

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

Том 25, № 1. С. 1-226

2023

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

МЕДИЦИНСКАЯ ИММУНОЛОГИЯ

АВТОМАТИЧЕСКИЕ АНАЛИЗАТОРЫ ДЛЯ КДЛ лучшие решения для бесперебойной работы вашей лаборатории

РУ ФСЗ 2012/12901 10.09.2012



BF 6800

Автоматический гематологический анализатор

Гематология

РУ ФСЗ 2012/12415 23.07.2012



CS-6400

Передовая биохимическая система

Биохимия

РУ ФСЗ 2010/08020 26.10.2015



CS-300B

Автоматический биохимический анализатор

РУ РЗН 2016/3524 15.02.2016



FUS 2000

Гибридный анализатор мочи

Анализ мочи

- Складские запасы в Москве
- Демократичные цены
- Наличие РУ РЗН
- Сервисная и методическая поддержка

Это печатная реклама. Не для распространения в сети интернет



Единый телефон

8 800 770 71 21

бесплатный звонок по России



Номер подключен на сетях операторов МТС, Билайн, Мегафон и Tele2

ООО «Компания Хеликон», г. Москва, Новомещерский проезд, 9 стр. 1
Адрес центрального отдела продаж в г. Москве: Кутузовский проспект, д. 88

helicon.ru

ОТДЕЛЫ ПРОДАЖ:

В СИБИРСКОМ РЕГИОНЕ:
630090 г. Новосибирск,
ул. Николаева, д. 9/1,
2 подъезд, 2 этаж.
Тел.: +7 (383) 207-84-85
novosibirsk@helicon.ru

В СЕВЕРО-ЗАПАДНОМ РЕГИОНЕ:
194356 г. Санкт-Петербург,
ул. Асафьева, д.3, корп.1, литер А, пом.15-Н
Тел.: +7 (812) 244-85-52
spb@helicon.ru

В ПРИВОЛЖСКОМ РЕГИОНЕ:
420021 г. Казань,
ул. Татарстан, д. 14/59, оф. 201
Тел.: +7 (843) 202-33-37
volga@helicon.ru

В ЮЖНОМ РЕГИОНЕ:
344116 г. Ростов-на-Дону,
2-я улица Володарского, д. 76/23а
Тел.: +7 (863) 209-88-89
rostov@helicon.ru

НА ДАЛЬНЕМ ВОСТОКЕ:
690021, г. Владивосток,
ул. Запорожская, д. 77, 3 этаж, офис 341
Тел.: +7 (914) 720-55-63
vladivostok@helicon.ru

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

МЕДИЦИНСКАЯ ИММУНОЛОГИЯ

январь-февраль

2023, том 25

№ 1

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

Тотолян 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.

Данный материал распространяется по лицензии Creative Commons Attribution 4.0 License.

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 24.01.2023 г. Формат 60 x 90 1/8. Печать офсетная.

Усл. печ. л. 28,25. Тираж 2000 экз. (1-й завод – 1000 экз.) Заказ № 023

Напечатано в ООО «АРТЕМИДА».

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

Тел.: (812) 950-10-99.

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.

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

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 Флуминенсе, 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

Рогенбук 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

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

RUSSIAN ASSOCIATION OF ALLERGOLOGISTS AND CLINICAL IMMUNOLOGISTS,
ST. PETERSBURG REGIONAL BRANCH

(SPb RAACI)

**MEDICAL
IMMUNOLOGY/
MEDITSINSKAYA
IMMUNOLOGIYA**

January-February

2023, volume 25

No. 1

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. Chukhlovin, 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

This material is distributed under the Creative Commons Attribution 4.0 License.

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 24.01.2023. Print format 60 x 90 1/8. Offset printing.

Printed sheets 28,25. Circulation 2000 copies. (1st edition – 1000 copies.)

Print in LLC «ARTEMIDA»

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

Phone: (812) 950-10-99

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

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

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

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

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

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

Editorial Council

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

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

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

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

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

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

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

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

СОДЕРЖАНИЕ

Обзоры

Саидов М.З.

ДАМП-ОПОСРЕДОВАННОЕ ВОСПАЛЕНИЕ И РЕГУЛИРУЕМАЯ ГИБЕЛЬ КЛЕТОК ПРИ ИММУНОВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ РЕВМАТИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ..... 7

Козлов В.А.

ОПРЕДЕЛЯЮЩАЯ РОЛЬ ТИМУСА В ИММУНОПАТОГЕНЕЗЕ АУТОИММУННЫХ, ОНКОЛОГИЧЕСКИХ И ИНФЕКЦИОННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ 39

Ровда Ю.И., Миняйлова Н.Н., Ведерникова А.В., Шабалдин А.В., Халивопуло И.К., Зинчук С.Ф., Шмакова О.В., Лобыкина А.А.

ЭВОЛЮЦИОННЫЕ АСПЕКТЫ ТИМОЛОГИИ В ПЕДИАТРИЧЕСКОЙ ПРАКТИКЕ 59

Миняйлова Н.Н., Ровда Ю.И., Ведерникова А.В., Шабалдин А.В., Зинчук С.Ф., Шмакова О.В., Голомидов А.В., Лобыкина А.А., Сохарев В.В.

АСПЕКТЫ ВИЛОЧКОВОЙ ЖЕЛЕЗЫ ДЕТСКОГО ВОЗРАСТА: МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ РЕЦИПРОКНЫЕ СВЯЗИ ТИМУСА И НЕРВНО-ЭНДОКРИННОЙ СИСТЕМЫ, И В ЧАСТНОСТИ С ГОРМОНАМИ СОМАТОТРОПНОЙ ОСИ 69

Оригинальные статьи

Лыков А.П., Уваров П.И., Геворгиз Р.Г., Железнова С.Н.

ВЛИЯНИЕ ЭКСТРАКТОВ МИКРОВОДОРОСЛЕЙ НА УРОВНИ ЦИТОКИНОВ У МЫШЕЙ-САМОК C57Bl6 81

Соловьева А.С., Мелконян Г.Г., Коваль А.Н., Ташкинов Н.В., Рукина Н.Ю., Шокур О.А., Сапожников Ю.А.

ЦИТОКИНОВЫЙ БАЛАНС КАК ДИАГНОСТИЧЕСКИЙ МАРКЕР ВОСПАЛЕНИЯ ИСКУССТВЕННЫХ ГНОЙНО-ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ МЯГКИХ ТКАНЕЙ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ 91

Левкович М.А., Галкина Г.А., Воропай А.А., Комкова М.В., Морозова Н.В., Кравченко Л.В., Крукиер И.И., Андреева В.О., Погорелова Т.Н.

ОСОБЕННОСТИ ЦИТОКИНОВОГО ПРОФИЛЯ У ПОДРОСТКОВ С МИКРОСОСУДИСТЫМИ ОСЛОЖНЕНИЯМИ САХАРНОГО ДИАБЕТА 1-го ТИПА 101

Пичугова С.В., Лагерева Ю.Г., Бейкин Я.Б.

ДИНАМИКА ПОКАЗАТЕЛЕЙ ЦИТОКИНОВОГО СТАТУСА СЫВОРОТКИ КРОВИ У ПОДРОСТКОВ С ВАРИКОЦЕЛЕ 111

Агарков Н.М., Лев И.В.

СОДЕРЖАНИЕ ХЕМОКИНОВ В СЛЕЗНОЙ ЖИДКОСТИ ПАЦИЕНТОВ С ДИАБЕТИЧЕСКОЙ РЕТИНОПАТИЕЙ И САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ 2-ГО ТИПА 127

Печникова Н.А., Останкова Ю.В., Сайтгаллина М.А., Бебяков А.М., Денисова А.Р., Подчерняева Н.С., Тотолян Арег А.

ПРИМЕНЕНИЕ БИОИНФОРМАТИЧЕСКОГО АНАЛИЗА ДЛЯ ПРОГНОСТИЧЕСКОЙ ОЦЕНКИ КЛИНИЧЕСКОЙ ЗНАЧИМОСТИ МИССЕНС-МУТАЦИИ ГЕНА *HS3ST6* В РАЗВИТИИ НАСЛЕДСТВЕННОГО АНГИОТЕКА 135

Свирицкая Е.В., Коновалова М.В., Садыков В.Ф., Пырегов А.В., Полтавцева Р.А.

СУБПОПУЛЯЦИОННЫЙ СОСТАВ ЛИМФОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ПРИ COVID-19 155

Никитин Ю.В., Александрова Е.В., Криворучко А.Б., Мешкова М.Е., Минаева Л.В., Жданов К.В., Артамонов А.А.,

Козлов К.В., Иванов А.М., Мальцев О.В., Иванов К.С., Ляшенко Ю.И., Масалов Е.Б.

ВЗАИМОСВЯЗЬ ВИРУСНОЙ НАГРУЗКИ И ПОКАЗАТЕЛЕЙ КЛЕТОЧНОГО ЗВЕНА ИММУННОЙ СИСТЕМЫ У ПАЦИЕНТОВ С COVID-19 РАЗЛИЧНОЙ СТЕПЕНИ ТЯЖЕСТИ 167

Иванова И.А., Филиппенко А.В., Труфанова А.А., Омельченко Н.Д., Чемисова О.С., Носков А.К.

ОСОБЕННОСТИ ФОРМИРОВАНИЯ ПОСТВАКЦИНАЛЬНОГО ГУМОРАЛЬНОГО ИММУННОГО ОТВЕТА У ЛИЦ, ПЕРЕНЕСШИХ COVID-19 РАЗНОЙ СТЕПЕНИ ТЯЖЕСТИ 181

Попова А.Ю., Смирнов В.С., Егорова С.А., Абдуллозода Д.А., Рузиев М.М., Миличкина А.М., Иванов В.А., Вохидов С.Д., Рамзи Э.С.,

Муллоджанова М.М., Дрозд И.В., Холова Б.Т., Краснов А.А., Джафаров Н.Д., Жимбаева О.Б., Губанова А.В., Разумовская А.П.,

Дробышевская В.Г., Тотолян Арег А.

ДОСТИЖЕНИЕ МАКСИМАЛЬНОГО КОЛЛЕКТИВНОГО ИММУНИТЕТА SARS-CoV-2 СРЕДИ НАСЕЛЕНИЯ ТАДЖИКИСТАНА К МАРТУ 2022 ГОДА 193

Фей Лиана, Сойлия Фертилита, Элпа Амалия, Вени Ларасати, Риана Сару Пуспита Расид, Эка Фебри Зулиссетина,

Рохан Саблоак, Закийя Ульфа Сару

ДИНАМИКА IgG-АНТИТЕЛ ПРОТИВ RBD УЧАСТКА S-БЕЛКА SARS-CoV-2 ПОСЛЕ ВВЕДЕНИЯ CoronaVac: ДЛИТЕЛЬНОЕ НАБЛЮДЕНИЕ 215

Правила для авторов 223

Авторский указатель 226

Предметный указатель 226

CONTENTS

Reviews

Saidov M.Z.

DAMP-MEDIATED INFLAMMATION AND REGULATED CELL DEATH IN IMMUNOINFLAMMATORY RHEUMATIC DISEASES 7

Kozlov V.A.

DETERMINING ROLE OF THYMUS IN IMMUNE PATHOGENESIS OF AUTOIMMUNE, ONCOLOGICAL AND INFECTIOUS DISEASES 39

Rovda Yu.I., Minyailova N.N., Vedernikova A.V., Shabaldin A.V., Khalivopulo I.K., Zinchuk S.F., Shmakova O.V., Lobykina A.A.

EVOLUTIONARY ASPECTS OF THYMOLOGY IN PEDIATRIC PRACTICE 59

Minyailova N.N., Rovda Yu.I., Vedernikova A.V., Shabaldin A.V., Zinchuk S.F., Shmakova O.V., Golomidov A.V., Lobykina A.A., Sokharev V.V.

THYMIC GLAND ASPECTS IN CHILDHOOD: MORPHOFUNCTIONAL RECIPROCAL RELATIONSHIPS BETWEEN THYMUS, NERVOUS AND ENDOCRINE SYSTEM, IN PARTICULAR, WITH THE SOMATOTROPHIC AXIS HORMONES 69

Original articles

Lykov A.P., Uvarov I.P., Gevorgiz R.G., Zheleznova S.N.

EFFECT OF EXTRACTS FROM MICROALGAE ON CYTOKINE LEVELS IN FEMALE C57B16 MICE 81

Solovyeva A.S., Melkonyan G.G., Koval A.N., Tashkinov N.V., Rukina N.Yu., Shokur O.A., Sapozhnikov Yu.A.

CYTOKINE BALANCE AS A DIAGNOSTIC MARKER OF INFLAMMATION IN EXPERIMENTAL PURULENT LESIONS OF SOFT TISSUES 91

Levkovich M.A., Galkina G.A., Voropai A.A., Komkova M.V., Morozova N.V., Kravchenko L.V., Kruker I.I., Andreeva V.O., Pogorelova T.N.

FEATURES OF THE CYTOKINE PROFILE IN ADOLESCENTS WITH MICROVASCULAR COMPLICATIONS OF TYPE 1 DIABETES MELLITUS 101

Pichugova S.V., Lagereva Yu.G., Beikin Ya.B.

DYNAMICS OF CYTOKINE STATUS OF BLOOD SERUM IN ADOLESCENTS WITH VARICOCELE 111

Agarkov N.M., Lev I.V.

CONTENTS OF CHEMOKINES IN LACRIMAL FLUID OF THE PATIENTS WITH DIABETIC RETINOPATHY AND TYPE 2 DIABETES MELLITUS 127

Pechnikova N.A., Ostankova Yu.V., Saitgalina M.A., Bebyakov A.M., Denisova A.R., Podchernyaeva N.S., Totolian Areg A.

APPLYING BIOINFORMATIC ANALYSIS FOR PROGNOSTIC ASSESSMENT OF THE HS3ST6 MISSENSE MUTATIONS CLINICAL SIGNIFICANCE IN THE DEVELOPMENT OF HEREDITARY ANGIOEDEMA 135

Svirshchevskaya E.V., Konovalova M.V., Sadykov V.F., Pyregov A.V., Poltavtseva R.A.

SUBPOPULATION COMPOSITION OF PERIPHERAL BLOOD LYMPHOCYTES IN COVID-19 155

Nikitin Yu.V., Alexandrova E.V., Krivoruchko A.B., Meshkova M.E., Minaeva L.V., Zhdanov K.V., Artamonov A.A., Kozlov K.V., Ivanov A.M., Maltsev O.V., Ivanov K.S., Lyashenko Yu.I., Masalov E.B.

INTERRELATIONS BETWEEN VIRAL LOAD AND CELLULAR IMMUNITY IN PATIENTS WITH COVID-19 OF VARYING SEVERITY 167

Ivanova I.A., Filippenko A.V., Trufanova A.A., Omelchenko N.D., Chemisova O.S., Noskov A.K.

FEATURES OF POST-VACCINATION HUMORAL IMMUNE RESPONSE IN THE PERSONS WHO UNDERWENT COVID-19 OF VARIOUS SEVERITY 181

Popova A.Yu., Smirnov V.S., Egorova S.A., Abdullozoda J.A., Ruziev M.M., Milichkina A.M., Ivanov V.A., Vokhidov S.D., Ramsay E.S., Mullodzhanova M.M., Drozd I.V., Kholova B.T., Krasnov A.A., Jafarov N.D., Zhimbayeva O.B., Gubanova A.V., Razumovskaya A.P., Drobyshevskaya V.G., Totolian Areg A.

ACHIEVEMENT OF MAXIMAL SARS-CoV-2 COLLECTIVE IMMUNITY AMONG THE TAJIK POPULATION BY MARCH 2022 193

Phey Liana, Soilia Fertilita, Ella Amalia, Veny Larasati, Riana Sari Puspita Rasyid, Eka Febri Zulissetiana, Rohan Sabloak, Zakiyyah Ulfa Sari

ANTI-SARS-CoV-2 SPIKE RECEPTOR BINDING DOMAIN (S-RBD) IgG ANTIBODIES FOLLOWING CoronaVac ADMINISTRATION: A LONGITUDINAL STUDY. ANTI-SARS-CoV-2 S-RBD IgG ANTIBODIES 215

Instructions to Authors 223

Author index 226

Subject index 226

DAMP-ОПОСРЕДОВАННОЕ ВОСПАЛЕНИЕ И РЕГУЛИРУЕМАЯ ГИБЕЛЬ КЛЕТОК ПРИ ИММУНОВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ РЕВМАТИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ

Саидов М.З.

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

Резюме. В патогенезе иммуновоспалительных ревматических заболеваний доминирующим является состояние аутореактивности врожденного иммунитета, индуцирующее неинфекционное «стерильное» воспаление. К отличительным свойствам этого воспаления относится полиорганный и рецидивирующее течение. Ключевым фактором прогрессирования этого воспаления является высвобождение в процессах дезорганизации основного вещества рыхлой волокнистой неоформленной соединительной ткани, а также регулируемой и случайной гибели клеток вне- и внутриклеточных «сигналов опасности» – DAMPs. При иммуновоспалительных ревматических заболеваниях к DAMP-индуцированным формам регулируемой гибели клеток относятся аутофагия, апоптоз, некроптоз, пироптоз и нетоз. Мембранные и цитозольные PRR-рецепторы, взаимодействуя с DAMPs, обуславливают указанные DAMP-индуцированные формы регулируемой гибели клеток. При этом DAMP-индуцированные формы регулируемой гибели клеток часто сочетаются с одновременной реакцией PRR-рецепторов на предсуществующие в умерших клетках PAMPs патогенов. TLR-DAMP взаимодействие активирует те же сигнальные пути, адапторные молекулы, транскрипционные факторы, формирует те же провоспалительные инфламмосомы, что и при TLR-PAMP взаимодействии. В этих процессах антиген-презентирующая функция дендритных клеток выражена в максимальной степени. С учетом важной роли инфекций в качестве этиологических факторов при иммуновоспалительных ревматических заболеваниях, указанные процессы могут являться ключевыми при индукции феномена кросс-презентации. Взаимодействия DAMPs с PRR-рецепторами клеток врожденного иммунитета обуславливают формирование DAMP-опосредованного порочного круга. При этом повышение уровня провоспалительных DAMPs как *in situ*, так и в системной циркуляции приводит, посредством PRR-DAMP взаимодействия, к еще большему количеству клеток, подвергшихся регулируемой гибели клеток и к еще большему повреждению тканей. В свою очередь, эти процессы значительно увеличивают уровни провоспалительных DAMPs в тканях, которые обуславливают прогрессирование «стерильного» воспаления при иммуновоспалительных ревматических заболеваниях. Идентифицированы сигнальные пути, адапторные молекулы, транскрипционные факторы, провоспалительные инфламмосомы при всех видах регулируемой гибели клеток, индуцированных PRR-DAMP взаимодействием. Имеющиеся результаты исследований позволяют определить соответствующие мишени с целью их фармакологической коррекции. В этом отношении достигнут значительный прогресс в изыскании медикаментозных средств регуляции воспаления при СКВ, РА, синдроме Шегрена, ССД и др. Не меньшее значение имеет оценка сывороточных уровней DAMPs в качестве диагностических и прогностических биомаркеров, а также оценки эффективности лечения иммуновоспалительных ревматических заболеваний.

Ключевые слова: воспаление, ревматические болезни, DAMPs, PRR-рецепторы, гибель клеток, врожденный иммунитет, аутореактивность

Адрес для переписки:

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

Address for correspondence:

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

Образец цитирования:

М.З. Саидов «DAMP-опосредованное воспаление и регулируемая гибель клеток при иммуновоспалительных ревматических заболеваниях» // Медицинская иммунология, 2023. Т. 25, № 1. С. 7-38.
doi: 10.15789/1563-0625-DMI-2557

© Саидов М.З., 2023

Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

M.Z. Saidov "DAMP-mediated inflammation and regulated cell death in immunoinflammatory rheumatic diseases", *Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2023, Vol. 25, no. 1, pp. 7-38.
doi: 10.15789/1563-0625-DMI-2557

© Saidov M.Z., 2023

The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License

DOI: 10.15789/1563-0625-DMI-2557

DAMP-MEDIATED INFLAMMATION AND REGULATED CELL DEATH IN IMMUNOINFLAMMATORY RHEUMATIC DISEASES

Saidov M.Z.

