabe M., Mizusawa H. Inhibition of intracellular hepatitis C virus replication by synthetic and vector-derived small interfering RNAs. *EMBO Rep.* 2003, Vol. 4, no. 6, pp. 602-608.
44. Zemleni J. Milk exosomes: beyond dietary microRNAs. *Genes Nutr.*, 2017, Vol. 12, 12. doi: 10.1186/s12263-017-0562-6.

Авторы:

Муратходжаев Д.Н. — к.б.н., заведующий отделом международных связей Института иммунологии и геномики человека Академии наук Республики Узбекистан, г. Ташкент, Республика Узбекистан
Арипова Т.У. — д.м.н. профессор, академик Академии наук Республики Узбекистан, директор Института иммунологии и геномики человека Академии наук Республики Узбекистан, г. Ташкент, Республика Узбекистан

Authors:

Muratkhodjaev J.N., PhD (Biology), Head, Scientific Relations Department, Institute of Immunology and Human Genomics, Academy of Sciences of the Republic of Uzbekistan, Tashkent, Republic of Uzbekistan
Aripova T.U., PhD, MD (Medicine), Professor, Full Member, Academy of Sciences of the Republic of Uzbekistan, Director, Institute of Immunology and Human Genomics, Academy of Sciences of the Republic of Uzbekistan, Tashkent, Republic of Uzbekistan

Поступила 05.04.2021
Принята к печати 04.01.2022

Received 05.04.2021
Accepted 04.01.2022

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-1β на репарацию язвенных повреждений слизистой оболочки желудка // Цитокины и воспаление, 2012. Т. 11, № 1. С. 64-69. [Varyushina E.A., Alexandrov G.V., Sazonova T.A., Simbirtsev A.S. Study of the effect of local application of recombinant human interleukin-1β in the repair of ulcerative lesions of gastric mucosa. *Tsitokiny i vospalenie = Cytokines and Inflammation*, 2012, Vol. 11, no. 1, pp. 64-69. (In Russ.)]

Описание статьи из книги (монографии):

Соколова Г.Н., Потапова В.Б. Клинико-патогенетические аспекты язвенной болезни желудка. М.: Анахарсис, 2009. 328 с. [Sokolova G.N., Potapova V.B. Clinical and pathogenetic aspects of gastric ulcer. Moscow: Anacharsis, 2009. 328 p.]

Примеры правильного оформления англоязычных ссылок:

Wells S.M., Kantor A.B., Stall A.M. CD43(S7) expression identifies peripheral B-cell subsets. *J. Immunol.*, 1994, Vol. 153, no. 12, pp. 5503-5515.

Goodman J.W., Parslow T.G. Immunoglobulin proteins. Basic and Clinical Immunology. Ed. Stites D.P., Terr A.I., Parslow T.G., Appleton and Lange, 1994, pp. 66-79.

Ссылки на литературные источники в тексте статьи, в рисунках и таблицах обозначаются арабскими цифрами в квадратных скобках [1, 2, 3,...]. не допускаются ссылки на диссертации, авторефераты диссертаций, публикации в сборниках, методические документы местного уровня. Количество источников не ограничено. В каждой ссылке приводятся все авторы работы. Неопубликованные статьи в список не включаются.

Обозначения, сокращения и единицы измерения

Для сложных терминов или названий, наиболее часто используемых в тексте статьи, можно ввести (в круглых скобках после первого упоминания полного названия термина) не более 3–5 нетрадиционных сокращений. Узаконенные международными номенклатурами сокращения используются в соответствующей транскрипции. Например, для термина «интерлейкин» используется сокращение «IL»,

а не русскоязычный вариант «ИЛ»; аналогично этому используются сокращения: «TNF», а не «ТНФ» или «ФНО»; «CD», а не «СД». Названия микроорганизмов приводятся в оригинальной транскрипции с использованием курсива (*E. coli*, *Streptococcus pyogenes*). Единицы измерения приводятся без точки после их сокращенного обозначения (с, ч, см, мл, мг, kDa и т.д.), регламентированного международными правилами.

Оформление иллюстративного материала

Иллюстративный материал должен быть оригинальным, то есть ранее нигде не опубликованным. Общее количество иллюстраций (таблиц и рисунков) не должно превышать восьми. При большем количестве иллюстраций их публикация оплачивается автором. Публикация цветных иллюстраций (независимо от их количества) также оплачивается автором. Весь иллюстративный материал присылается в двух экземплярах и на диске в виде отдельных файлов.