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

Abstract. The state of autoreactivity of innate immunity dominates in the pathogenesis of immunoinflammatory rheumatic diseases, inducing non-infectious “sterile” inflammation. The distinctive properties of this inflammation include multiorgan affection and recurrent clinical course. The extracellular and intracellular “danger signals” called DAMPs, seem to be a key factor in progression of the inflammatory events. These factors are released by the loose fibrous connective tissue in the course of main substance disorganization, as well as regulated and accidental local cell death. In immune/inflammatory rheumatic diseases, the DAMP-induced patterns of regulated cell death include autophagy, apoptosis, necroptosis, pyroptosis and netosis. Membrane and cytosolic PRR receptors, interacting with DAMPs, promote these DAMP-induced forms of regulated cell death. At the same time, the DAMP-induced modes of regulated cell death are often combined with simultaneous reaction of PRR receptors to the pathogens that preexist in dead cells. TLR-DAMP interaction activates similar signaling pathways, adaptive molecules, transcription factors, forming the same pro-inflammatory inflammasomes as with TLR-PAMP interaction. In these processes, the antigen-presenting function of dendritic cells is expressed to the maximal extent. Given the important role of infections as etiological factors in immunoinflammatory rheumatic diseases, these processes may be the key factor inducing the phenomenon of antigenic cross-presentation. Interactions of DAMPs with PRR receptors of innate immunity cells cause the formation of a DAMP-mediated vicious circle. At the same time, increased levels of proinflammatory DAMPs, both *in situ* and in systemic circulation, leads, *via* the PRR-DAMP interactions, to increasing number of cells prone to regulated cell death and to even more pronounced tissue damage. In turn, these processes significantly increase the levels of pro-inflammatory DAMPs in tissues, thus causing progression of “sterile” inflammation to immunoinflammatory rheumatic diseases. The signaling pathways, adaptive molecules, transcription factors, and pro-inflammatory inflammasomes have been identified in all types of regulated cell death induced by PRR-DAMP interaction. The available research results allow us to determine appropriate targets which may be subjected to pharmacological correction. In this respect, significant progress has been made in search for medicinal tools of regulating inflammation in SLE, RA, Sjogren’s syndrome, SSD, etc. Of sufficient importance are both evaluation of serum DAMP levels as diagnostic and prognostic biomarkers, along with their determination for assessing treatment efficiency in immunoinflammatory rheumatic diseases.

Keywords: inflammation, rheumatic diseases, DAMPs, PRR receptors, cell death, innate immunity, autoreactivity

Введение

Иммуновоспалительные ревматические заболевания (ИВРЗ) относятся к группе мультифакториальных заболеваний, при которых интерпретация патогенеза системного иммуновоспалительного процесса в рыхлой волокнистой неоформленной соединительной ткани базируется на концептуальных представлениях о базисных механизмах организации и функционировании иммунной системы. Выход в свет в 1989 г. статьи С.А. Janeway под названием “Approaching the Asymptote? Evolution and Revolution in Immunology. Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology” [50] ознаменовал принципиально новый этап понимания эволюционного предназначения и функциональных основ системы иммунитета. Доминирующая к

тому времени теоретическая модель F.M. Burnet дискриминации «я / не я» (модель самораспознавания, или иммунного надзора) нарушала принципы АГ-специфического клонального отбора, поскольку, в частности, распознавательная функция, необходимая для иммунной реакции, происходит от неклонально распределенных рецепторов. В рамках принципов этой модели возникали сложности в понимании иммунного распознавания на фундаментальном уровне, т. е. различении «я» от «не я» и защиту хозяина от инфекции. Революционизирующее значение предложенных С.А. Janeway концептуальных основ врожденного иммунитета состояло в том, что эффекторные клетки врожденного иммунитета несут рецепторы, которые позволяют распознавать ассоциированные с патогеном консервативные молекулярные паттерны, не обнаруживаемые в

организме хозяина. «Я называю эти рецепторы рецепторами распознавания образов», пишет С.А. Janeway и далее: «Я думаю, что такие рецепторы будут распознавать общие структурные паттерны в молекулах, обнаруженные у многих микроорганизмов, но не у многоклеточных организмов, в которых развилась эта система защиты. Признание таких структурных различий способствует эволюционному отбору тех рецепторов, которые могут эффективно отличать себя от не-себя». Эти рецепторы не имеют клонального распределения на лимфоцитах и у них нет иммунологической памяти. С.А. Janeway в цитируемой работе заключает: «Я также выдвигаю гипотезу, что клональное распознавание чужеродных паттернов играет важную роль в функционировании иммунной системы и в защите хозяина. Рецепторы, опосредующие такие события, являются оригинальными, неклональными триггерами механизмов иммунного воздействия». Таким образом в иммунологический обиход было введено фундаментальное понятие рецепторов распознавания образов (pattern recognition receptors) или PRR-рецепторов.

В последующей новаторской работе ученика С.А. Janeway нашего соотечественника Р. Меджитова [75] классическими молекулярно-генетическими методами идентифицирован и клонирован ген, ответственный за конститутивную экспрессию человеческого гомолога Toll-протеина у *Drosophila melanogaster*. Белок Toll у *Drosophila melanogaster* контролирует дорсально-вентральную дифференцировку в эмбрионах этой мушки и одновременно обеспечивает антигрибковый иммунный ответ. Трансфекция человеческого гомолога этого гена в человеческие клеточные линии сопровождалась активацией транскрипционного фактора NF- κ B с последующей продукцией IL-1, IL-6, IL-8 и костимуляторной молекулы B7.1, необходимых для активации Т-клеток. Р. Меджитов документировал активную мРНК человеческого Toll-протеина в моноцитах, макрофагах, дендритных клетках, γ/δ Т-клетках, Th1 и Th2 α/β Т-клетках, эпителиальных клетках, в клетках В-клеточной линии. Так, впервые были представлены экспериментальные результаты, свидетельствующие о том, что человеческий гомолог Toll-протеина *Drosophila melanogaster* может индуцировать сигналы, активирующие как врожденный, так и адаптивный иммунный ответ у позвоночных. В последующем этот гомолог был обозначен как TLR-рецептор.

Изучение молекулярно-клеточных основ PRR-распознавания сформировало новую, перспективную область исследований, связанную с изучением сигнальных путей, адапторных молекул и активацией транскрипционных

факторов в клетках врожденного иммунитета с последующим запуском двух эффекторных направлений – это индукции АГ-специфического адаптивного иммунного ответа и регулируемой гибели клеток (РГК). Процесс РГК сопровождается гиперпродукцией одного из основных эффекторных цитокинов – IL-1 β , стимулирующего аутовоспаление в рыхлой волокнистой неоформленной соединительной ткани, одновременно способствуя экспансии клеток адаптивной иммунной системы – аутореактивных Th1- и Th17-лимфоцитов и ингибируя активность регуляторных Т-лимфоцитов (Treg). При ИВРЗ указанные исходы функциональной активности врожденного и адаптивного иммунитета патогенетически ассоциированы с хроническим продуктивным воспалением (ХПВ) *in situ*.

Первоначально С.А. Janeway ограничил PRR-распознавание молекулярными паттернами, связанными с микробными патогенами (pathogen-associated molecular patterns – PAMPs), действующих как «лиганды» для TLR. Иммунногенность PAMPs, по С.А. Janeway, обеспечивается, во-первых, тем, что PAMPs должны быть уникальными для микробов и отсутствовать в эукариотических клетках, во-вторых, PAMPs должны быть общими для широкого класса микробов, в-третьих, они необходимы для жизнедеятельности микроба и по этой причине не могут быть элиминированы путем генетических мутаций. Финалом PRR-распознавания является индукция сигналов, участвующих в активации адаптивной иммунной системы, и, как следствие, инициации антиинфекционного адаптивного иммунного ответа. Однако, в соответствии с результатами последних исследований, спектр PRR-лигандов расширился и стал включать в себя также распознавание эндогенных молекул, высвобождаемых из поврежденных или погибших клеток, называемых молекулярными паттернами, связанными с повреждением (damage-associated molecular pattern – DAMPs). Важно заметить, что при дезорганизации рыхлой волокнистой неоформленной соединительной ткани и при регулируемой клеточной гибели при ИВРЗ высвобождающиеся DAMPs имеют также все характеристики ауто-АГ, индуцирующие ауто-АГ-специфический адаптивный иммунный ответ.

Основные свойства PRR-рецепторов

Выделяют четыре основные подсемейства PRR-рецепторов:

- TLR-рецепторы, Toll-подобные трансмембранные белки;
- NLR-рецепторы, содержащие нуклеотид-связывающий домен олигомеризации (NOD) и богатые лейцином повторы (LRR);

– RLR-рецепторы, индуцируемый ретиновой кислотой ген I (RIG)-I-подобные рецепторы;

– CLR-рецепторы лектина C-типа.

Из них цитоплазматическими являются NOD- и RLR-рецепторы, которые связаны с субклеточными компартментами и эндосомальными мембранами. Также PRR, в частности TLR-рецепторы, могут быть и внеклеточными в секретируемых формах, присутствующими в кровотоке и интерстициальных жидкостях [74, 117]. В контексте настоящего обзора патогенетически наиболее важными при ИБПЗ являются TLR- и NLR-рецепторы.

TLR относят к I типу трансмембранных белков, состоящих из экстрацеллюлярных доменов, содержащих богатые лейцином повторы, ответственные за распознавание PAMPs; трансмембранных доменов; внутриклеточных доменов Toll-рецептора интерлейкина-1 (IL-1) (TIR), необходимые для последующей внутриклеточной передачи сигнала. К настоящему времени у людей идентифицировано 10 функционально активных TLR, причем каждый из них выполняет определенную функцию с точки зрения распознавания PAMPs и иммунных реакций [6].

К PAMPs, распознающихся TLR и выступающих в качестве «лигандов» для TLR, относят липиды, липопротеины, белки и нуклеиновые кислоты, полученные из широкого спектра бактерий, вирусов, паразитов и грибов. Распознавание PAMPs TLR-рецепторами определяется в различных внутриклеточных компартментах, включая плазмалемму, эндосомы, лизосомы, фаголизосомы, эндоплазматический ретикулум. Считается, что правильная клеточная локализация TLR важна для доступности лигандов, для поддержания толерантности к собственным молекулам, таким как нуклеиновые кислоты, а также для последующей внутриклеточной передачи сигнала [1].

TLR разделяют на две подгруппы в зависимости от их клеточной локализации и соответствующих PAMP-лигандов. Одна группа состоит из TLR1, TLR2, TLR4, TLR5 и TLR6, которые экспрессируются на поверхности клеток и распознают в основном компоненты микробных мембран, такие как липиды, липопротеины и белки. Другая группа состоит из TLR3, TLR7, TLR8 и TLR9, которые экспрессируются исключительно во внутриклеточных структурах, таких как эндоплазматический ретикулум (ER), эндосомы, лизосомы и эндолизосомы, где они распознают микробные нуклеиновые кислоты.

PRR-распознавание имеет важное качество, а именно – селективность. Наиболее информативные примеры селективности PAMP-TLR

взаимодействия следующие. TLR4 был идентифицирован как рецептор, взаимодействующий с бактериальным липополисахаридом (LPS), компонентом внешней мембраны грамотрицательных бактерий, который может вызвать септический шок. TLR2 участвует в распознавании более широкого спектра PAMPs. К ним относятся бактериальные липопептиды, пептидогликаны и липотейхоевые кислоты из грамположительных бактерий, липоарабиноманан из микобактерий, зимозан из грибов, гемагглютинин вируса кори и др. TLR2 способен формировать гетеродимеры с TLR1 или TLR6. В частности, гетеродимер TLR2-TLR1 распознает триацилированные липопептиды из грамотрицательных бактерий и микоплазмы, тогда как гетеродимер TLR2-TLR6 распознает диацилированные липопептиды из грамположительных бактерий и микоплазмы [53].

TLR5 распознает белковый компонент флагеллина бактериальных жгутиков. Интересно, что плазмацитоидные дендритные клетки (пДК) в *lamina propria* в тонком кишечнике, несущие фенотип CD11c⁺CD11b⁺, интенсивно экспрессируют TLR5. пДК *lamina propria* уникальны в смысле стимулирования дифференцировки IL-17-продуцирующих хелперных Т-клеток (Th17-клеток) и Т-хелперных клеток 1-го типа (Th1), а также дифференцировки наивных В-клеток в плазматические клетки, продуцирующие иммуноглобулин А в ответ на флагеллин [112].

Мышиный TLR11, близкий по структуре к TLR5, экспрессируется в эпителиальных клетках почек и мочевого пузыря. Считается, что TLR11 распознает уропатогенные бактериальные компоненты, поскольку мыши с дефицитом TLR11 восприимчивы к заражению этими бактериями [124].

Цитоплазматические TLR-рецепторы, называемые также как чувствительные к нуклеиновым кислотам, локализуются, о чем говорилось выше, в различных внутриклеточных структурах. Считается, что доставка интернализированных нуклеиновых кислот в эндолизосомы имеет решающее значение для взаимодействия с этими TLR. TLR3 первоначально был идентифицирован как рецептор, распознающий синтетический аналог двухцепочечной РНК (dsRNA), полиинозин-полицитидиловой кислоты (поли(I:C)), которая имитирует вирусную инфекцию и индуцирует противовирусные иммунные реакции, стимулируя выработку интерферона I типа (IFN I типа) и воспалительных цитокинов. TLR9 и TLR7 встречаются исключительно в эндоплазматическом ретикулуме в нестимулированных клетках и быстро транспортируются в эндолизосомы после стимуляции лигандом [54]. Лигандами для

этих рецепторов является ssRNA, полученная из РНК-вирусов, таких как вирус везикулярного стоматита, вирус гриппа А, HIV-вирус. После инфицирования клеток эти вирусы попадают в эндолизосомы, где запускается опосредованное TLR7 распознавание вирусных ssRNA и инициируются противовирусные иммунные реакции. Более того, TLR7 также распознает реплицирующийся вирус везикулярного стоматита, который проникает в цитоплазму посредством аутофагии и процесса лизосомальной деградации клеточных белков [63].

TLR9 распознает неметирированные 2'-дезоксирибозидин-фосфат-гуанозин (CpG) мотивы ДНК, которые часто присутствуют в бактериях и вирусах, но редко встречаются в клетках млекопитающих. Синтетический CpG олигонуклеотид функционирует как лиганд для TLR9 и непосредственно активирует дендритные клетки (ДК), макрофаги (Мф) и В-клетки и вызывает выраженный CD4⁺Th1-ответ. TLR9 в максимальной степени экспрессируется в пДК, где он служит датчиком ДНК-вирусной инфекции (цитомегаловируса, ВПГ-1 и ВПГ-2) [41].

TLR8 филогенетически наиболее похож на TLR7. Человеческий TLR8 опосредует распознавание вирусной ssRNA. TLR8 экспрессируется в различных тканях, причем его самая высокая экспрессия наблюдается в моноцитах и повышается после бактериальной инфекции.

PAMP-TLR взаимодействие сопровождается индукцией сигнального MyD88-зависимого пути который используется всеми TLR, кроме TLR3, и TRIF-зависимым путем, который используется TLR3 и TLR4. Адапторная молекула MyD88 активирует IL-1-рецептор-ассоциированные киназы (IRAK4, IRAK1, IRAK2) и митоген-активируемые киназы (MAPK). Эти киназы и TRAF6 индуцируют воспалительные реакции путем активации транскрипционных факторов NF-κB и IRF5, индуцирующие экспрессию генов, кодирующих IL-6, IL-12, TNF, IFN I типа. Важным элементом TLR-сигналов являются посттранскрипционные модификации белковых молекул, конформационное состояние сигнальных молекул и активация механизмов экспрессии генов-мишеней. Более подробно описание сигнальных путей при TLR-активации представлено в обзоре [53].

Другая группа PRR-рецепторов, имеющая ключевое значение в иммунопатогенезе ИБПЗ, — это цитоплазматические NLR-рецепторы. NLR представляют собой большое семейство PRR-рецепторов, которые реагируют на различные стимулы, в том числе на PAMPs, DAMPs, клеточные стрессорные белки. Из PAMPs наиболее значимыми являются пептидогликановые компоненты диаминопимелиновой кислоты (DAP)

из грамотрицательных и грамположительных бактерий, способствующие формированию, в частности, воспалительной инфламмосомы NLRP3. Идентифицировано 22 варианта NLR-рецепторов у людей, у которых генетические мутации ассоциированы в том числе и с ИБПЗ. Структура NLR-рецепторов в общем универсальна и включает в себя центральный NOD домен (домен олигомеризации), N-концевой гомотипический CARD домен, ответственный за межбелковые взаимодействия и C-концевые последовательности с лейцин-содержащими повторами (LRR). LRR является той частью NLR-рецепторов, которая связывается с соответствующим лигандом, включая PAMPs и DAMPs.

Функционально NLR-рецепторы делятся на две группы — формирующие и не формирующие воспалительные инфламмосомы [127].

К первой группе относят те NLR, которые формируют мультибелковые, цитоплазматические провоспалительные комплексы — инфламмосомы, активирующие воспалительную каспазу-1. Каспаза-1 необходима для процессинга и созревания воспалительных цитокинов IL-1β и IL-18 и индукции воспалительной формы клеточной гибели, называемой пироптозом, имеющей неоспоримое патогенетическое значение при ИБПЗ [3]. К таким вариантам NLR относят следующие инфламмосомы — NLRP1, NLRP3, NLRP6, NLRP7, NLRP12, NLRC4 и NAIP [44, 118].

Особую роль в передаче сигналов от DAMPs играет провоспалительная инфламмосома NLRP3. Инфламмосома NLRP3 содержит белок NLRP3, адаптерный белок ASC, домен рекрутирования каспазы — CARD-домен и цистеиновую протеазу — каспазу-1. Сборка NLRP3 инфламмосомы приводит к расщеплению каспазы-1 до ее активной формы, которая, в свою очередь, расщепляет предшественника про-IL-1β до зрелого IL-1β. Интересно, что IL-1β также классифицируется как DAMP, что делает NLRP3 инфламмосому одновременно и приемником, и источником DAMP. Активация NLRP3 инфламмосомы может происходить в ответ на воздействие ряда DAMPs, в частности в ответ на АТФ. Соответственно, внеклеточный АТФ активирует пуриnergический рецептор P2X7, присутствующий на поверхности клетки, вызывая отток калия из клетки. Отток калия, в свою очередь, опосредует сборку NLRP3 инфламмосомы. Мочевая кислота также может активировать NLRP3 инфламмосому [36].

Бигликан также может активировать NLRP3 инфламмосому путем кластеризации P2X7 с TLR2/4. Гистоны, высвобождаемые из некротических клеток, активируют NLRP3 инфламмосому независимо от P2X7 [7].

С учетом важной роли этой инфламмосомы в воспалении есть даже вариант этого процесса с названием «NLRP-3 воспаление».

К группе NLR-рецепторов, которые не формируют инфламмосомы, относят NOD1, NOD2, NLRP10, NLRX1, NLRC5 и СИТА. Эти NLR непосредственно не воздействуют на воспалительные каспазы, но активируют ядерный транскрипционный фактор NF-κB, митоген-активируемые протеинкиназы (MAPK) и регуляторные генетические факторы продукции IFN I типа. Указанные факторы обладают способностью выражено стимулировать врожденный иммунитет [93, 110].

NOD1 и NOD2 распознают продукты распада компонентов бактериальной клеточной стенки. Кроме того, эти рецепторы реагируют на двухцепочечную ДНК, полученную из патогенов, а также на фрагменты собственной ДНК с последующей индукцией IFN I типа [69].

Заметим, что фрагменты собственной ДНК при ИВРЗ могут выступать в качестве ауто-АГ. NOD2 индуцирует IFNβ опосредованный противовирусный иммунный ответ вследствие распознавания одноцепочечной вирусной РНК – респираторно-синцитиального вируса (RSV), вируса ветряночного стоматита (VSV) [93].

NOD1 и NOD2 кодируются генами *CARD4* и *CARD15*, соответственно, оба содержат общие NOD и LRR домены в дополнение к N-концевому гомотипическому CARD домену. Несмотря на сходство между этими двумя рецепторами, тем не менее между ними существуют различия: NOD1 содержит один CARD домен, в то время как NOD2 содержит два CARD домена; экспрессия NOD1 обнаруживается в широком спектре гистогенетически разных типов клеток, тогда как экспрессия NOD2 ограничена миелоидными клетками, кератиноцитами и эпителиальными клетками кишечника, легких и полости рта [110, 111].

TLR- и NLR-рецепторы функционально тесно взаимосвязаны. Показано, что NOD-2 усиливает сигнал с TLRs, действуя в синергии с TLRs и усиливая высвобождение провоспалительных цитокинов [31]. Также к рецепторам этого типа относят DAI (ZBP1-DLM1), который был идентифицирован как предполагаемый цитозольный сенсор для дцДНК и следствием подобного взаимодействия является также выработка IFN I типа [103].

Таким образом, NLR-РАМР взаимодействие можно отнести к одним из главных регуляторов врожденного иммунитета, обладающих способностью инициировать и поддерживать устойчивые иммунные реакции посредством образования инфламмосом и активации сигнальных путей

NF-κB, IRF и MAPK. Кроме этого, такие функции NLR-рецепторов, как усиление экспрессии аллелей МНС I и II класса на АПК, вовлекают их в адаптивные иммунные реакции.

Необходимо отметить, что все представленные выше свойства и функциональные особенности TLR- и NOD-рецепторов были изучены, прежде всего, в контексте антиинфекционного иммунитета. Однако эволюционное предназначение этого типа рецепторов врожденного иммунитета оказалось значительно шире. Выяснилось, что любое повреждение тканей, клеток, субклеточных структур активирует врожденную иммунную систему с последующей неинфекционной «стерильной» иммуновоспалительной реакцией и формированием сопутствующего клеточного воспалительного инфильтрата – КВИ [21].

Как отмечалось в предыдущем обзоре [2], в процессе ХПВ клеточный инфильтрат приобретает разные морфологически идентифицируемые формы. Организованными формами КВИ при ИВРЗ являются эктопические фолликулоподобные лимфоидные структуры (ELS) и ГЗТ-гранулемы, неорганизованными формами – диффузный клеточный воспалительный инфильтрат. Фолликулоподобные структуры и ГЗТ-гранулемы имеют морфо-функциональное сходство с периферическими органами иммунной системы – лимфатическими узлами, пейеровыми бляшками, селезенкой, что создает возможность индукции иммунного ответа на ауто-АГ в очаге воспаления (*locus morbi*). КВИ является динамичной структурой, отражающей этапность, рецидивирующее течение и исход ИВРЗ. Динамика состава КВИ является отражением конкретного этапа иммуновоспалительного процесса.

Важная составляющая описанных событий – это высвобождение из поврежденных клеток в процессе неинфекционного, «стерильного» воспаления DAMPs, во многих случаях являющихся также продуктами дезорганизации основного вещества рыхлой волокнистой неоформленной соединительной ткани. TLR- и NOD-рецепторы, экспрессирующиеся на АПК, обладают способностью взаимодействовать почти со всеми классами DAMPs с последующей индукцией аутовоспалительных и/или аутоиммунных процессов. Важно отметить, что TLR-DAMP взаимодействие индуцирует те же сигнальные пути, адапторные молекулы, транскрипционные факторы, формирует те же провоспалительные инфламмосомы, что и при TLR-РАМР взаимодействии. Результаты исследований молекулярно-клеточного базиса указанной аналогии и патофизиологических следствий этих процессов обусловили новый

этап развития фундаментальной и клинической иммунологии.

Более того, имеющиеся результаты многочисленных исследований свидетельствуют еще об одном крайне важном качестве функциональной активности PRR-рецепторов. Речь идет о TLR- и NLR-опосредованной модуляции регулируемой гибели клеток. При РГК закономерно высвобождаются внутриклеточные DAMPs, взаимодействующие с TLR- и NOD-рецепторами со всеми вытекающими из этого последствиями. Поскольку различные формы гибели клеток оказывают особое влияние на иммунные реакции, модуляцию процессов гибели клеток с помощью PRR-рецепторов можно считать еще одной важной особенностью врожденной иммунной системы [15].

Показано, что такие DAMPs, как внеклеточный АТФ, кристаллы мочевой кислот, ДНК, РНК взаимодействуют с NLR-рецепторами и индуцируют каспаза-1 зависимый пироптоз с последующим выбросом IL-1 β и IL-18 [13]. Некроптоз клеток макрофагально-моноцитарного ряда, в избытке находящихся в КВИ при ИВРЗ и выполняющих функции АПК *in situ*, индуцируется TLR-рецепторами, в частности TLR3 и TLR4 [43].

Хорошо изучен TNF-опосредованный апоптоз, а также некроптоз с последующей провоспалительной сигнализацией. Двухпочечная РНК (dsRNA), IFN γ , АТФ, освобождающиеся при из клеток при ишемии-реперфузии, вызывают некроз клеток с последующим выбросом внутриклеточных DAMPs [52]. Сборка провоспалительной NLRP3-инфламмосомы посредством цитоплазматических NLR-рецепторов приводит к активации каспазы-1, секреции IL-1 β , IL-18, IL-33 и индукции пироптоза [33].

Аутофагия принимает активное участие в эндосомально-лизосомальном пути деградации DAMP материала с последующей презентацией АГ в составе МНС II класса и индукцией адаптивного иммунного ответа. Также в процессе аутофагии реализуется феномен кросс-презентации [27].

Внеклеточные и цитозольные PRR экспрессируются не только на клетках иммунной системы. Они встречаются также на всех типах эпителиальных клеток, эндотелиоцитах, включая «высокие» эндотелиоциты 2-го типа, альвеолоцитах, гепатоцитах, на всех клетках крови, на фибробластах, тучных клетках, на большинстве клеток центральной нервной системы и др. Столь широкое представительство PRR-рецепторов определяет более широкую сферу их функционального предназначения, нежели выполнения ими только иммунологических функций. Конститутивная

экспрессия PRR-рецепторов охватывает широкий спектр гомеостатических процессов, включая клеточную дифференцировку, клеточную гибель, эмбриогенез, регенерацию, процессы фиброгенеза, ангиогенеза, отторжение аллотрансплантата [18, 60, 120].

Функциональная разнонаправленность PRR-рецепторов обеспечивается прежде всего такими свойствами этих рецепторов, как способность обеспечивать межклеточные контакты, являться непосредственным участником множества мембран-ассоциированных процессов, а также быть участниками ключевых внутриклеточных сигнальных путей, влияющих на экспрессию генов-мишеней. Напомним, что впервые идентифицированный TLR-рецептор – Toll-протеин у *Drosophila melanogaster* был ответственным за совершенно неиммунологическую функцию в эмбриональный период развития этой мушки, а именно – дорсально–вентральную дифференцировку.

Поэтому нет ничего удивительного в том, что взаимодействия TLR с DAMPs, выступающие в качестве лигандов для TLR и высвобождающиеся при дезорганизации рыхлой волокнистой неоформленной соединительной ткани и в процессах регулируемой гибели клеток при ИВРЗ, индуцируют все известные сигнальные внутриклеточные пути, конформационные изменения адапторных молекул, обязательную экспрессию генов провоспалительных цитокинов, необходимых для формирования КВИ. Некоторые представители DAMPs в этом случае приобретают свойства ауто-АГ с последующей индукцией аутореактивных Т-лимфоцитов и продукцией цитопатогенных ауто-АТ.

Функциональные особенности и виды DAMPs

Как упоминалось выше, модель С.А. Janeway, основывающаяся на конститутивной экспрессии PRR-рецепторов на клетках врожденной иммунной системы, взаимодействующих с высококонсервативными молекулярными структурами микроорганизмов – PAMPs и, как следствие, индуцирующих АГ-специфический адаптивный антиинфекционный иммунный ответ, по сути, сменила доминирующую до того времени модель дискриминации «я / не я» по F.M. Burnet (модель самораспознавания, или иммунного надзора). Однако оставалось множество нерешенных вопросов в сфере фундаментальной иммунологии, связанных, в частности, с реактивностью иммунной системы в отношении неинфекционных индукторов иммунного ответа и, прежде всего, продуктов любых форм гибели клеток и тканевой дезорганизации. Выход в 1994 г. публикации Polly Matzinger, названной “Tolerance, Danger, and the Extended Family” [71], коренным образом расширил представления о функциональном пред-

назначении PRR-рецепторов, их роли в поддержании иммунного гомеостаза и участии системы иммунитета в патогенезе многих заболеваний, в частности ИВРЗ. В цитируемой работе Polly Matzinger пишет: «Это эссе представляет собой описание клеточной толерантности, основанной на представлении о том, что движущей силой иммунной системы является необходимость распознавать опасность и предотвращать разрушение». Т. е. дискриминация «я/не я» по F.M. Burnet заменяется на распознавание опасности клеточно-разрушения.

Более того, предложенная Polly Matzinger «теория опасности» отвергала основные положения «иммунного надзора» по F.M. Burnet, поскольку отводила участие реактивности системы иммунитета в область динамического тканевого гомеостаза. Ткани организма по Polly Matzinger являются значительной частью того, что стимулирует иммунный ответ. Поврежденные ткани также определяют иммунный ответ, соответствующий этой ткани.

«Я предложила модель опасности, — пишет Polly Matzinger, — которая предполагает, что иммунная система больше озабочена повреждением, чем чужеродностью, и приводится в действие сигналами тревоги от поврежденных тканей, а не распознаванием не-я». И далее: «Поскольку клетки, умирающие в результате нормальных запрограммированных процессов, обычно очищаются до того, как они распадутся, в то время как клетки, которые умирают некротически, высвобождают свое содержимое и любой внутриклеточный продукт потенциально может быть сигналом опасности при высвобождении... Важной особенностью является то, что сигналы опасности/тревоги не должны подаваться здоровыми клетками или клетками, подвергающимися нормальной физиологической гибели» [70].

В настоящее время эти «сигналы опасности/тревоги» обозначаются как DAMPs, стимулирующие иммунный ответ через PRR-рецепторы. Иными словами, наш организм способен отличать «здоровый» гомеостаз тканей или встречи с чужеродными «дружественными» микроорганизмами от потенциальной «опасности», которая может исходить от патогенов и/или поврежденной ткани. DAMPs инициируют иммунную воспалительную реакцию, что позволяет АПК индуцировать адаптивный иммунный ответ.

PRR-рецепторы для эндогенных (DAMPs) и экзогенных инфекционных (PAMPs) сигналов могли эволюционировать одновременно. Известно, что эти рецепторы часто взаимодействуют с одними и теми же молекулами. Так, TLR4 является рецептором и для бактериального продукта липополисахарида (LPS) и для эндогенной

молекулы клеточного стресса Hsp70, HMGB1, а также внеклеточных продуктов распада гиалуроновой кислоты. TLR2 связывает бактериальные липопотеины и Hsp60. TLR9 связывается с последовательностями CpG ДНК, которые обнаруживаются на множестве клеток. Сенсоры нуклеиновых кислот — TLR7 и TLR9 могут активироваться как чужеродными, так и собственными нуклеиновыми кислотами [68].

Кроме того, NLRP3-инфламмосома индуцирует секрецию IL-1 β в ответ на такие DAMP, как АТФ или мочевая кислота, эта же NLRP3-инфламмосома продуцирует IL-1 β при инфицировании вирусами, грибами и бактериями [98].

Поскольку воспалительные реакции, инициируемые DAMPs, не зависят от патогенной инфекции, их называют «стерильным» воспалением [21].

На рисунке 1 представлены иммунные и неиммунные клетки, участвующие в PRR-распознавании при «стерильном» воспалении с соответствующими патофизиологическими следствиями. Нарушения представленных на этой иллюстрации функциональных свойств этих клеток лежат в основе иммунопатогенеза ИВРЗ (более подробно см. ниже).

Как видно из рисунка 1, DAMPs, связанные с повреждением клеток при «стерильном» воспалении, инициируют системные аутовоспалительные и аутоиммунные процессы посредством активации различных типов клеток.

А — моноциты/макрофаги, дендритные клетки (ДК), нейтрофилы, тучные клетки, естественные киллеры (NK) и эозинофилы — все они экспрессируют PRR-рецепторы. После взаимодействия с DAMPs эти клетки могут высвобождать провоспалительные медиаторы, которые, в свою очередь, приводят к мобилизации воспалительных клеток и активации адаптивных иммунных реакций. Макрофаги, ДК и нейтрофилы являются профессиональными фагоцитами, которые способны презентировать Т-клеткам пептиды, полученные из DAMP. Активированные DAMPs NK-клетки и эозинофилы могут проявлять цитотоксические эффекты, приводящие к разрушению клеток-мишеней.

Б — несколько типов неиммунных клеток, таких как эпителиальные клетки, эндотелиальные клетки и фибробласты, также экспрессируют PRR-рецепторы и могут быть активированы DAMPs. Активированные DAMPs эпителиальные клетки могут влиять на реакцию врожденных и адаптивных иммунных клеток посредством высвобождения цитокинов и хемокинов, а также посредством экспрессии МНС I и II класса и костимулирующих молекул. Во время «стерильного» воспаления эндотелиальные клетки могут

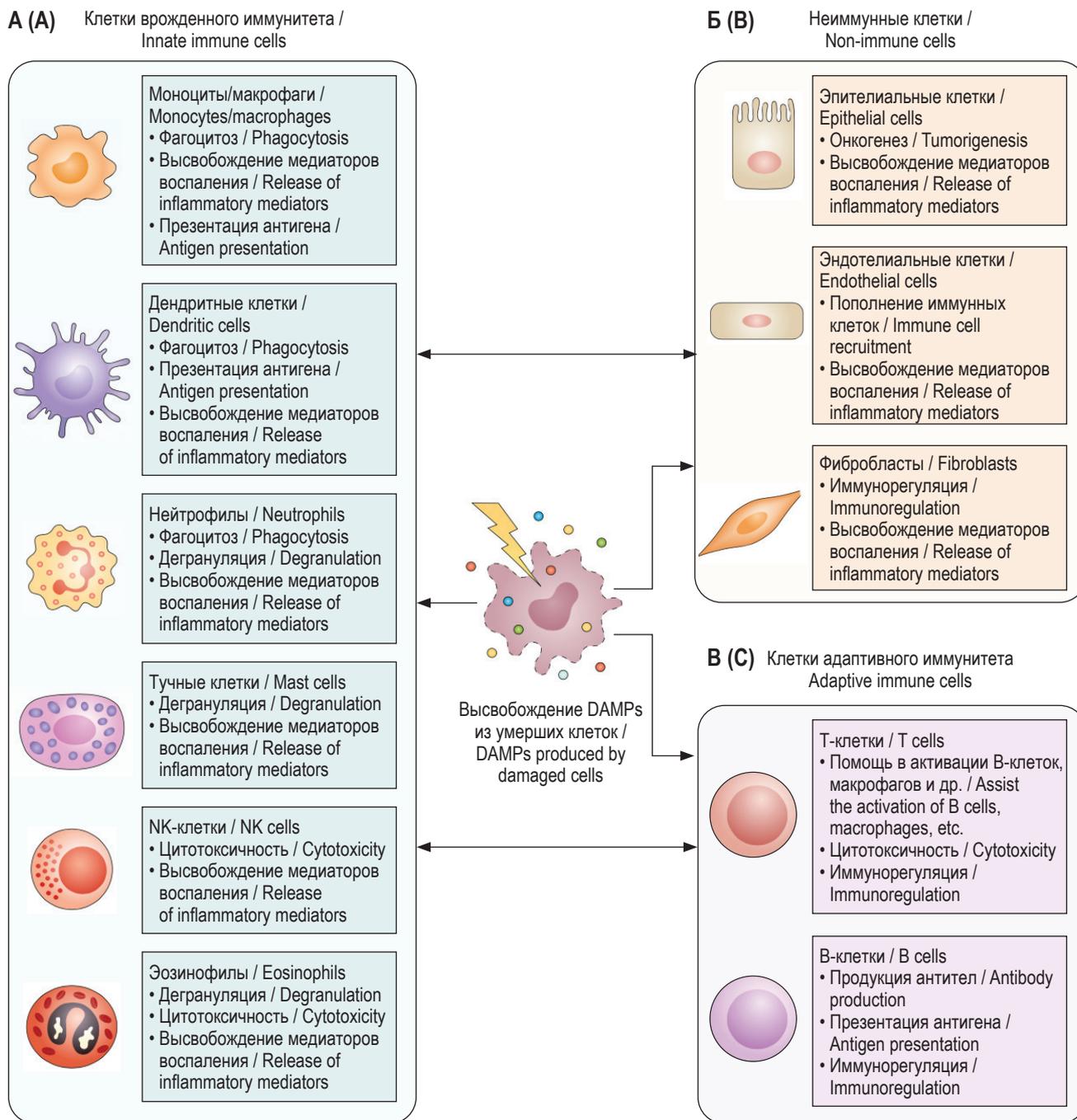


Рисунок 1. Клетки, экспрессирующие PRR-рецепторы, взаимодействующие с DAMPs и участвующие в «стерильном» воспалении, по материалам [37]

Figure 1. Cells expressing PRR receptors interacting with DAMPs and participating in “sterile” inflammation, according to materials [37]

способствовать привлечению иммунных клеток в поврежденную ткань посредством выработки провоспалительных цитокинов, экспрессии молекул адгезии и изменения проницаемости сосудов. Фибробласты могут регулировать функцию врожденных и адаптивных иммунных клеток по-

средством выработки провоспалительных цитокинов, хемокинов и факторов роста.

В – DAMPs также могут непосредственно стимулировать адаптивные иммунные клетки, регулируя их активацию, миграцию и дифференцировку.

Таким образом, подобно воспалению, вызванному инфекционными патогенами, DAMPs при «стерильном» воспалении могут активировать клетки врожденного иммунитета (нейтрофилы, макрофаги дендритные клетки) и неиммунные клетки (эпителиальные клетки, эндотелиальные клетки, фибробласты). Активация этих клеток приводит к выработке различных цитокинов и хемокинов, которые, в свою очередь, мобилизуют воспалительные клетки и активируют адаптивные иммунные ответы. Кроме того, некоторые DAMPs также могут непосредственно активировать клетки адаптивной иммунной системы. Все указанные процессы являются патогенетически значимыми при ИВРЗ [92].

Общей особенностью DAMPs является то, что они являются эндогенными факторами, которые изолированы внутриклеточной средой и поэтому скрыты от распознавания иммунной системой в нормальных физиологических условиях. Однако при клеточном стрессе или повреждении клеток эти молекулы высвобождаются во внеклеточную среду и индуцируют неинфекционное «стерильное» воспаление. Форма гибели клеток влияет на их способность высвобождать иммуностимулирующие DAMPs и их иммуногенность. Так, некроз обычно возникает в условиях сильного повреждения (например, ишемии или травмы), однако в таких условиях апоптоз не индуцируется. Важным следствием некротической гибели клеток является потеря целостности плазмалеммы, что позволяет внутриклеточному материалу выходить из клетки. К внутриклеточным DAMPs, полученным из некротических клеток, относят ассоциированный с хроматином высокомолекулярный негистоновый, ядерный белок группы box 1 (HMGB1), белки теплового шока (HSP), пуриновые метаболиты, такие как АТФ и мочевая кислота. Все перечисленные соединения обладают способностью взаимодействовать с TLR-рецепторами [16, 55, 88, 95].