Размеры иллюстраций:

- максимальная высота — 210 мм
- максимальная ширина для 1 столбца — 82 мм, для 2 столбцов — 170 мм

Таблицы. Каждая таблица печатается на отдельном листе (в отдельном файле на диске) через 2 интервала. Нумерация таблиц дается арабскими цифрами отдельно от нумерации рисунков (графиков и фотографий). Название печатается над таблицей. Весь текст на русском языке, содержащийся в таблице, включая единицы измерения, должен быть переведен на английский язык; при этом перевод следует помещать в ячейку с соответствующим русским текстом отдельной строкой. Название таблицы и текст примечания к ней также должны быть переведены на английский язык и приведены под русским текстом с новой строки. Для пометок в таблицах следует использовать одну или несколько (*). Пояснения печатаются после соответствующего количества (*) под таблицей. Единицы измерения, при необходимости, включаются в заголовки строк или столбцов.

Рисунки (графики и фотографии). В тексте статьи названия рисунков (графиков, фотографий) и таблиц размещаются сразу после абзаца, где на них дается первая ссылка. Все рисунки нумеруются последовательно арабскими цифрами по мере их использования в тексте статьи. Названия рисунков и подписи к ним выносятся в виде списка на отдельную страницу. В списке указываются: номер рисунка, название (с большой буквы), текст примечаний (для микрофотографий должно быть указано увеличение). Подписи к рисункам даются краткие, но достаточно информативные. Названия рисунков и примечаний к ним, нарисовочные подписи, текст легенды должны быть переведены на английский язык и размещены под соответствующим текстом с новой строки. На обороте каждой иллюстрации подписывается фамилия первого автора, название статьи и порядковый номер. Для публикации в журнале принимаются только оригиналы фотографий (не ксерокопии) хорошего качества, максимально приближенные к вышеуказанным размерам.

Фотографии не должны иметь больших полей, т. е. фотографический материал должен занимать всю площадь фотографии. Рисунки могут быть представлены в графических форматах с расширением .tiff (разрешение не менее 300 dpi при 100% масштабе), .eps или .ai. Изображения, встроенные в документы Word, не принимаются. Графики и диаграммы предоставляются вместе с таблицами, на основе которых они были созданы, или с численными обозначениями показателей, отображаемых соответствующими графическими элементами (столбиками, секторами и т.п.) в виде файлов с расширениями .doc или, предпочтительнее, .xls.

Плата за публикацию статей

При соблюдении правил публикация статей в журнале «Медицинская иммунология» является бесплатной для авторов и учреждений, в которых они работают. Редакция может потребовать оплату в следующих случаях: 1) за публикацию цветных иллюстраций; 2) при большом количестве иллюстративного материала (свыше 8 иллюстраций).

Подготовка статей

Для представления статьи авторы должны подтвердить нижеследующие пункты. Статья может быть отклонена, если она им не соответствует.

- А. Направляя статью в журнал, авторы гарантируют, что поданные материалы не были ранее опубликованы полностью или по частям, в любой форме, в любом месте или на любом языке. Также авторы гарантируют, что статья не представлена для рассмотрения и публикации в другом журнале. С момента принятия статьи к печати в журнале «Медицинская иммунология» приведенный в ней материал не может быть опубликован авторами полностью или по частям в любой форме, в любом месте и на любом языке без согласования с руководством журнала. Исключением может являться: 1) предварительная или последующая публикация материалов статьи в виде тезисов или короткого резюме; 2) использование материалов статьи как части лекции или обзора; 3) использование автором представленных в журнал материалов при написании диссертации, книги или монографии. Воспроизведение всего издания или части любым способом запрещается без письменного разрешения издателей. Нарушение закона будет преследоваться в судебном порядке. Охраняется Законом РФ № 5351-1 «Об авторском праве и смежных правах» от 09.07.93 г.
- Б. Файл отправляемой статьи представлен в формате .doc, .docx, .rtf.
- В. Помимо файла со статьей, предоставлены следующие файлы:
 - 1) Файл с метаданными (при загрузке в систему ему присваивается имя «Метаданные»):
 - Фамилия, имя, отчество, ученая степень, ученое звание, должность автора, ответственного за дальнейшую переписку с редакцией (на русском и английском языках).
 - Название учреждения, где работает ответственный автор (в русском и официально принятом английском вариантах).

- Почтовый адрес для переписки с указанием почтового индекса (на русском и английском языках).
- Телефон, факс (с указанием кода страны и города), e-mail.
- Фамилия и инициалы остальных соавторов, их ученые степени, ученые звания, должности.
- Полное название статьи, направляемой в редакцию.
- Количество страниц текста, количество рисунков, количество таблиц.
- Указать, для какого раздела журнала предназначена работа: оригинальные статьи, лекции, обзоры, «точка зрения», краткие сообщения, новые иммунологические методы, случаи из практики, дневник иммунолога, книжное обозрение.
- Дата отправления работы.