Замечательной чертой этого взаимодействия является то, что, несмотря на структурную гетерогенность DAMPs, они обладают общей способностью связывать и активировать одни и те же PRR-рецепторы, такие как, например, TLR2 и TLR4, для запуска иммунного ответа. Иммунная сигнализация, опосредованная TLR-DAMP-взаимодействием, увеличивается за счет поверхностных молекул, в частности CD14 и CD36, с последующей активацией всех внутриклеточных сигнальных путей. В отличие от PAMPs, вышеуказанные DAMPs обладают уникальной способностью взаимодействовать с двумя TLR, часто с TLR2 и с TLR4, которые чувствительны как к грамположительным, так и к грамотрицательным патогенам. Аффинное связывание таких внекле-

точных DAMPs, как бигликан и декорин (см. ниже) с TLR4, сопоставимо с взаимодействием этого же рецептора с LPS. Этот факт подчеркивает, насколько мощными индукторами воспаления являются DAMP, что подтверждается клинической картиной ИВРЗ.

Внеклеточные DAMPs

Внеклеточные DAMPs высвобождаются в результате деградации внеклеточного матрикса во время повреждения тканей, в частности рыхлой волокнистой неоформленной соединительной ткани. При этом фрагменты внеклеточного матрикса, такие как гиалуроновая кислота, гепарансульфат и бигликаны, образуются в результате протеолиза ферментами, высвобождаемыми из умирающих клеток, или протеазами, активируемыми в процессе регенерации и ремоделирования тканей [10, 96].

Внеклеточные, растворимые, DAMPs вовлекают множественные PRR-рецепторы, инициируя быструю воспалительную реакцию. Активированные IL-1 α и IL-33 ДК и Мф начинают de novo синтез дополнительных растворимых DAMPs, пополняя тем самым пул внеклеточных DAMPs. Одновременно ряд молекул, которые в нормальных условиях являются изолированными компонентами экстрацеллюлярного матрикса, могут быть протеолитически высвобождены после повреждения ткани и затем действовать в своей растворимой форме в качестве DAMPs [97].

Молекулярный состав внеклеточных DAMPs довольно неоднороден, начиная от небольших молекул мочевой кислоты или АТФ до крупных белков размером более 100 кДа и даже органелл. В свою очередь, это большое структурное разнообразие позволяет DAMPs обеспечивать перекрестную реактивность между PRR-рецепторами и широким спектром «неиммунных» рецепторов, что, в конечном итоге, влияет на сложность передачи сигналов DAMP [35].

В таблице 1 представлены патогенетически значимые при ИВРЗ внеклеточные DAMPs и взаимодействующие с ними PRR-рецепторы.

Необходимо обратить внимание, что все представленные в таблице 1 DAMPs входят в состав внеклеточного матрикса рыхлой волокнистой неоформленной соединительной ткани, т. е. того плацдарма, где развивается системный иммуновоспалительный процесс при ИВРЗ.

Протеогликаны (PGs) являются наиболее хорошо охарактеризованными DAMPs полученными из экстрацеллюлярного матрикса. В структуре PGs гликозаминогликановые боковые цепи способны взаимодействовать с различными PRR-рецепторами и управлять их перекрестной реактивностью. Активность матриксных металлопротеиназ MMP-2, MMP-3, MMP-13

и гранзима В обеспечивает высвобождение из экстрацеллюлярного матрикса протеогликанов, бигликанов, декорина, хондроитин/дерматан-сульфата, выступающих при ИВРЗ в качестве лигандов для TLR2 и TLR4. Таким образом, экстрацеллюлярный матрикс при ИВРЗ служит источником DAMPs, на которые система врожденного иммунитета активно реагирует посредством PRR-рецепторов [79].

Внутриклеточные DAMPs

Помимо экстрацеллюлярных DAMPs существует обширная и разнородная группа внутриклеточных молекул опасности. Гибель клеток вследствие случайного некроза или в случаях регулируемых форм гибели клеток – аутофагии, апоптоза, некроптоза, пироптоза и нетоза сопровождается высвобождением эндогенных молекул из различных компартментов или органелл кле-

ТАБЛИЦА 1. ВНЕКЛЕТОЧНЫЕ DAMPs, МЕХАНИЗМ ИХ ВЫСВОБОЖДЕНИЯ И ВЗАИМОДЕЙСТВУЮЩИЕ С НИМИ PRR-РЕЦЕПТОРЫ

TABLE 1. EXTRACELLULAR DAMPs, THEIR RELEASE MECHANISM AND PRR RECEPTORS INTERACTING WITH THEM

DAMPs	Механизм высвобождения Release mechanism	Биохимическая принадлежность Biochemical affiliation	Рецепторы Receptors	Ссылки Links
Бигликан Biglican	Протеолиз матриксными протеиназами, синтез <i>de novo</i> Proteolysis by matrix proteinases, <i>de novo</i> synthesis	Протеогликаны Proteoglycans	TLR2, TLR4, NLRP3	97
Декорин Decorin	Протеолиз матриксными протеиназами, синтез <i>de novo</i> Proteolysis by matrix proteinases, <i>de novo</i> synthesis	Протеогликаны Proteoglycans	TLR2, TLR4	76
Версикан Versikan	Секреция Secretion	Протеогликаны Proteoglycans	TLR2, TLR6, CD14	96
LMW гиалуронан LMW hyaluronan	Протеолиз гиалуронидазами Proteolysis by hyaluronidases	Глюкозаминогликаны Glucosaminoglycans	TLR2, TLR4, NLRP3	51
Гепаран сульфат Heparan Sulfate	Расщепление гепараназой Cleavage by heparinase	Глюкозаминогликаны Glucosaminoglycans	TLR4	38
Фибронектин-FDA ⁺ Fibronectin-FDA ⁺	Протеолиз матриксными протеиназами Proteolysis by matrix proteinases	Гликопротеин Glycoprotein	TLR4	51
Фибриноген Fibrinogen	Выход из сосудистого русла Exit from the vascular bed	Гликопротеин Glycoprotein	TLR4	102
Тенасцин С Tenascin C	Синтез <i>de novo</i> Synthesis <i>de novo</i>	Гликопротеин Glycoprotein	TLR4	77

ток, которые могут действовать как DAMPs. Эта группа DAMPs более обширна. В таблице 2 представлены основные внутриклеточные DAMPs, имеющие патогенетическое значение при ИВРЗ.

Как видно из таблицы 2, внутриклеточные DAMPs включают в себя биоорганические соединения цитозоля, ядра, клеточных мембран и органелл, обеспечивающих базисные основы жизнедеятельности клетки и высвобождающиеся при ее повреждении. Представленные соединения по химическому составу и по функциональным особенностям отличаются от внеклеточных DAMPs. Спектр реагирующих на них PRR-рецепторов более широкий. Помимо «традиционных» TLR2 и TLR4 он включает в себя TLR9, RAGE-рецептор, IL-1R, молекулы LRP3, CD91, а также цитозольный NLR-рецептор – NLRP3, участвующий в формировании провоспалительной NLRP3-инфламмосомы. Увеличение количества реактогенных PRR-рецепторов и перечня внутриклеточных DAMPs означает расширение патологических следствий PRR-DAMP взаимодействий при ИВРЗ на этапах воспалительного процесса, связанных с разрушением клеток.

С учетом активного участия внутриклеточных DAMPs в патогенезе ИВРЗ, ниже представлены их основные характеристики.

Митохондриальные DAMPs

В процессе некроза клеток, а также в процессах регулируемой клеточной гибели – аутофагии, апоптоза, некроптоза, пироптоза и нетоза митохондрии являются основными органеллами, которые выделяют различные DAMPs (см. табл. 2 и рис. 1). Более того, митохондрии являются единственными органеллами, которые сами по себе действуют как DAMP после высвобождения во время некроптоза. Митохондрии, выделившись из некротических клеток, фагоцитируются макрофагами и индуцируют выработку провоспалительных цитокинов – IFN I типа, IL-1 β , TNF α [66].

При нарушении целостности митохондрии могут высвобождать в кровотоке различные внутримитохондриальные компоненты, такие как мтДНК, мтРНК, формилированные пептиды, АТФ и цитохром-с, которые распознаются упомянутыми выше PRR-рецепторами, обеспечивая PRR-DAMP взаимодействие [126]. мтДНК также опосредует воспалительные реакции во внутриклеточном пространстве посредством активации инфламмосом. В этих процессах принимают участие NLRP3 и AIM2 инфламмосомы, вовлеченные во взаимодействие с мтДНК [39].

Ядерные DAMPs

Транслокация различных ядерных молекул, таких как HMGB1, гистоны или ДНК, является еще одним механизмом формирования вну-

триклеточных DAMPs во время воспаления или гибели клеток. HMGB1 представляет собой высокомолекулярный ядерный негистоновый ДНК-связывающий белок, который также может транслоцироваться в цитоплазму и затем высвобождаться внеклеточно посредством везикулярного экзоцитоза [87].

HMGB1 может продуцироваться не только активированными моноцитами и макрофагами, но также некротическими или поврежденными фибробластами пассивным способом или при апоптозе [95].

HMGB1 также обнаружен в микрочастицах, полученных из апоптотических клеток HeLa и Jurkat [14].

HMGB-1 взаимодействует с TLR2- и TLR4-рецепторами, а также с рецептором для конечных продуктов расширенного гликирования – RAGE-рецептором. При РА наблюдается увеличение синовиальных макрофагов в синовиальной ткани, экспрессирующих TLR2 и TLR4 [45].

Интересно, что гипоксия, присутствующая в воспаленных суставах при РА, вызывает внеклеточное высвобождение HMGB-1, которое было гораздо более заметным, чем высвобождение просто в результате некроза клеток [42].

Уровни HMGB-1 в сыворотке крови у пациентов с РА коррелируют с активностью заболевания. Показано, что провоспалительный цитокин TNF α способствует транслокации HMGB-1 из ядра в цитоплазму. Также было показано, что HMGB-1 способствует ангиогенезу, что облегчает попадание лимфоцитов в воспаленный сустав.

При СКВ ДНК-хроматиновые комплексы содержат HMGB-1, который необходим для активации ДК и В-клеток посредством TLR9-зависимой передачи сигналов и с последующей продукцией IFN I типа [108].

Гистоны – это ядерные белки, участвующие в образовании хроматина и хромосом на основе двухцепочечной ДНК. Высвобождающиеся при воспалении, а также в процессах нетоза, апоптоза и некроза, гистоны выступают в качестве патогенетически значимых при ИВРЗ внутриклеточных DAMPs [121].

Цитозольные DAMPs

К ним относится мочевая кислота, которая является одним из основных эндогенных DAMPs. Она конститутивно присутствует во всех клетках, но ее уровни повышаются после повреждения клеток [55].

Это конечный продукт распада пуриновых нуклеотидов. Погибающие клетки выделяют внеклеточно мочевую кислоту, которая затем способна вызывать иммунные реакции, такие как индукция созревания ДК и усиление цитотокси-

ТАБЛИЦА 2. ВНУТРИКЛЕТОЧНЫЕ DAMPs, МЕХАНИЗМ ИХ ВЫСВОБОЖДЕНИЯ ИЗ КЛЕТКИ И ВЗАИМОДЕЙСТВУЮЩИЕ С НИМИ PRR-РЕЦЕПТОРЫ

TABLE 2. INTRACELLULAR DAMPs, THE MECHANISM OF THEIR RELEASE FROM THE CELL AND THE PRR RECEPTORS INTERACTING WITH THEM

Клеточные компартменты / органеллы Cell compartments / organelles	DAMPs	Механизм высвобождения Release mechanism	Биохимическая принадлежность Biochemical affiliation	Рецепторы Receptors	Ссылки Links
Цитозоль Cytosol	Мочевая кислота, S100 белок, белки теплового шока (HSP) Uric acid, S100 protein, Heat Shock Proteins (HSP)	Ультрафиолетовое облучение, вирусная инфекция и ЛПС-стимуляция макрофагов / моноцитов, апоптоз, некроз эпителиальных клеток Ultraviolet irradiation, viral infection and LPS-stimulation of macrophages / monocytes, apoptosis, necrosis of epithelial cells	Пуриновые нуклеотиды, Са ²⁺ -связывающий белок, шапероны Purine nucleotides, Са ²⁺ binding protein, chaperones	NLRP3, TLR2, TLR4, RAGE, TLR2, TLR4	101
Плазмалемма Plasmalemma	Синдеканы, глипиканы Syndecans, glypicans	Расщепление гепараназой и металлопротеиназами Cleavage by heparanase and metalloproteinases	Протеогликаны Proteoglycans	TLR4, TLR4.	11
Митохондрии Mitochondria	Митохондриальная ДНК, формилпептиды, АТФ, интактные митохондрии Mitochondrial DNA, formyl Peptides, ATP, intact mitochondria	Повреждение клетки, TNF α -индуцированный некроптоз Cell damage, TNF α -induced necroptosis	Нуклеиновые кислоты, продукты расщепления митохондриальных белков, нуклеозид-трифосфаты, органеллы Nucleic acids, breakdown products of mitochondrial proteins, nucleoside triphosphates, organelles	TLR9 NLRP3	126
Ядро Nucleus	HMGB1, гистоны, ДНК HMGB1, histones, DNA	Клетки, подвергшиеся некрозу, апоптозу, некроптозу Cells that have undergone necrosis, apoptosis, necrosis	ДНК ядра Nucleus DNA	TLR2, TLR4, TLR9, RAGE, NAIM2, LRP3	95
Эндоплазматический ретикулум Endoplasmic reticulum	Кальретикулин Calreticulin	Апоптоз, индуцированный γ -радиацией Induced apoptosis by γ -radiation	Белки эндоплазматического ретикулума Proteins of the endoplasmic reticulum	CD91	86
Аутофагосомы Autophagosomes	HMGB1, АТФ, IL-1 β HMGB1, ATP, IL-1 β	Аутофагия, клеточный голод Autophagy, cellular hunger	Белки, нуклеозид-трифосфаты, цитокины Proteins, Nucleoside triphosphates, Cytokines	TLR2, TLR4, TLR9, RAGE, IL-1R	29

ческой активности CD8⁺T-клеток, что является патогенетически значимым при подагре.

Ca²⁺-связывающие белки S100A8 и S100A9 широко вовлечены в индукцию воспаления и фиброза. Они действуют как DAMPs после высвобождения из фагоцитов, реагирующих на клеточный стресс. Показано, что эти белки высвобождаются моноцитами человека после активации протеинкиназы C [32].

Белки теплового шока (HSP) представляют собой класс белков, которые обычно играют роль шаперонов и помогают биосинтетическому механизму в правильном сворачивании белков. Однако HSP могут также действовать как DAMPs, взаимодействуя с TLR-рецепторами после высвобождения из внутриклеточного пространства. HSP обычно высвобождаются из погибающих клеток после апоптоза, некроза, а также при клеточном стрессе (рис. 1) [115].

Рецептор для конечных продуктов расширенного гликирования (RAGE)

Одним из наиболее хорошо изученных рецепторов DAMPs является RAGE. Этот рецептор не относится к группе PRR-рецепторов. Он имеет три части: внеклеточную часть, которая отвечает за взаимодействие с лигандом через свой V-домен, трансмембранный домен для прикрепления белка к поверхности клетки и цитоплазматический домен, который отвечает за нисходящую внутриклеточную сигнализацию. RAGE также может существовать в усеченных формах после альтернативного сплайсинга или обработки протеазой. В отсутствие своего V-домена он не может связывать лиганды, тогда как в отсутствие трансмембранного домена он становится растворимым и может связывать лиганды, действуя как рецептор-приманка, предотвращая их связывание и активируя зрелый RAGE. RAGE изначально был идентифицирован как рецептор для конечных продуктов расширенного гликирования (AGEs). Однако позже было показано, что он служит рецептором для ряда DAMPs, включая HMGB, белки S100 и белок, связанный с амилоидом. Важной особенностью RAGE является то, что, несмотря на структурное разнообразие лигандов RAGE, его активация приводит к общему пути: активации транскрипционного фактора NF-κB, продукции TGF-α и пролиферации клеток. Помимо клеток системы иммунитета этот рецептор экспрессируется на альвеолоцитах, миоцитах, эндотелиоцитах, эмбриональных клетках, клетках глии [4, 65].

Сывороточный амилоид А (SAA) представляет собой белок острой фазы воспаления, продуцируемый гепатоцитами. SAA причислен к DAMP на основании того, что он связывает TLR2 и индуцирует воспалительные сигналы [24].

Отметим, что фибробласты кожи пациентов с системной склеродермией (СС) имели более высокие уровни TLR2 по сравнению со здоровыми контрольными фибробластами кожи и были более чувствительны к SAA. Иными словами, SAA является патогенетически важной молекулой при СС вследствие TLR2-опосредованной индукции провоспалительных цитокинов. Уровень SAA также повышен при РА. Показано, что он индуцирует протеолитические ферменты в синовиальных фибробластах РА, которые опосредуют разрушение сустава и усиливают эффекты миграции клеток, облегчаемые поверхностными интегринами. Кроме этого, SAA индуцирует мобилизацию лейкоцитов в очаг воспаления и стимулирует ангиогенез [26].

Высвобождение DAMPs, связанное с аутофагией, пироптозом и некроптозом

При регулируемой гибели клеток могут высвободиться различные DAMPs. В частности, показано опосредованной аутофагией высвобождение HMGB1, АТФ, IL-1β и ДНК, при этом HMGB1 локализуется в аутофагосомах до его высвобождения из клеток (табл. 2 и рис. 1). Эпителиальные клетки, подвергшиеся пироптозу также высвобождают HMGB1. При некроптозе и аутофагии АТФ высвобождается из клеток, активирует провоспалительную инфламмасому NLRP3, что приводит к поглощению умерших клеток макрофагами [8].

IL-1β представляет собой DAMP, который может активно секретироваться клетками в ответ либо на PAMPs, либо на другие DAMPs, но он также может пассивно высвободиться клетками, подвергшимися некрозу или пироптозу [41]. Заметим, что аутофагия является фактором, могущим также и ограничить высвобождение IL-1β [125].

На рисунке 2 представлена наглядная иллюстрация динамики внутриклеточных и внеклеточных DAMPs, имеющих патогенетическое значение при ИВРЗ

На рисунке 2 представлена модель, согласно которой вне- и внутриклеточные DAMPs активируют TLR- и NLR-рецепторы, причем последние формируют провоспалительную NLRP3-инфламмасому. После регулируемой гибели клетки или после клеточного некроза различные внутриклеточные DAMP высвобождаются из митохондрий, аутофагосом, ядра и цитозоля. В свою очередь, HMGB1, гистоны, HSP и белки S100 взаимодействуют с TLR-рецепторами клеточной поверхности. мтДНК активирует внутриклеточные TLR-рецепторы после эндоцитоза. Кроме того, гистоны и мочевая кислота активируют NLRP3-инфламмасому после фагоцитоза, тогда как АТФ активирует инфламмасому P2X7-зависимым об-

разом. Кроме этого, при повреждении ткани высвобождаются внеклеточные DAMPs, вследствие активности различных протеиназ (в основном, MMP). Таким образом, такие компоненты внеклеточного матрикса, как SLRPs (бигликаны, декорин), гиалуронан (HA) и гепаран сульфат (HS) обеспечивают взаимодействие TLR-рецепторов клеточной поверхности с указанными DAMPs. Кроме того, бигликан может активировать инфламмасому через рецептор P2X₇. Однако HA интернализуется CD44-зависимым образом и после фрагментации на HA-олигосахариды активирует NLRP3-инфламмасому.

Необходимо еще раз отметить, что все указанные DAMPs являются продуктами дезорганизации рыхлой волокнистой неоформленной соединительной ткани и регулируемой клеточной гибели при ИВРЗ. Эти продукты приобретают все характеристики ауто-АГ, активирующие про-

воспалительные механизмы врожденного и адаптивного иммунитета, являющиеся патогенетическим базисом ИВРЗ.

DAMPs-опосредованная гибель клеток и врожденный иммунитет при иммуновоспалительных ревматических заболеваниях

В предыдущем обзоре [3] было сказано, что регулируемые формы гибели клеток, из которых наиболее значимыми при ИВРЗ являются аутофагия, апоптоз, некроптоз, пироптоз и нетоз, являются важным звеном патогенетической динамики КВИ. Не менее важным является случайная форма гибели клеток в виде некроза. При этом организованными формами клеточного инфильтрата являются эктопические фолликулоподобные лимфоидные структуры и ГЗТ-гранулемы, неорганизованными формами – диффузный клеточный воспалительный инфильтрат. Высвобождающиеся в процессе РГК

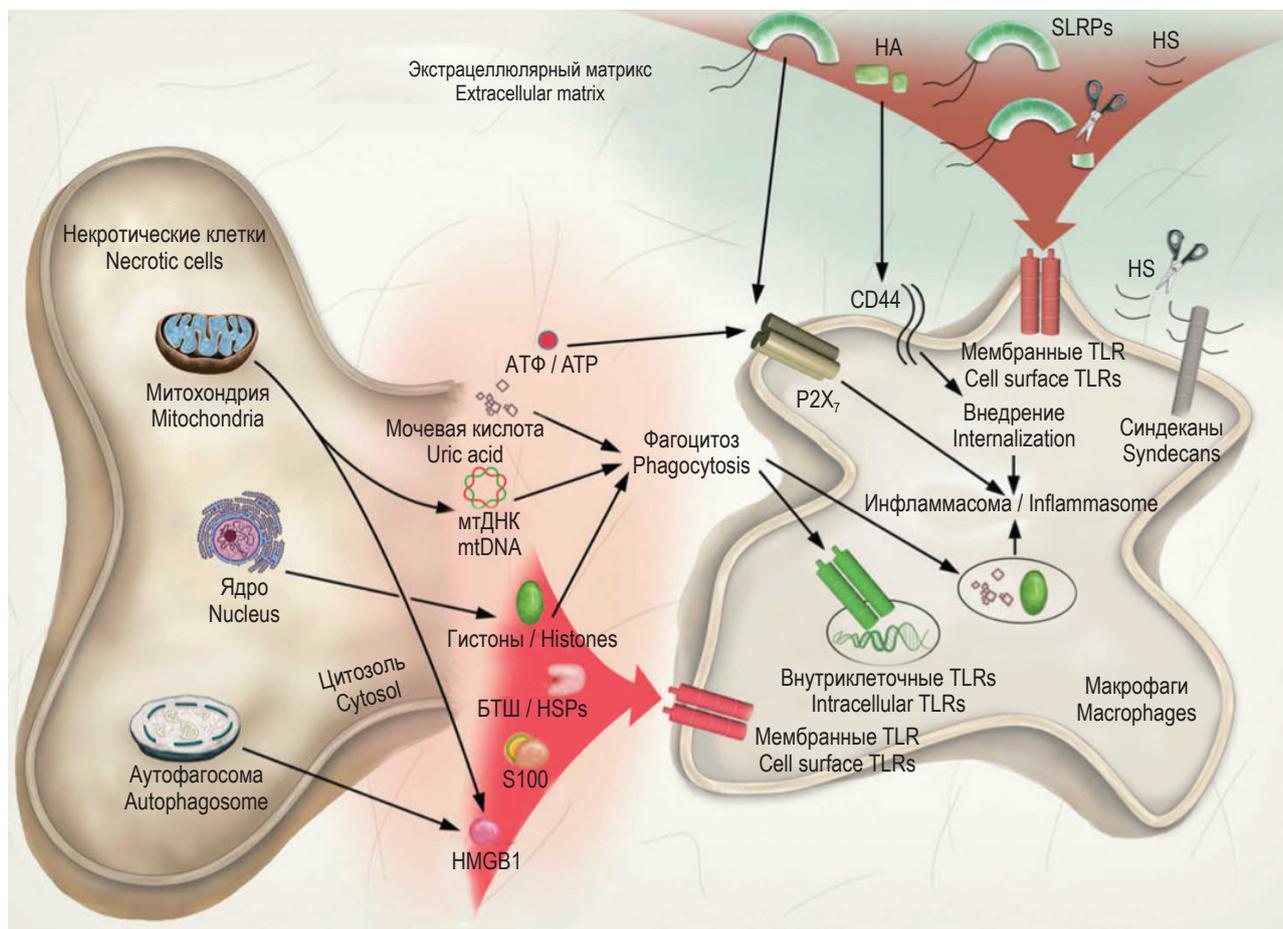


Рисунок 2. Модель PRR-DAMPs взаимодействий, в которой источником вне- и внутриклеточных DAMPs являются экстрацеллюлярный матрикс рыхлой волокнистой неоформленной соединительной ткани, цитозоль, плазмалемма и клеточные органеллы, по материалам [96]

Figure 2. Model of PRR-DAMPs interactions in which extracellular matrix of loose fibrous unformed connective tissue, cytosol, plasmalemma and cellular organelles are the source of extracellular and intracellular DAMPs, based on materials [96]

и некроза DAMPs индуцируют неинфекционное «стерильное» воспаление, сопряженное с иммунной аутореактивностью и развитием аутовоспалительных и аутоиммунных процессов. Подчеркнем, что иницилирующая роль в развитии «стерильного» воспаления принадлежит врожденному иммунитету.

При этом происходит крайне важное явление. Речь идет о том, что в условиях продуктивного «стерильного» воспаления *in situ* высвободившиеся DAMPs реализуют еще одно свое функциональное свойство, а именно: способность модулировать гибель клеток хозяина посредством взаимодействия с их PRR-рецепторами. Это взаимодействие, в свою очередь, сопровождается индукцией указанных форм регулируемой и случайной гибели клеток с последующей активацией множественных провоспалительных сигналов, способствующих прогрессированию воспалительного процесса. Возникает порочный круг, когда высвободившиеся в процессе «стерильного» воспаления DAMPs становятся причиной гибели клеток в составе КВИ посредством DAMP-PRR взаимодействия. В свою очередь, эта гибель клеток становится источником эндогенных DAMPs, что еще более усиливает воспалительный процесс. Поскольку различные формы гибели клеток оказывают особое влияние на иммунные реакции, модуляцию процессов гибели клеток с помощью PRR-рецепторов можно считать еще одним важным свойством врожденной иммунной системы.

С учетом важной роли DAMPs в патогенезе «стерильного» воспаления предпринимались усилия по классификации DAMPs. Одна из них, представленная выше, предусматривала деление DAMPs на два класса, в зависимости от источника их происхождения – внеклеточные и внутриклеточные. Однако, с учетом способности DAMPs влиять на клеточную гибель посредством взаимодействия с PRR-рецепторами клеток врожденного иммунитета и модификации этих молекул при патологических процессах, появилась необходимость дополнительного разделения DAMPs на конститутивные DAMPs (сDAMP) и индуцируемые DAMPs (iDAMPs) [128].

К сDAMP принадлежат конститутивно экспрессируемые эндогенные молекулы, которые высвобождаются при некрозе клеток и которые не модифицируются во время их гибели. сDAMP локализируются в ядре, митохондриях и цитозоле и невидимы для сенсоров иммунной системы. К ним относят АТФ, НМGB1, кристаллы мочевой кислоты, гистоны. Также к сDAMP относят структурные компоненты рыхлой волокнистой неоформленной соединительной ткани – гиалуронан, коллаген, ламинин, и эластин. сDAMP

взаимодействуют PRR-рецепторами на ДК, обеспечивая в том числе и миграцию ДК в дренирующие лимфатические узлы [106].

К iDAMPs относятся внутриклеточные эндогенные молекулы, высвобождающиеся при некроптозе, пироптозе и нетозе клеток. iDAMPs генерируются в результате «неотранскрипции, неотрансляции и посттрансляционных модификаций», возникновение которых напрямую зависит от задействованного пути гибели клеток. Примером посттрансляционной модификации iDAMPs является генерирование IL-1 β и IL-18 из их предшественников, опосредованной активностью провоспалительных каспазы-1 или каспазы-11, которое происходит в процессе пироптоза [17].

К важнейшим представителям iDAMPs относят IFN I типа. iDAMPs отражают различные пути клеточного стресса (белки теплового шока – HSP), которые задействованы во время повреждения тканей, и они могут быть презентированы АПК в качестве ауто-АГ. Напротив, сDAMP (из-за их конститутивной природы) не отражают разнообразие путей гибели клеток, поскольку выделяются только при некрозе клеток [122].

«Стерильное» воспаление и последующее восстановление тканей зависят от хорошо организованной последовательности миграции лейкоцитов к месту воспаления, где формируется КВИ. При этом любая жизнеспособная клетка может реагировать на выделяющиеся в процессе воспаления DAMPs. Как указывалось выше, практически любая клетка, имеющая разное гистогенетическое происхождение, экспрессирует те или иные PRR-рецепторы.

На этом фоне определяются новые функциональные особенности DAMPs. Речь идет о способности DAMPs формировать градиент концентрации, в частности в основном веществе рыхлой волокнистой неоформленной соединительной ткани. Трансэндотелиальная миграция нейтрофилов в интерстициальное пространство осуществляется благодаря градиенту концентрации таких DAMPs, как N-формильные пептиды, митохондриальная ДНК (мтДНК) и АТФ. При этом нейтрофилы используют свои рецепторы к формильному пептиду, связанному с G-белком, а также рецепторы P2 (P2Rs) и TLR9. Хемотаксис вдоль этого DAMPs-градиента получил название некротаксис. Таким образом, при ИВРЗ некротаксис является еще одним патогенетически важным механизмом формирования КВИ [128].

Важной особенностью некротаксиса является то, что градиент DAMPs, исходящий непосредственно из очага воспаления (повреждения), обеспечивает наиболее мощный хемотаксический сигнал. В формировании этого градиента при-

нимает участие и аутокринный механизм, состоящий в том, что нейтрофильные АТФ и ЛТВ4 (липидный медиатор), появляющиеся в очаге воспаления вследствие нетоза, могут действовать, соответственно, на рецепторы P2Y2 и ЛТВ4 живых нейтрофилов. Этот градиент DAMPs имеет первостепенное значение для эффективной миграции клеток в очаг воспаления [58, 73, 126].

Очевидно, что комбинация интерстициального градиента DAMPs и усиления аутокринного механизма обеспечивает DAMPs-обусловленный хемотаксис нейтрофилов и других клеток в очаг воспаления [23].

Таким образом «стерильное» воспаление при ИВРЗ и формирование КВИ сопровождается индукцией некроза и таких видов РГК, как некроптоз, пироптоз и нетоз и, как следствие, пассивным высвобождением DAMPs. DAMPs, в свою очередь, могут быть причиной гибели клеток, находящихся в составе КВИ, поскольку клетки

в составе КВИ экспрессируют PRR-рецепторы, взаимодействующие с DAMPs. Тем самым формируется порочный круг. Подчеркнем, что из всех клеток в составе КВИ речь идет, прежде всего, о PRR-экспрессирующих ДК, их активации, продукции ими провоспалительных цитокинов с последующей презентацией DAMPs в составе аллелей МНС I и II классов в качестве ауто-АГ и индукцией аутореактивных Т-лимфоцитов и выработкой цитопатогенных ауто-АТ.

Рисунок 3 иллюстрирует участие DAMPs в «стерильном» воспалении и формировании порочного круга в процессах ПГК.

А – повреждение клеток, например, при некрозе приводит к высвобождению сDAMPs из соответствующего внутриклеточного компартмента (внеклеточные DAMP не показаны).

В – высвободившиеся сDAMPs распознаются PRR-рецепторами на АПК и PRR-рецепторами на неиммунных клетках. Подобное PRR-сDAMPs

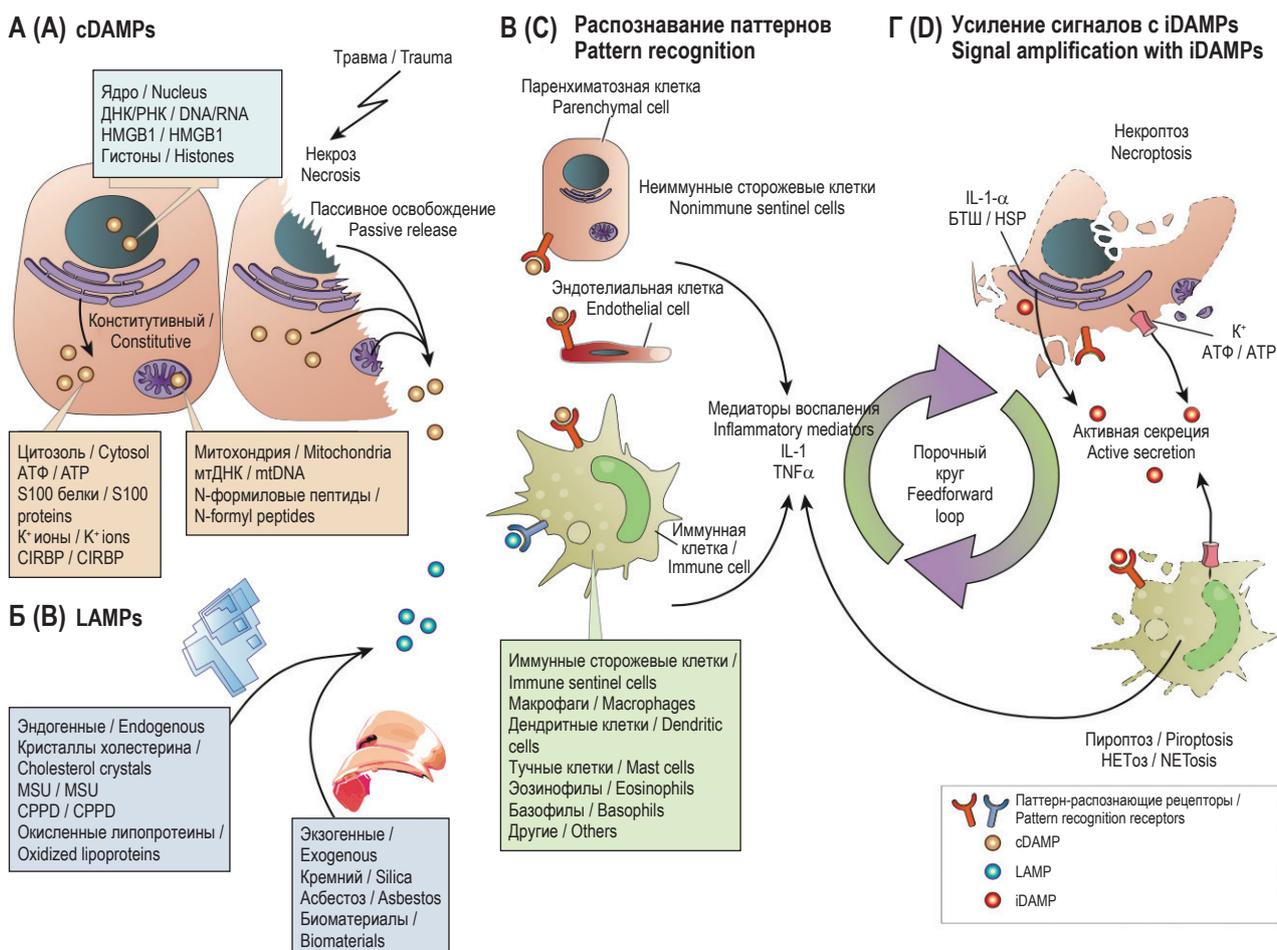


Рисунок 3. Схема участия DAMPs в «стерильном» воспалении и индукции РГК – некроптоза, пироптоза и нетоза, пояснения в тексте, по материалам [128]

Figure 3. Scheme of DAMPs participation in “sterile” inflammation and induction of RDC – necroptosis, pyroptosis and netosis, explanations in the text, based on materials [128]

взаимодействие приводит к РГК и к секреции провоспалительных цитокинов (в частности $TNF\alpha$ и $IL-1\alpha$) и других медиаторов воспаления.

Г – в процессе прогрессирующего воспаления провоспалительные сигналы, такие как $IL-1\alpha$ и $TNF\alpha$ и др., индуцируют упомянутые формы ПГК-некроптоз, пироптоз и нетоз. Это приводит к активной (ее еще называют неканонической) продукции iDAMPs. Высвободившиеся iDAMPs, взаимодействуя с PRR-рецепторами жизнеспособных клеток, находящихся в составе КВИ, индуцируют в этих клетках некроптоз, пироптоз и нетоз, что формирует порочный круг и способствует прогрессированию воспаления.

Двойственная патогенетическая роль всех видов DAMPs при ИВРЗ, лежащая в основе формирования порочного круга, является уникальным молекулярно-иммунологическим феноменом, позволяющим пересмотреть те принципы аутоиммунного воспаления, которые были положены в основу патогенеза ревматических заболеваний. Иными словами «теория опасности» Polly Matzinger создает некую альтернативу классическим представлениям о доминирующем значении индукции ауто-АГ с последующим цитопатогенным иммунным ответом и аутоиммунным воспалением при ИВРЗ. В этой связи необходимо остановиться на тех формах гибели клеток, при которых выделившиеся DAMPs могут служить причиной индукции всех видов РГК.

Наиболее распространенным видом гибели клеток является некроз, вызывающий пассивное высвобождение DAMPs. Воздействие некротизирующих факторов (токсины, травма, ишемия, гипоксия) сопровождается набуханием клеток, разрывом плазмалеммы и выходом во внеклеточную среду АТФ, HMGB1, АТФ, гистонов, HSP, ДНК, РНК [9, 48].

При некрозе разрыв плазмалеммы является неконтролируемым, случайным событием. Однако этот разрыв также может быть и регулируемым процессом, управляемым специфическими каспазами и киназами. В частности, такой вид РГК, как некроптоз, возникает в результате активации рецепторно-взаимодействующих серин/треониновых киназы-1 и киназы-3 (RIPK1 и RIPK3), за которой следует RIPK3-зависимое фосфорилирование домена киназы смешанной линии, подобной псевдокиназе (MLKL) с последующим индуцированием олигомеризации MLKL, что приводит к разрыву плазмалеммы и выделению вышеуказанных DAMPs. Поскольку целостность плазмалеммы теряется при некроптозе способом, аналогичным некрозу, некроптоз также может приводить к высвобождению DAMPs и других клеточных компонентов во внеклеточное пространство [25].

При апоптозе гибель клеток происходит без потери целостности плазмалеммы. Морфологическими признаками апоптоза являются уплотнением плазмалеммы, формированием мембранных вздутий, конденсация хроматина и фрагментация ДНК. Последовательная активация каспазы-8, каспазы-9 и каспазы-10, а также эндонуклеаз является основным механизмом апоптоза, который состоит из внешнего и внутреннего путей. Оба пути сходятся на общих эффекторных каспазах, т. е. каспазе-3, каспазе-6 и каспазе-7, индуцирующие апоптоз [5, 105].

На ранних стадиях апоптоз считается неиммуногенной формой клеточной гибели, которая предотвращает высвобождение внутриклеточного содержимого, поскольку не происходит потери целостности мембраны. Однако апоптоз может быть иммуногенным в условиях стресса, таких как химиотерапия или воздействие физических факторов. Эта форма апоптоза называется «иммуногенная клеточная гибель» и характеризуется высвобождением DAMPs [78].