2) Отсканированная копия файла с метаданными, подписанная всеми авторами (при загрузке в систему ему присваивается имя «Подписи авторов»)

3) Титульный лист (при загрузке в систему ему присваивается имя «Титульный лист»), по форме:

- название статьи (без использования каких-либо сокращений) (на русском и английском языках);
- Фамилия, имя, отчество, ученая степень, ученое звание, должность всех авторов (полностью) (на русском и английском языках);
- подразделение и учреждение, в котором выполнялась работа (если в работе участвовали авторы из разных учреждений, это должно быть отмечено звездочками) (в русском и официально принятом английском вариантах);
- сокращенное название статьи для верхнего колонтитула (не более 35 символов, включая пробелы и знаки препинания) (на русском и английском языках);
- не менее 6 ключевых слов на русском и английском языках;
- адрес для переписки с указанием телефона, номера факса и адреса e-mail.

4) Резюме (при загрузке в систему ему присваивается имя «Резюме»). Предоставляется в виде одного абзаца без ссылок и специфических сокращений. Объем — не менее 300 слов. Резюме в полном объеме представляется также в переводе на английский язык. В отдельных случаях, по решению редакционной коллегии, может быть затребован развернутый вариант резюме на английском языке.

5) Рисунки, если они есть - каждый отдельным файлом (при загрузке в систему каждому рисунку присваивается имя «Рисунок. Название рисунка (где название рисунка соответствует содержащемуся в файле рисунку. Порядковый номер рисунка)»)

6) Файл в формате .doc, .docx, rtf, с названиями рисунков

7) Таблицы, если они есть - каждая отдельным файлом (Название каждой таблицы должно быть приведено заголовком в файле с самой таблицей)

8) Файл с цитируемой литературой (при загрузке в систему ему присваивается имя «Литература»), по следующей форме: таблица из четырех столбцов (альбомная ориентация), где:

Порядковый номер ссылки	Авторы, название публикации и источника, где она опубликована, выходные данные	ФИО, название публикации и источника на английском	Полный интернет-адрес (URL) цитируемой статьи
Размещаются в таблице в алфавитном порядке, вначале русскоязычные, затем на языках с латинской графикой	Указывать по библиографическому стандарту, представленному выше	Официальное англоязычное название публикации и источника, где она опубликована - для русскоязычных статей. В редких случаях, когда не существует официальных англоязычных названий (это возможно для таких типов публикаций, как тезисы, книги и др.) - редакция просит предоставить их перевод, используя красный цвет шрифта. Для англоязычных публикаций и источников в этом столбце ставится прочерк	В том случае, если информация о статье не размещена на официальном сайте издания, допустимо использовать URL статьи со сторонних сайтов, в том числе системы www.e-library.ru

Текст должен быть набран с одинарным межстрочным интервалом; используется кегль шрифта в 14 пунктов; для выделения используется курсив, а не подчеркивание; все ссылки на иллюстрации, графики и таблицы расположены в соответствующих местах в тексте, а не в конце документа.

Текст соответствует стилистическим и библиографическим требованиям.

Если вы отправляете статью в рецензируемый раздел журнала, то вы согласны с требованиями слепого рецензирования, подробнее о котором можно узнать на сайте журнала (<http://mimmun.ru>) из рубрики **Рецензирование**, в разделе **«О Журнале»**.

Вы можете оформить подписку на журнал «Медицинская иммунология» через отделения связи: Каталог «УРАЛ-ПРЕСС» — индекс 42311. Подписка на электронную версию журнала на сайте www.elibrary.ru