В соответствии с механизмами такой формы апоптоза, было показано высвобождение таких DAMPs, как HMGB1, гистоны, РНК, ДНК, а также АТФ [28, 49].

Другой формой каспазо-зависимой гибели клеток является пироптоз, который индуцируется активацией каспазы-1, следующей за активацией провоспалительных инфламмасом, таких как NLRP3, или активацией каспазы-4, каспазы-5 и каспазы-11, инициируемой внутриклеточным ЛПС. Активация провоспалительных каспазы-1, каспазы-4, каспазы-5 и каспазы-11 индуцирует расщепление газдермина D (GSDMD), способствуя образованию пор в мембране, что обуславливает высвобождение внутриклеточных DAMPs. К ним относятся $IL-1\beta$, HMGB1, АТФ и ДНК [100, 116].

Регулируемый процесс гибели нейтрофилов – нетоз – сопровождается формированием паутиных структур, или сетей, на основе хроматина и деструкцией ядерных и гранулярных мембран. ДНК и гистоны смешиваются с полученными из гранул антимикробными пептидами в цитоплазме и вытесняются во внеклеточное пространство. Нетоз рассматривался как суицидальный процесс, приводящий к гибели клеток, однако позже было обнаружено, что сети могут также высвобождаться и из живых нейтрофилов. При этом высвобождаются такие DAMPs, как гистоны, ДНК, eCIRP (РНК-шапероновый белок, функционирующий при клеточном стрессе), эластаза нейтрофилов (NE), миелопероксидаза (MPO), HMGB1 [28].

Описан еще один вид РГК – ферроптоз. Ферроптоз – это запрограммированная гибель кле-

ток, сопровождающаяся накоплением железа и перекисным окислением липидов. Его морфологические особенности включают потерю целостности мембраны, набухание цитоплазмы, набухание цитоплазматических органелл и умеренную конденсацию хроматина. Считается, что при ферроптозе из клеток высвобождаются HMGB1 и ДНК [104].

Помимо различных типов клеточной гибели, DAMP также могут активно высвобождаться из живых клеток путем экскреции, например, белков из эндоплазматического ретикулума (ER) и аппарата Гольджи при клеточном стрессе. Доминирующим механизмом в этих случаях является экзоцитоз, а переносчиками DAMPs могут являться секреторные лизосомы и экзосомы. Лизосомальная секреция типична для клеток,

подвергающихся стрессу, она была идентифицирована как один из механизмов высвобождения HMGB1, ATP и eCIRP. Экзосомные DAMPs включают, но не ограничиваются ими, HMGB1, АТФ, гистоны, HSP, РНК и ДНК [64, 81].

Как видно, DAMPs высвобождаются при различных формах клеточной гибели и экзоцитозе. При этом механизмы высвобождения DAMPs довольно специфичны для каждой из них. Но главное объединяющее качество вышеуказанных DAMPs – это способность взаимодействовать с PRR-рецепторами клеток врожденного иммунитета с последующим развитием аутовоспалительного и аутоиммунного процессов при ИВРЗ.

Обобщенная картина представленных выше результатов исследований отражена на рисунке 4.

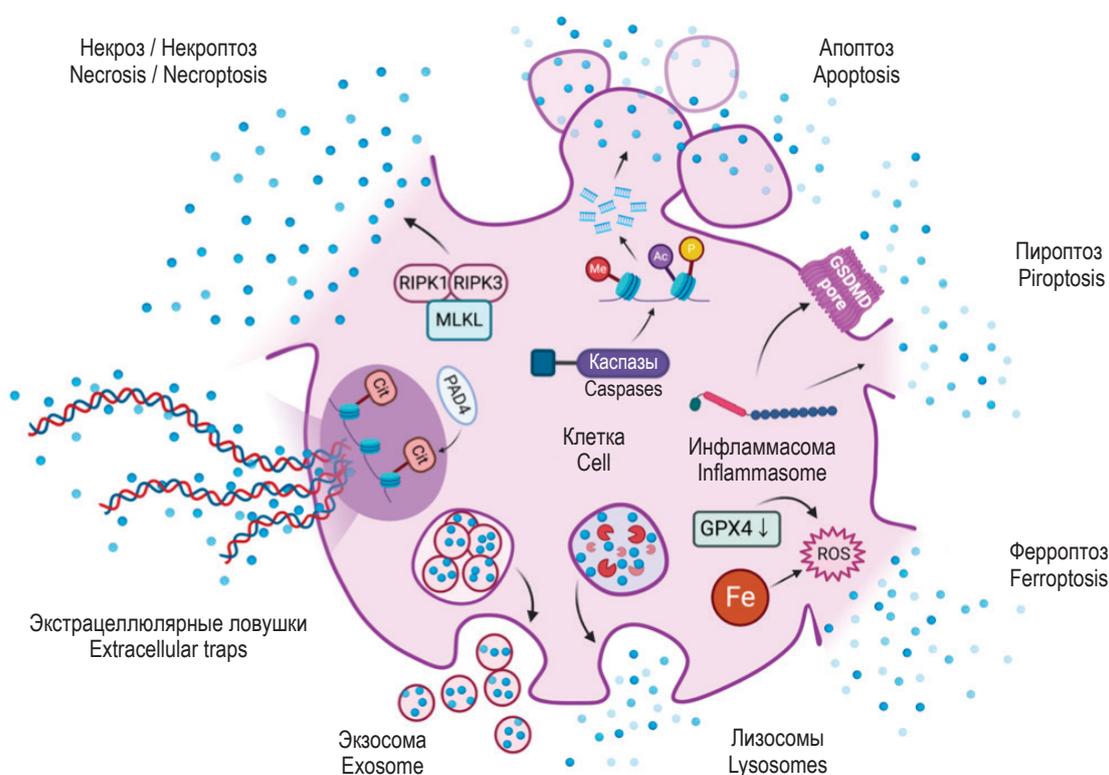


Рисунок 4. Универсальные механизмы высвобождения DAMPs

Примечание. Общие механизмы высвобождения DAMPs из клеток представлены некрозом, некроптозом, апоптозом, пироптозом, ферроптозом, внеклеточными ловушками (нетозом), секреторными лизосомами и экзосомами. RIPK1 и RIPK3 – рецепторно-взаимодействующие серин-треониновые киназы 1 и 3; MLKL – киназа смешанной линии, подобная псевдокиназе; GSDMD – газдермин D; GPX4 – глутатионпероксидаза 4; ROS – активные формы кислорода; PAD4 – пептидиларгинин дезаминаза 4; Me – метилирование; Ac – ацетилирование; P – фосфорилирование; Cit – цитруллинирование, по материалам [80].

Figure 4. Universal DAMPs release mechanisms

Note. The general mechanisms of DAMPs release from cells are represented by necrosis, necroptosis, apoptosis, pyroptosis, ferroptosis, extracellular traps (netosis), secretory lysosomes and exosomes. RIPK1 and RIPK3, receptor-interacting serine-threonine kinases 1 and 3; MLKL, mixed-line kinase, similar to pseudokinase; GSDMD, gasdermin D; GPX4, glutathione peroxidase 4; ROS, reactive oxygen species; PAD4, peptidylarginine deaminase 4; Me, methylation; Ac, acetylation; P, phosphorylation, based on materials [80].

Из рисунка 4 видно, что клетка, подвергаясь воздействию экзо- и эндогенных стимулов, в числе которых присутствуют PRR-DAMP взаимодействие, задействует все виды РГК и некроза. При этом активируются универсальные внутриклеточные пути передачи сигнала, что может обуславливать перекрест этих путей.

DAMP-опосредованная гибель клеток и адаптивный иммунитет при иммуновоспалительных ревматических заболеваниях

Воспалительная реакция и гибель клеток, как следствие PRR – DAMPs взаимодействия, является эволюционно консервативным механизмом как у беспозвоночных, так и у позвоночных. Считается, что механизм «стерильного» воспаления способствует заживлению ран и восстановлению тканей. Однако у позвоночных распознавание системой иммунитета DAMPs, присутствующих в поврежденных клетках, инициирует также Т- или В-клеточные ответы. Иными словами, гибель клеток может индуцировать «стерильный» адаптивный иммунный ответ на АГ, ассоциированные с погибшими клетками, при отсутствии микробной инфекции. В этом контексте подобный вид гибели клеток определяется как «иммуногенная клеточная гибель» [83, 123].

Модель DAMP-индуцированного адаптивного иммунного ответа основывается на следующих положениях. Эволюционным предназначением адаптивного иммунитета является защита хозяина от инфекционных микроорганизмов. АГ-специфический Т- и В-клеточный ответ индуцируются АГ-презентирующими клетками – АПК, имевшими предшествующий контакт с патогеном. По С.А. Janeway [50], активация АПК является результатом сигналов PRR-PAMPs взаимодействия. Все виды дендритных клеток (ДК) представляют собой первичные АПК, непосредственно регулирующие адаптивный иммунитет. PRR-активация АПК значительно увеличивает процессинг и презентацию АГ. Кроме этого, PRR-активация АПК индуцирует экспрессию рецепторов хемокинов, которые позволяют ДК мигрировать в Т-зависимые зоны вторичных лимфоидных органов, где эти клетки реализуют свой потенциал относительно АГ-специфической дифференцировки и экспансии Т-клеток [47].

Принципиально эти же самые механизмы АГ-специфической активации Т-клеток присутствуют и при PRR-DAMPs взаимодействии при очевидном отсутствии инфекции, что было зарегистрировано при отторжении аллотрансплантатов, аутоиммунных заболеваниях, опухолях.

Приведем некоторые экспериментальные данные, подтверждающие представленную модель.

Иммуногенность вакцин усиливалась за счет гибели клеток в месте вакцинации и последующего высвобождения DAMPs, вследствие токсичности квасцов, входящих в качестве адьювантов в состав вакцин [67].

Иммунизация мертвыми клетками, несущими чужеродный антиген, часто индуцирует иммунный ответ аналогичный генерации противоопухолевых CTL путем вакцинации мертвыми опухолевыми клетками [19].

Позитивные эффекты радио- или химиотерапии при раке, по-видимому, обусловлены их способностью вызывать указанную выше «иммуногенную гибель опухолевых клеток», сопровождающуюся высвобождением HMGB1 и АТФ [56].

Кроме указанных DAMPs, адаптивный иммунный ответ индуцируют, мочевиная кислота, белки теплового шока (HSP) или гранулизин [91].

Отметим, что DAMPs-опосредованному адаптивному иммунному ответу способствует указанный выше перекрест реактивности PRR-рецепторов в отношении DAMPs и PAMPs. Подобный реактивный перекрест, т. е. передача сигналов от общего рецептора к DAMPs и PAMPs, обусловлен активацией «оси» CD24-SiglecG/10, которая определяет, будут ли TLR и/или NLR, связанные с CD24, вызывать воспаление при воздействии DAMPs. Siglec-G/10 принадлежит к семейству иммуноглобулиноподобных лектинов, которые могут распознавать структуры, содержащие сиаловую кислоту, присутствующие на CD24. Такие DAMPs, как HMGB1, HSP70 и HSP90, напрямую взаимодействуют с CD24, а комплекс DAMPs-CD24-Siglec G/10 позволяет фосфатазам, таким как SHP-1, подавлять передачу сигналов с TLR- и NLR-рецепторов. Повышенные уровни сиалидаз приводят к снижению связывания CD24 с Siglec G/10, усиливая взаимодействие между TLR и DAMPs [22, 52].

PRR-DAMPs-взаимодействие сопровождается повышенной экспрессией МНС I и II классов на ДК и костимуляторных молекул, а также продукцией провоспалительных цитокинов, что существенно повышает АГ-презентирующий потенциал АПК. Особенно это выражено при взаимодействии ДК с собственными ДНК и РНК (внутриклеточные DAMPs) [61, 122].

В целом экспрессия PRR-рецепторов достаточна для контроля индивидуального адаптивного иммунного ответа на DAMP-продукты клеточной гибели. Показано, в частности, что TLR-рецепторы контролируют адаптивные иммунные реакции, включая индукцию CD4⁺Th1-зависимого иммунного ответа и активацию CD8⁺ цитотоксических Т-лимфоцитов, участвуют в контроле поглощения антигена и отборе антиге-

на для презентации ДК. PRR-рецепторы активно контролируют созревание ДК и продукцию цитокинов, а также дифференцировку наивных Т-клеток со стороны регуляторных Т-клеток (Tregs). TLR-рецепторы также могут контролировать ответы В-клеток на Т-зависимые и Т-независимые антигены, а также на собственные антигены. Эти рецепторы могут непосредственно активировать В-клетки памяти для выработки антител [46, 84, 85].

Воспалительные и иммуногенные сигналы умирающих клеток являются основным источником антигенов для кросс-презентации ДК DAMP-антигенов CD8⁺Т-клеткам. Идентифицирован специализированный DAMP-рецептор на ДК, обозначенный как DNGR-1 (или CLEC9A). Этот рецептор способствует кросс-презентации ДК, в результате чего экзогенный (внеклеточный) DAMP-материал погибших клеток становится мишенью для цитотоксических CD8⁺Т-клеток в составе аллелей МНС I класса. Белок, распознаваемый DNGR-1, является F-актином. F-актин относится к универсальным и распространенным компонентам цитоскелета, который обнаруживается в клетках, потерявших целостность плазмалеммы. Таким образом, распознавание цитоскелета PRR-рецепторами может служить средством обнаружения клеточных повреждений и инициирования адаптивных иммунных реакций [94, 123].

Конечной точкой DAMP-антигенности погибших клеток является сама клетка-донор антигена. Форма гибели клеток может оказывать глубокое влияние на последующую доступность DAMP-антигенов. Например, индукция аутофагии перед гибелью клеток может облегчить доставку DAMP-антигена в ДК [113].

Кроме того, пул антигенных субстратов для кросс-презентации может быть изменен самим процессом гибели клеток. Было показано, что опосредованное каспазами расщепление клеточных белков во время апоптоза приводит к образованию неоантигенов, которые приводят к перекрестной презентации неоантигенов ДК и активации аутореактивных CD8⁺Т-клеток [89].

DAMP-индуцированная клеточная гибель часто сочетается с одновременной реакцией PRR-рецепторов на предсуществующие PAMPs патогенов. Это имеет место, когда ДК взаимодействуют с умирающими клетками, инфицированными вирусами или бактериями. В частности, фагоцитоз умирающих инфицированных вирусом клеток приводит к реакциям CD8⁺ цитотоксических Т-лимфоцитов, зависящих от TLR3, который, в свою очередь, распознает вирусную PAMP (двухцепочечную РНК), содержащуюся в погибшей клетке [99].

Также поглощение погибших клеток ДК сопровождается зависимой от TLR-рецепторов продукцией IL-6, если погибшая клетка содержит бактериальные PAMPs, что затем индуцирует IL-17-продуцирующие Т-клетки [109].

Таким образом, существует взаимозависимость между распознаванием DAMPs и PAMPs. Например, способность микробного ЛПС (PAMP) вызывать токсический шок у мышей в значительной степени усиливается HMGB1 (DAMP). Адьювантные свойства многих DAMP сами по себе могут зависеть от загрязнения LPS. Также микробы частично подавляют иммунный ответ, влияя на пути гибели клеток [57].

Очевидно, что изучение синергического и/или антагонистического действия PAMPs и DAMPs на врожденные и адаптивные иммунные реакции является важной областью для дальнейших исследований.

На рисунке 5 представлена обобщенная схема индукции адаптивного иммунитета в отношении высвобождающихся DAMPs при таких видах РГК, как пироптоз, некроптоз, аутофагия, нетоз, а также при некрозе.

Клетки, подвергшиеся РГК или некрозу, высвобождают такие DAMPs, как высокомолекулярная бокс-группа 1 (HMGB1), ДНК, калретикулин или F-актин. PRR-рецепторы, в частности TLR4, экспрессирующиеся на активированных ДК, взаимодействуют с указанными DAMPs и индуцируют адаптивный иммунный ответ к ним. Другие рецепторы DAMPs, такие как DNGR-1-рецептор, облегчают поглощение и перемещение материала погибших клеток в эндоцитарные компартменты, способствуя использованию DAMP-антигена для кросс-презентации. Как подчеркивалось выше, представленные на рисунке 5 DAMPs, а также и другие, являются результатом дезорганизации рыхлой волокнистой неоформленной соединительной ткани и РГК в воспалительном инфильтрате при ИВРЗ.

Таким образом, DAMP-опосредованный адаптивный иммунный ответ является важным патогенетическим звеном при ИВРЗ. Источником DAMPs в этой ситуации являются в т. ч. и клетки, подвергшиеся РГК, а также некрозу. Отметим, что DAMPs, высвободившиеся при РГК, обладают большей иммуногенностью, нежели DAMPs, высвободившиеся в процессе некроза клеток. Поскольку идентифицированные молекулярно-клеточные пути передачи DAMP-сигнала при РГК достаточно хорошо изучены, это открывает широкие перспективы модуляции процессов РГК посредством фармакологических воздействий с целью разработки селективных противовоспалительных средств, что особенно важно при ИВРЗ. В качестве DAMPs, индуцирующих

адаптивный иммунный ответ, выступают практически все внутри- и внеклеточные DAMPs, представленные в таблицах 1 и 2. Важным свойством DAMP-индуцированного адаптивного иммунного ответа и последующего аутоиммунного воспаления является формирование порочного круга, когда высвобождающиеся DAMPs посредством PRR-DAMPs взаимодействия вызывают РГК с последующим высвобождением дополнительных иммуногенных порций DAMPs и индукции адаптивного иммунного ответа.

DAMP-индуцированное воспаление при иммуновоспалительных ревматических заболеваниях

Как указывалось выше, «теория опасности» Polly Matzinger связывала аутореактивность системы иммунитета с динамическим состоянием

тканевого гомеостаза. Повреждение тканей сопровождается нарушением функционального, адаптивного баланса между ними. На этом фоне аутореактивность врожденного иммунитета индуцирует «стерильное» воспаление, патогенетически относящееся к категории аутовоспалительных процессов. К основным этиологическим факторам «стерильного» воспаления относят появление вне- и внутриклеточных DAMPs с последующим PRR-DAMPs взаимодействием клеток врожденного иммунитета и подключением механизмов ауто-АГ-специфического адаптивного иммунного ответа.

Наиболее демонстративно DAMP-обусловленное «стерильное» воспаление представлено при ИВРЗ. Дезорганизация рыхлой волокнистой

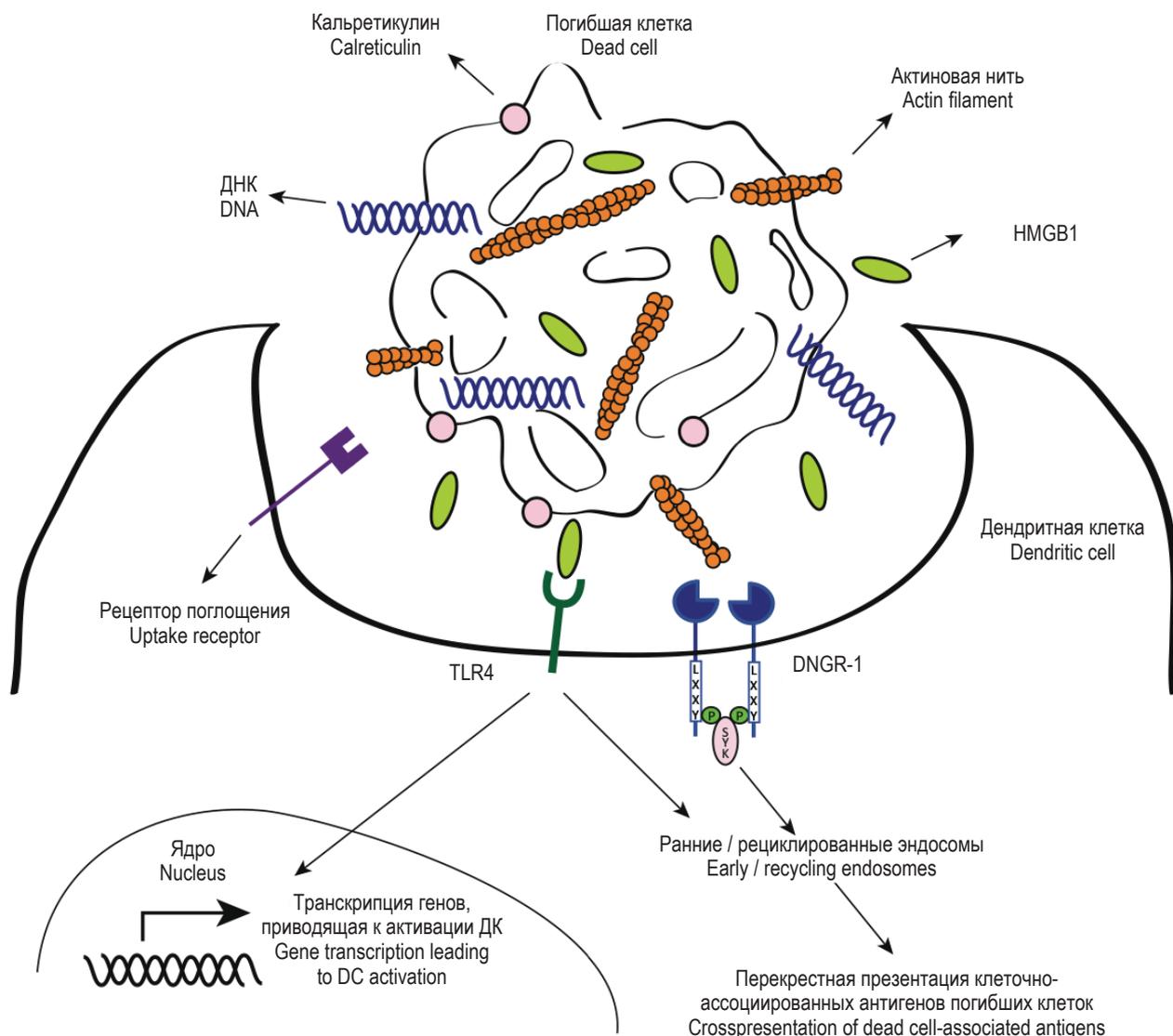


Рисунок 5. Индукция адаптивного иммунитета к DAMPs, высвободившихся в результате РГК и некроза, по материалам [123]

Figure 5. Induction of adaptive immunity to DAMPs released as a result of RDC and necrosis, based on materials [123]

неоформленной соединительной ткани сопровождается массивным поступлением внеклеточных DAMPs в окружающую среду. В этих условиях высокие уровни DAMPs возникают локально и/или системно. Патогенетическая динамика организованных и неорганизованных форм КВИ при ИВРЗ закономерно включает в себя все основные виды РГК, такие как аутофагия, апоптоз, некроптоз, пироптоз и нетоз, а также случайный вид гибели клеток – некроз [3]. Высвобождающиеся при этом внутриклеточные DAMPs включаются в патогенетические звенья воспалительного процесса и формируют порочные круги, приобретая при этом характеристики ауто-АГ (см. выше). Практически все DAMPs, представленные в таблицах 1 и 2, входят в состав рыхлой волокнистой неоформленной соединительной ткани, а также выделяются в случаях ПГК и некроза в КВИ при ИВРЗ.

Подчеркнем важную роль митохондриальных DAMPs, высвобождающихся в процессах ПГК и клеточного некроза. Речь идет о таких DAMPs, как митохондриальные ДНК (мтДНК), мтРНК, АТФ, митохондриальный транскрипционный фактор А (TFAM), N-формил-пептиды (NFP), цитохром С, кардиолипин [39].

В настоящее время имеется достаточно доказательств того, что патофизиологические следствия PRR-DAMPs взаимодействия, опосредованного клетками врожденного иммунитета, несущими PRR, являются патогенетически значимыми при РА. Так, при РА в синовиальной оболочке в области продуктивного воспаления определяется широкий спектр DAMPs, в частности HSP, HMGB1, ДНК хозяина, фибриноген, FNEDA и тенасцин-С, и все они относятся к эндогенным лигандам TLR-рецепторов. Важно заметить, что уровни указанных DAMPs были статистически значимо выше по сравнению с контролем [72, 107].

Имеются свидетельства активного участия в продуктивном воспалении и прогрессирующей деструкции суставов TLR2-, TLR4-, а также эндосомальных TLR3-, TLR7- и TLR9-рецепторов, экспрессирующихся на моноцитах крови, синовиальных фибробластах и на макрофагах синовиальной жидкости у пациентов с РА. Также есть доказательства модуляции провоспалительной NLRP3-инфламмосомы при этом заболевании. РНК, высвобождаемая клетками синовиальной жидкости у пациентов с РА, активирует расположенный в эндосоме TLR3 на культивируемых фибробластах синовиальной оболочки РА [62].

При СКВ высокие концентрации ДНК-содержащих иммунных комплексов в сыворотке крови, включая комплексы нуклеосома-HMGB1

являются патогномоничными для этого заболевания [114].

Имеются данные, свидетельствующие о том, что рецепторы семейств TLR, NLR и RLR участвуют в патогенезе СКВ посредством взаимодействия с ключевыми DAMPs при этом заболевании, а именно – HMGB1, цитозольными дцДНК и РНК, ДНК-содержащими иммунными комплексами. Это взаимодействие сопровождается выраженной иммуностимуляцией ДК, последующим аутовоспалением и адаптивным аутоиммунным ответом [119].

Возникает интересная закономерность. С одной стороны ДК, активируемые собственными, указанными выше, DAMPs не только продуцируют провоспалительные цитокины и хемокины, но также обладают способностью презентировать АГ аутореактивным Т-клеткам, тем самым приводя, в частности, к выработке аутоантител В-клетками [20].

С другой стороны, другие виды ДК, такие как плазмитоидные ДК, после взаимодействия собственных TLR7 и TLR9 с теми же DAMPs способствуют выработке антинуклеарных аутоантител и IFN I типа, коррелирующих со степенью тяжести СКВ [40].

У пациентов с активной СКВ наблюдалось усиленное внеклеточное высвобождение мтДНК, как следствие нетоза нейтрофилов. Уровень этих DAMPs коррелировал с индексом активности заболевания, повышенными антителами к мтДНК и показателем IFN I типа. мтДНК в мононуклеарных клетках периферической крови у пациентов с СКВ был статистически значимо выше по сравнению с контролем [34].

Кроме этого, семейство кальций-связывающих белков S100 является надежными биомаркерами воспаления при самых разнообразных заболеваниях. Например, уровни как MRP8, так и MRP14 в синовиальной оболочке и синовиальной жидкости при РА коррелируют с активностью заболевания в большей степени, чем уровни С-реактивного белка [32].

Важно отметить, что подавление провоспалительных следствий TLR-DAMPs взаимодействия открывает множество новых потенциальных мишеней для лечения ИВРЗ. В эксперименте показано, что мыши с дефицитом тенасцина С (внеклеточный DAMP, см. табл. 1) защищены от персистирующего воспаления суставов и разрушения тканей во время антиген-индуцированного артрита [86].

Аналогично, блокада моноклональными АТ HSP90 и HMGB1 (внутриклеточные DAMP, см. табл. 2) снижает активность воспалительного процесса при РА [90].

Антитела к HMGB1 предотвращают активацию клеток сывороткой от пациентов с СКВ [108].

К важным патогенетическим аспектам TLR-DAMPs взаимодействия при ИВРЗ относится нарушение структуры митохондрий и сайтов контакта митохондрий с эндоплазматическим ретикуломом (ER). Подобное нарушение сопровождается выбросом митохондриальных DAMPs, таких как кардиолипин, митохондриальная ДНК (мтДНК) и митохондриальные формил-пептиды. Все перечисленные DAMPs взаимодействуют с PRR-рецепторами ДК и клеток макрофагально-моноцитарного гистогенеза с последующей индукцией воспалительной реакции. Формируется порочный круг, при котором накопление поврежденных митохондрий, генерирующих активные формы O₂ (АФК), сопровождается дальнейшей продукцией митохондриальных DAMPs и активацией NLRP3 инфламмосомы. Кроме этого, активируется цитозольный ДНК-сенсор, связывающийся с адаптерным белком из ER, обозначаемый как STING (общее обозначение – cGAS/STING), а также активацией ДНК-зависимого

фактора, регулирующего продукцию IFN I типа и обозначаемого как ZBP1. Все описанные процессы обладают провоспалительными характеристиками и могут встречаться при СКВ, РА, синдроме Шегрена, сахарном диабете I типа [12].

Отметим, что при синдроме Шегрена в слюнных железах документирована гиперэкспрессия TLR9, активно взаимодействующего с указанными митохондриальными DAMPs с последующей индукцией провоспалительного cGAS/STING и ZBP1 сигнальных путей. В этом контексте у пациентов с синдромом Шегрена повышен уровень митохондриальной глутамин-оксалоуксусной трансминазы (m-GOT) в слюне и у 3-27% пациентов имеются антимитохондриальные антитела [30].

Представленные данные подтверждают идею о DAMP-опосредованном порочном круге: повышение уровня провоспалительных DAMPs приводит к большему повреждению тканей, что, в свою очередь, значительно увеличивает уровни DAMPs в тканях, которые обуславливают еще большее повреждение тканей. Но низкие уровни DAMPs в тканях способствуют регенерации тканей.

На рисунке 6 отражен принцип порочного круга, формируемого нарастающим увеличением уровня DAMPs в результате дезорганизации рыхлой волокнистой неоформленной соединительной ткани и процессов РГК при ИВРЗ.

Согласно этой схеме, все вероятные этиологические факторы при ИВРЗ (ауто-АГ, микроорганизмы, УФО и др.) вызывают повреждение тканей и клеток. В результате генерируются DAMPs, которые индуцируют провоспалительный каскад путем TLR-DAMP-взаимодействия. В свою очередь, повышается продукция провоспалительных медиаторов, которые вызывают дальнейшее повреждение тканей, что приводит к повышению уровня DAMPs и формированию порочного круга, который может привести к хроническому воспалению и аутоиммунитету. Продукция DAMPs является двойным процессом. С одной стороны, они играют важную роль в патогенезе ИВРЗ, а с другой – являются жизненно важными при регенерации тканей.

Патогенная роль нарастающего количества DAMPs при ИВРЗ, индукция PRR-DAMP взаимодействия клеток врожденного иммунитета, формирование на этой основе порочного круга и последующее развитие иммуновоспалительного процесса в обобщенном виде представлены на рисунке 7.

Повреждение тканей, РГК и некроз клеток при ИВРЗ, массивное выделение DAMPs способствуют формированию порочного круга. Нарушение элиминации мертвых клеток или неправильная

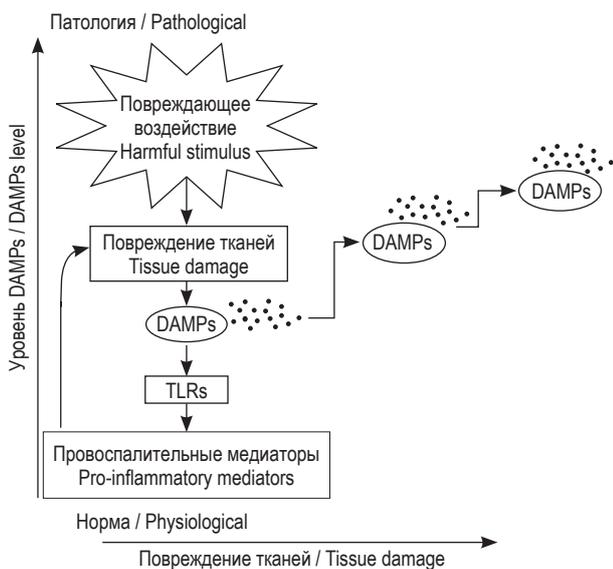


Рисунок 6. Прогрессирующее увеличение внутри- и внеклеточных DAMPs при дезорганизации рыхлой волокнистой неоформленной соединительной ткани и процессах РГК при иммуновоспалительных ревматических заболеваниях приводит к еще большему повреждению тканей, по материалам [86]

Figure 6. Progressive increase in intracellular and extracellular DAMPs during the disorganization of loose fibrous unformed connective tissue and RDC processes in immuno-inflammatory rheumatic diseases leads to even greater tissue damage, according to materials [86]

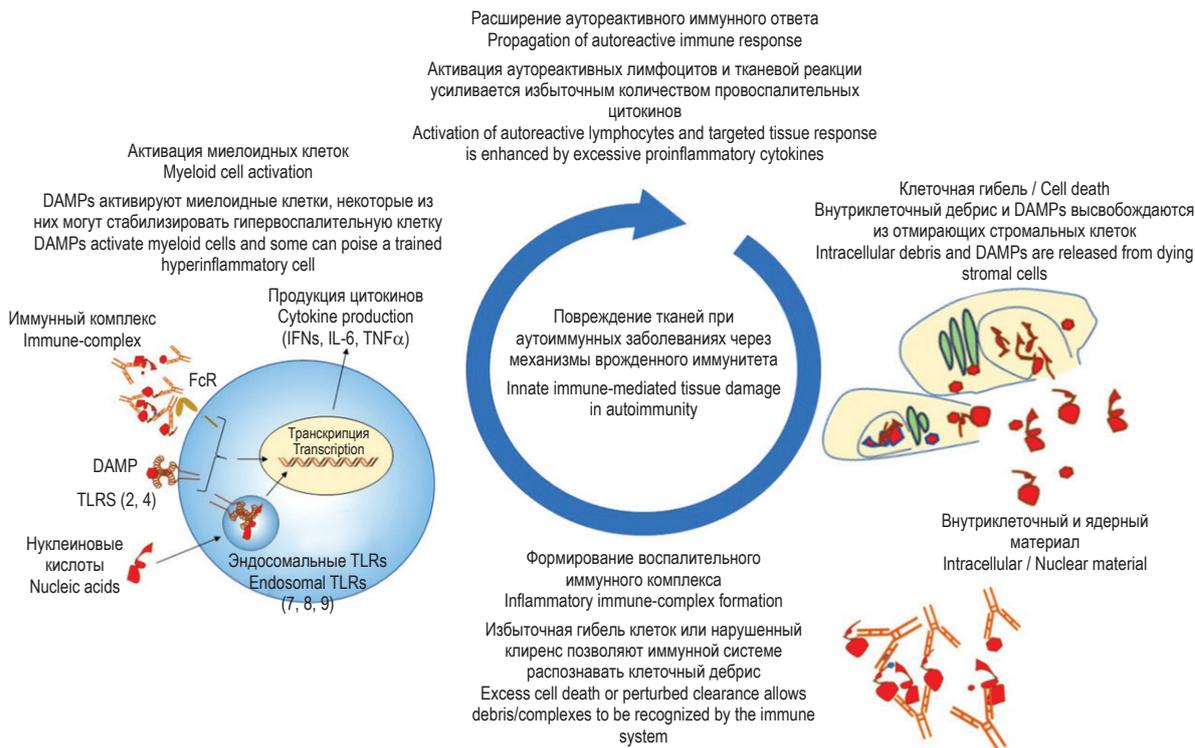


Рисунок 7. Модель DAMP-индуцированной аутореактивности врожденной и адаптивной систем иммунитета при иммуновоспалительных ревматических заболеваниях, по материалам [62]

Figure 7. Model of DAMP-induced autoreactivity of innate and adaptive immune systems in immuno-inflammatory rheumatic diseases, based on materials [62]

регуляция апоптоза могут быть основным фактором аутоиммунного воспаления. Внутриклеточные (ядерные) DAMPs, высвобождающиеся из погибших клеток, могут образовывать иммунные комплексы с аутоантителами. Свободные DAMPs (например, нуклеиновые кислоты), распознаются рецепторами семейства TLR, тогда как Fc-фрагмент аутоантител в иммунных комплексах распознается Fc-рецепторами (FCR) на миелоидных клетках. Это, в свою очередь, индуцирует продукцию провоспалительных цитокинов (IFN I типа, IL-6, TNFα), которые способствуют развитию других патофизиологических процессов, включая усиленное ремоделирование/повреждение тканей, аутореактивный адаптивный иммунный ответ и воспалительный ответ остальных клеток врожденного иммунитета в *locus morbi*.

Уровень DAMPs может использоваться в качестве диагностических и прогностических биомаркеров, а также в качестве критерия оценки эффективности лечения. DAMPs можно легко измерить в сыворотке крови обычными биохимическими или иммунологическими методами. В частности, количественные показатели HMGB-1, HSP и др. могут быть использованы в качестве прогностического биомаркера при РА

и СКВ. Белки S100 могут быть специфическими биомаркерами при РА и псориатическом артрите. Раннее лечение при РА имеет большое значение для остановки прогрессирования заболевания, и, следовательно, выявление специфических DAMPs до появления синовита является весьма актуальным [82].

Очевидно также, что дальнейшие исследования PRR-DAMP взаимодействия и патофизиологических следствий этого взаимодействия при ИВРЗ придают верификации молекулярно-клеточных мишеней с терапевтическими целями обнадеживающие перспективы.

Заключение

В настоящее время достигнут значительный прогресс в понимании патогенетически значимых молекулярно-клеточных процессов при ИВРЗ. Предложенная в 1994 г. Polly Matzinger «теория опасности» отводит выделению вне- и внутри-клеточных DAMPs ключевую роль в индукции аутовоспалительных процессов. Результаты исследований молекулярно-клеточных процессов при DAMP-индуцированном воспалении свидетельствуют о вовлечении всех известных

механизмов врожденного иммунитета при ауто-воспалительных процессах, как следствия PRR-DAMP взаимодействия, а также индукции ауто-реактивного Т-клеточного иммунного ответа и продукции цитопатогенных ауто-АТ. Таким образом, «теория опасности» Polly Matzinger создает некую альтернативу доминирующей патогенетической роли ауто-АГ при ИВРЗ и в качестве этой альтернативы выступают вне- и внутриклеточные DAMPs.

Открытие способности мембранных и цитозольных PRR-рецепторов взаимодействовать с DAMPs с последующей активацией сигнальных путей, адапторных молекул и транскрипционных факторов и, как следствие, DAMP-индуцированных форм РГК, таких как аутофагия, апоптоз, некроптоз, пироптоз и нектоз, ознаменовало расширение понимания функциональных свойств врожденного иммунитета. При этом DAMP-индуцированные формы РГК часто сочетаются с одновременной реакцией PRR-рецепторов на предсуществующие в умерших клетках PAMPs патогены. Указанный феномен имеет место, в частности в тех случаях, когда ДК взаимодействуют с умирающими клетками, инфицированными вирусами или бактериями. Причем TLR-DAMP взаимодействие активирует те же сигнальные пути, адапторные молекулы, транскрипционные факторы, формирует те же провоспалительные инфламмосомы, что и при TLR-PAMP взаимодействии. Отметим, что при этом АГ-презентирующая функция ДК выражена в максимальной степени.

С учетом важной роли инфекций в качестве этиологических факторов при ИВРЗ, указанные процессы могут являться ключевыми при индукции феномена кросс-презентации при ИВРЗ.

Высвобождение всех видов DAMPs в процессе дезорганизации основного вещества рыхлой волокнистой неоформленной соединительной ткани и РГК, а также способности PRR-рецепторов взаимодействовать с DAMPs индуцирует при ИВРЗ неинфекционное «стерильное» воспаление. Отличительные свойства этого воспаления — это полиорганность и рецидивирующее течение.