АВТОРСКИЙ УКАЗАТЕЛЬ

Агаев Т.	889	Климов В.В.	967	Салахутдинова З.В.	967
Арипова Т.У.	1065	Княжева М.А.	1057	Сахно Л.В.	931
Артамонов А.А.	903	Костоломова Е.Г.	1017	Свириденко Н.Ю.	993
Бабаева Д.М.	993	Кречетова Л.В.	979	Свиридова В.С.	967
Беленюк В.Д.	1007	Кудрявцев И.В.	1007	Сельков С.А.	871
Беловалова И.М.	993	Кузьмич Е.В.	1047	Селютин А.В.	871
Беляева Е.В.	1047	Максимова А.А.	931	Серенко Е.В.	1057
Бессмертная Е.Г.	993	Малышева Н.М.	993	Слѣзкин М.И.	967
Борисов А.Г.	1007	Маркова Е.В.	1057	Сухих Г.Т.	979
Бубнова Л.Н.	1047	Мельниченко Г.А.	993	Терентьева М.А.	1047
Бычкова Н.В.	955	Менжинская И.В.	979	Титерина Е.К.	889
Волкова Д.Е.	1017	Мешкова М.Е.	903	Тихонова М.А.	931
Вторушина В.В.	979	Муратходжаев Д.Н.	1065	Топоркова Л.Б.	1057
Ганковская Л.В.	889	Найдина О.А.	967	Тотоян Арег А.	1027
Гойман Е.В.	1057	Никитин Ю.В.	903	Трошина Е.А.	993
Довгань А.А.	979	Нохрин Д.Ю.	943	Узунова А.Н.	943
Догадин С.А.	1007	Орловская И.А.	1057	Фомина Д.В.	1007
Долгушина Н.В.	979	Останин А.А.	931	Хорева М.В.	889
Драпкина Ю.С.	979	Останкова Ю.В.	1027	Чепанов С.В.	871
Дудина М.А.	1007	Павлов О.В.	871	Черных Е.Р.	931
Жданова Е.В.	1017	Павлова И.Е.	1047	Шевела Е.Я.	931
Зыков А.В.	1017	Печникова Н.А.	1027	Шевченко Ю.А.	1057
Иванов А.М.	903	Пронина Н.А.	967	Шеремета М.С.	993
Изюрова Н.В.	943	Савкин И.В.	1057	Ширинский В.С.	911
Инвиева Е.В.	979	Савочкина А.Ю.	943	Ширинский И.В.	911
Климов А.В.	967	Савченко А.А.	1007		

ПРЕДМЕТНЫЙ УКАЗАТЕЛЬ

аллергический ринит.....	967	лейкоциты	872	регистр доноров	
анализ <i>in silico</i>	1028	лекарственная		гемопоэтических стволовых	
антитела	994	гиперчувствительность.....	956	клеток.....	1048
антителозависимое усиление		лимфоциты	912	риноконъюнктивальные	
инфекции.....	1065	локальный аллергический ринит...	967	симптомы.....	956
аутоантитела	1008	M2-макрофаги	1058	РНК-интерференция	1065
биоинформатический анализ....	1028	макрофаги.....	932	синовиальная жидкость	1018
биологические маркеры	903	маркеры пневмонии	943	срыв толерантности	967
болезнь Грейвса.....	994, 1008	миелома.....	912	субпопуляции.....	1008
вакцинация от COVID-19	980	мышы.....	1058	тромбоцитарно-лейкоцитарные	
внебольничная пневмония	943	наследственный ангиоотек.....	1028	комплексы	872
воспаление.....	912	нейтрофилы.....	1018	тромбоциты	872
гемопоэз.....	1058	остеобласты	912	тяжелая пневмония	943
гены-кандидаты	1028	остеоиммунология.....	912	фенотип	1008
гепатоцеллюлярная карцинома ..	889	остеоиммунология.....	912	фибробласты	932
глюкокортикоиды.....	994	остеоиммунология.....	912	фиброз.....	932
группы HLA-аллелей.....	1048	остеопороз	912	цитокнины.....	889, 903, 912, 943, 967, 994, 1018
дендритные клетки	912	остеоциты	912	эндокринная офтальмопатия	994
депрессия	1058	пародонтит.....	912	эндотипы	967
дети.....	943	патогенетически значимые		В-лимфоциты.....	1008, 1018
иммунный статус	980	мутации.....	1028	<i>Blastocystis hominis</i>	903
иммуномодуляция	872	патология	872	COVID-19	903, 980, 1065
интерлейкины	889	первичные иммунодефициты	1028	<i>Cryptosporidium</i>	903
интерфероны.....	943, 1065	поляризирующие стимулы.....	932	HLA-гаплотипы	1048
клетки периферической крови...	1058	потенциальный донор.....	1048	IFN γ	903
кожный экссудат.....	967	противовирусный иммунитет....	1065	IL-4	903
колониестимулирующие		профиль аутоантител.....	980	SARS-CoV-2	903, 980
факторы	932	радиойодтерапия.....	1008	T-лимфоциты.....	1008, 1018
кондиционная среда.....	932	рак печени	889	T-лимфоциты 2-го типа	
костный мозг	1058	ревматоидный артрит	912, 1018	иммунного ответа	956
кость	912			<i>Toxoplasma gondii</i>	903

ПОДПИСНОЙ ИНДЕКС:
УРАЛ-ПРЕСС – 42311