Важным фактором рецидивирующего течения «стерильного» воспаления при ИВРЗ является формирование DAMP-опосредованного порочного круга. При этом повышение уровня

провоспалительных DAMPs как *in situ*, так и в системной циркуляции приводит, посредством PRR-DAMP взаимодействия, к еще большему количеству клеток, подвергшихся РГК, и к еще большему повреждению тканей. В свою очередь, эти процессы значительно увеличивают уровни провоспалительных DAMPs в тканях, которые обуславливают прогрессирование «стерильного» воспаления при ИВРЗ. Парадоксально, но низкие уровни DAMPs в тканях, также посредством PRR-DAMP взаимодействия, способствуют регенерации тканей. Последнее обстоятельство подчеркивает разнообразие эволюционно сформированного функционального предназначения PRR-рецепторов, которое не ограничивается иммунологическими функциями.

Еще предстоит осмыслить биологический смысл РГК как следствия PRR-DAMP взаимодействия. Авторы открытия Toll-подобных рецепторов С.А. Janeway и Р. Меджитов отводили им роль сенсоров этиологически значимых патогенов в противоинфекционном иммунитете. Однако многочисленные данные свидетельствуют о более широкой сфере их деятельности. Вероятно, эволюционное предназначение функциональной активности PRR-рецепторов сводится к многонаправленности их лиганд-рецепторной активности и поддержанию клеточного и тканевого гомеостаза.

Патогенетическое значение DAMP-обусловленного «стерильного» воспаления при ИВРЗ неоспоримо. Идентифицированы сигнальные пути, адапторные молекулы, транскрипционные факторы, провоспалительные инфламмосомы при всех видах PRR-DAMP-индуцированных РГК. Имеющиеся результаты клеточных, молекулярно-иммунологических и генетических исследований позволяют определить соответствующие мишени с целью их фармакологической коррекции. В этом отношении достигнут значительный прогресс в изыскании медикаментозных средств регуляции воспаления при СКВ, РА, синдроме Шегрена, ССД и др. Не меньшее значение имеет оценка сывороточных уровней DAMPs в качестве диагностических и прогностических биомаркеров, а также оценки эффективности лечения ИВРЗ. Перспективы дальнейших исследований в области DAMP-обусловленного «стерильного» воспаления при ИВРЗ очевидны.

Список литературы / References

1. Пинегин Б.В., Пащенко М.В., Пинегин В.Б., Хаитов Р.М. Эпителиальные клетки слизистых оболочек и новые подходы к иммунопрофилактике и иммунотерапии инфекционных заболеваний // Иммунология, 2020. Т. 41, № 6. С. 486-500. [Pinegin B.V., Pashenkov M.V., Pinegin V.B., Khaitov R.M. Mucosal epithelial cells and novel approaches to immunoprophylaxy and immunotherapy of infectious diseases. *Immunologiya = Immunologiya*, 2020, Vol. 41, no. 6, pp. 486-500. (In Russ.)]

2. Саидов М.З. Патогенетическое значение клеточного инфильтрата при иммуновоспалительных ревматических заболеваниях // Медицинская иммунология, 2021. Т. 23, № 6. С. 1239-1274. [Saidov M.Z. Pathogenetic value of cell infiltrate in immunoinflammatory rheumatic diseases. *Meditinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2021, Vol. 23, no. 6, pp. 1239-1274. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-PVO-2386.
3. Саидов М.З. Аутофагия, апоптоз, некроптоз, пироптоз и нетоз в патогенезе иммуновоспалительных ревматических заболеваний // Медицинская иммунология, 2022. Т. 24, № 4. С. 659-704. [Saidov M.Z. Autophagy, apoptosis, necroptosis, pyroptosis and netosis in pathogenesis of immunoinflammatory rheumatic diseases. *Meditinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2022, Vol. 24, no. 4, pp. 659-704. (In Russ.)]. doi: 10.15789/1563-0625-AAN-2482.
4. Успенская Ю.А., Комлева Ю.К., Пожиленкова Е.А., Салмин В.В., Лопатина О.Л., Фурсов А.А., Лаврентьев П.В., Белова О.А., Салмина А.Б. Лиганды RAGE-белков: роль в межклеточной коммуникации и патогенезе воспаления // Вестник РАМН, 2015. Т. 70, № 6. С. 694-703. [Uspenskaya Yu.A., Komleva Yu.K., Pozhilenkova E.A., Salmin V.V., Lopatina O.L., Fursov A.A., Lavrentiev P.V., Belova O.A., Salmina A.B. Ligands of RAGE-proteins: role in intercellular communication and pathogenesis of inflammation. *Vestnik Rossiiskoi Akademii Meditsinskikh Nauk = Annals of the Russian Academy of Medical Sciences*, 2015, Vol. 70, no. 6, pp. 694-703. (In Russ.)]
5. Ярилин А.А., Никонова М.Ф., Ярилина А.А., Варфоломеева М.И., Григорьева Т.Ю. Апоптоз, роль в патологии и значимость его оценки при клинико-иммунологическом обследовании больных // Медицинская иммунология, 2000. Т. 2, № 1. С. 7-16. [Yarilin A.A., Nikonova M.F., Yarilina A.A., Varfolomeeva M.I., Grigorieva T.Yu. Apoptosis, importance of its evaluation in immunopathological states. *Meditinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2000, Vol. 2, no. 1, pp. 7-16. (In Russ.)]
6. Akira S., Uematsu S., Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*, 2006, Vol. 124, no. 4, pp. 783-801.
7. Allam R., Darisipudi M.N., Tschopp J., Anders H.J. Histones trigger sterile inflammation by activating the NLRP3 inflammasome. *Eur. J. Immunol.*, 2013, Vol. 43, no. 13, pp. 3336-3342.
8. Ayna G., Krysko D.V., Kaczmarek A., Petrovski G., Vandenabeele P., Fésüs L. ATP release from dying autophagic cells and their phagocytosis are crucial for inflammasome activation in macrophages. *PLoS One*, Vol. 7, no. 6, e40069. doi: 10.1371/journal.pone.0040069.
9. Aziz M., Brenner M., Wang P. Extracellular CIRP (eCIRP) and inflammation. *J. Leukoc. Biol.*, 2019, Vol. 106, no. 1, pp. 133-146.
10. Babelova A., Moreth K., Tsalstra-Greul W., Zeng-Brouwers J., Eickelberg O., Young M.F., Bruckner P., Pfeischieter J., Schaefer R.M., Grone H.-J., Schaefer L. Biglycan, a danger signal that activates the NLRP3 inflammasome via Toll-like and P2X receptors. *J. Biol. Chem.*, 2009, Vol. 284, no. 36, pp. 24035-24048.
11. Barbouri D., Afratis N., Gialeli C., Vynios D.H., Theocharis A.D., Karamanos N.K. Syndecans as modulators and potential pharmacological targets in cancer progression. *Front. Oncol.*, 2014, Vol. 4. doi:10.3389/fonc.2014.00004.
12. Barrera M.-J., Aguilera S., Castro I., Carvajal P., Jara D., Molina C., González S., González M.-J. Dysfunctional mitochondria as critical players in the inflammation of autoimmune diseases: Potential role in Sjögren's syndrome. *Autoimmun. Rev.*, 2021, Vol. 20, no. 8, 102867. doi:10.1016/j.autrev.2021.102867.
13. Bergsbaken T., Fink S.L., Cookson B.T. Pyroptosis: host cell death and inflammation. *Nat. Rev. Microbiol.*, 2009, Vol. 7, no. 2, pp. 99-109.
14. Beyer C., Stearns N.A., Giessel A., Distler J.H., Schett G., Pisetsky D.S. The extracellular release of DNA and HMGB1 from Jurkat T cells during *in vitro* necrotic cell death. *Innate Immun.*, 2012, Vol. 18, no. 5, pp. 727-737.
15. Bortoluci K.R., Medzhitov R. Control of infection by pyroptosis and autophagy: role of TLR and NLR. *Cell. Mol. Life Sci.*, 2010, Vol. 67, no. 10, pp. 1643-1651.
16. Bours M.J., Swennen E.L., di Virgilio F., Cronstein B.N., Dagnelie P.C. Adenosine 5'-triphosphate and adenosine as endogenous signaling molecules in immunity and inflammation. *Pharmacol. Ther.*, 2006, Vol. 112, no. 2, pp. 358-404.
17. Broz P., Dixit V.M. Inflammasomes: mechanism of assembly, regulation and signalling. *Nat. Rev. Immunol.*, 2016, Vol. 16, no. 7, pp. 407-420.
18. Buhimschi C.S., Baumbusch M.A., Dulay A.T., Oliver E.A., Lee S., Zhao G., Bhandari V., Ehrenkranz R.A., Weiner C.P., Mardi J.A., Buhimschi I. A. Characterization of RAGE, HMGB1, and S100 β in inflammation-induced preterm birth and fetal tissue injury. *Am. J. Pathol.*, 2009, Vol. 175, no. 3, pp. 958-975.
19. Casares N., Pequignot M.O., Tesniere A., Ghiringhelli F., Roux S., Chaput N., Schmitt E., Hamai A., Hervas-Stubbs S., Obeid M., Coutant F., Metivier D., Pichard E., Aucouturier P., Pierron G., Garrido C., Zitvogel L., Kroemer G. Caspase-dependent immunogenicity of doxorubicin-induced tumor cell death. *J. Exp. Med.*, 2005, Vol. 202, no. 12, pp. 1691-1701.
20. Chan V.S., Nie Y.J., Shen N., Yan S., Mok M.Y., Lau C.S. Distinct roles of myeloid and plasmacytoid dendritic cells in systemic lupus erythematosus. *Autoimmun. Rev.*, 2012, Vol. 11, no. 12, pp. 890-897.
21. Chen G.Y., Nunez G. Sterile inflammation: sensing and reacting to damage. *Nat. Rev. Immunol.*, 2010, Vol. 10, no. 12, pp. 826-837.
22. Chen G.Y., Chen X., King S., Cavassani K.A., Cheng J., Zheng X., Cao H., Yu H., Qu J., Fang D., Wu W., Bai X., Lui J., Woodiga S., Chen C., Sun L., Hogaboam C., Kunkel S., Zheng P., Lui Y. Amelioration of sepsis by

inhibiting sialidase-mediated disruption of the CD24-SiglecG interaction. *Nat. Biotechnol.*, 2011, Vol. 29, no. 5, pp. 428-435.

23. Chen Y., Corriden R., Inoue Y., Yip L., Hashiguchi N., Zinkernagel A., Nizet V., Insel P.A., Junger W.G. ATP release guides neutrophil chemotaxis via P2Y2 and A3 receptors. *Science*, 2006, Vol. 314, pp. 1792-1795.

24. Cheng N., He R., Tian J., Ye P.P., Ye R.D. Cutting edge: TLR2 is a functional receptor for acute-phase serum amyloid A. *J. Immunol.*, 2008, Vol. 181, no. 1, pp. 22-26.

25. Choi M.E., Price D.R., Ryter S.W., Choi A.M.K. Necroptosis: a crucial pathogenic mediator of human disease. *JCI Insight*, 2019, Vol. 4, e128834. doi: 10.1172/jci.insight.128834.

26. Connolly M., Veale D.J., Fearon U. Acute serum amyloid A regulates cytoskeletal rearrangement, cell matrix interactions and promotes cell migration in rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.*, 2011, Vol. 70, no. 7, pp. 1296-1303.

27. Dengjel J., Schoor O., Fischer R., Reich M., Kraus M., Muller M., Kreyborg K., Altenberend F., Brandenburg J., Kalbacher H., Brock R., Driessen C., Rammensee H.-G., Stevanovic S. Autophagy promotes MHC class II presentation of peptides from intracellular source proteins. *Proc. Natl Acad. Sci.*, 2005, Vol. 102, no 22, pp. 7922-7927.

28. Denning N.L., Aziz M., Gurien S.D., Wang P. DAMPs and NETs in Sepsis. *Front. Immunol.*, 2019, Vol. 10, 2536. doi.org/10.3389/fimmu.2019.02536.

29. Dupont N., Jiang S., Pilli M., Ornatowski W., Bhattacharya D., Deretic V. Autophagy-based unconventional secretory pathway for extracellular delivery of IL-1 β . *EMBO J.*, 2011, Vol. 30, no. 23, pp. 4701-4711.

30. Fayyaz A., Kurien B.T., Scofield R.H. Autoantibodies in Sjögren's syndrome. *Rheum. Dis. Clin. North Am.*, 2016, Vol. 42, no. 3, pp. 419-434.

31. Ferwerda G., Girardin S.E., Kullberg B.-J., Le Bourhis L., de Jong D.J., Langenberg D.M.L., van Crevel R., Adema G.J., Ottenhoff T.H.M., van der Meer J.W., Netea M.G. NOD2 and Toll-Like Receptors Are Nonredundant Recognition Systems of Mycobacterium tuberculosis. *PLoS Pathog.*, 2005, Vol. 1, no. 3, e34. doi:10.1371/journal.ppat.0010034.

32. Foell D, Wittkowski H., Vogl T., Roth J. S100 proteins expressed in phagocytes: a novel group of damage-associated molecular pattern molecules. *J. Leukoc. Biol.*, 2007, Vol. 81, no. 1, pp. 28-37.

33. Franchi L., Eigenbrod T., Munoz-Planillo R., Nunez G. The inflammasome: a caspase-1-activation platform that regulates immune responses and disease pathogenesis. *Nat. Immunol.*, 2009, Vol. 10, no. 3, pp. 241-247.

34. Frangou E., Vassilopoulos D., Boletis J., Boumpas D.T. An emerging role of neutrophils and NETosis in chronic inflammation and fibrosis in systemic lupus erythematosus (SLE) and ANCA-associated vasculitides (AAV): implications for the pathogenesis and treatment. *Autoimmun. Rev.*, 2019, Vol. 18, no. 8, pp. 751-760.

35. Frey H., Schroeder N., Manon-Jensen T., Iozzo R.V., Schaefer L. Biological interplay between proteoglycans and their innate immune receptors in inflammation. *FEBS J.*, 2013, Vol. 280, no. 10, pp. 2165-2179.

36. Gasse P., Riteau N., Charron S., Girre S., Fick L., Pétrilli V., Tschopp J., Lagente V., Quesniaux V.F., Ryffel B., Couillin I. Uric acid is a danger signal activating NALP3 inflammasome in lung injury inflammation and fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 2009, Vol. 179, no. 10, pp. 903-913.

37. Gong T., Liu L., Jiang W., Zhou R. DAMP-sensing receptors in sterile inflammation and inflammatory diseases. *Nat. Rev. Immunol.*, 2020, Vol. 20, no. 2, pp. 95-112. doi:10.1038/s41577-019-0215-7.

38. Goodall K.J., Poon I.K., Phipps S., Hulett M.D. Soluble heparan sulfate fragments generated by heparanase trigger the release of pro-inflammatory cytokines through TLR-4. *PLoS One*, 2014, Vol. 9, no. 10, e109596. doi: 10.1371/journal.pone.0109596.

39. Grazioli S., Pugin J. Mitochondrial damage-associated molecular patterns: from inflammatory signaling to human diseases. *Front. Immunol.*, 2018, Vol. 9, 832. doi: 10.3389/fimmu.2018.00832.

40. Guéry L., Hugues S. Tolerogenic and activatory plasmacytoid dendritic cells in autoimmunity. *Front. Immunol.*, 2013, Vol. 4, 59. doi: 10.3389/fimmu.2013.00059.

41. Haas T., Metzger J., Schmitz F., Heit A., Muller T., Lats E., Wagner H. The DNA sugar backbone 2 deoxyribose determines Toll-like receptor 9 activation. *Immunity*, 2008, Vol. 28, no. 3, pp. 315-323.

42. Hamada T., Torikai M., Kuwazuru A., Tanaka M., Horai N., Fukuda T., Yamada S., Nagayama S., Hashiguchi K., Sunahara N., Fukuzaki K., Nagata R., Komiya S., Maruyama I., Fukuda T., Abeyama K. Extracellular high mobility group box chromosomal protein 1 is a coupling factor for hypoxia and inflammation in arthritis. *Arthritis Rheum.*, 2008, Vol. 58, no. 9, pp. 2675-2685.

43. He S., Liang Y., Shao F., Wang X. Toll-like receptors activate programmed necrosis in macrophages through a receptor-interacting kinase-3-mediated pathway. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 2011, Vol. 108, no. 50, pp. 20054-20059.

44. Hoffman H.M., Wanderer A.A. Inflammasome and IL-1 β -mediated disorders. *Curr. Allergy Asthma Rep.*, 2010, Vol. 10, no. 4, pp. 229-235.

45. Huang Q., Ma Y., Adebayo A., Pope R.M. Increased macrophage activation mediated through toll-like receptors in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.*, 2007, Vol. 56, no. 7, pp. 2192-2201.

46. Iwasaki A, Medzhitov R. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nat. Immunol.*, 2004, Vol. 5, no. 10, pp. 987-995.

47. Iwasaki A., Medzhitov R. Regulation of adaptive immunity by the innate immune system. *Science*, 2010, Vol. 327, pp. 291-295.
48. Iyer S.S., Pulsikens W.P., Sadler J.J., Butter L.M., Teske G.J., Ulland T.K., Eisenbarth C., Florquin S., Flavell R.A., Leemans J.S., Sutterwala F.S. Necrotic cells trigger a sterile inflammatory response through the Nlrp3 inflammasome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2009, Vol. 106, no. 48, pp. 20388-20393.
49. Jahr S., Hentze H., Englisch S., Hardt D., Fackelmayer F.O., Hesch R.D., Knippers R. DNA fragments in the blood plasma of cancer patients: quantitations and evidence for their origin from apoptotic and necrotic cells. *Cancer Res.*, 2001, Vol. 61, no. 4, pp. 1659-1665.
50. Janeway C.A. Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, 1989, Vol. 54, Pt 1, pp. 1-13.
51. Jiang D., Liang J., Noble P.W. Hyaluronan in tissue injury and repair. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 2007, Vol. 23, pp. 435-461.
52. Kaczmarek A., Vandenabeele P., Krysko D.V. Necroptosis: the release of damage-associated molecular patterns and its physiological relevance. *Immunity*, 2013, Vol. 38, no. 2, pp. 209-223.
53. Kawai T., Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat. Immunol.*, 2010, Vol. 11, no. 5, pp. 373-384.
54. Kim Y.M., Brinkmann M.M., Paquet M., Ploegh H.L. UNC93B1 delivers nucleotide-sensing toll-like receptors to endolysosomes. *Nature*, 2008, Vol. 452, pp. 234-238.
55. Kono H., Chen C.J., Ontiveros F., Rock K.L. Uric acid promotes an acute inflammatory response to sterile cell death in mice. *J. Clin. Invest.*, 2010, Vol. 120, no. 6, pp. 1939-1949.
56. Kroemer G., Galluzzi L., Kepp O., Zitvogel L. Immunogenic cell death in cancer therapy. *Annu. Rev. Immunol.*, 2013, Vol. 31, pp. 51-72.
57. Lamkanfi M., Dixit V.M. Manipulation of host cell death pathways during microbial infections. *Cell Host Microbe*, 2010, Vol. 8, no. 1, pp. 44-54.
58. Lämmermann T., Afonso P.V., Angermann B.R., Wang J.M., Kastentmüller W., Parent C.F., German R.N. Neutrophil swarms require LTB4 and integrins at sites of cell death *in vivo*. *Nature*, 2013, Vol. 498, pp. 371-375.
59. Land W.G. Role of damage-associated molecular patterns in light of modern environmental research: a tautological approach. *Int. J. Environ. Res.*, 2020, Vol. 14, no. 5, pp. 583-604.
60. Land W.G. The role of Damage-Associated Molecular Patterns (DAMPs) in human diseases part II: DAMPs as diagnostics, prognostics and therapeutics in clinical medicine. *Sultan Qaboos University Med J.*, 2015, Vol. 15, Iss. 2, pp. e157-e170.
61. Land W.G. Role of damage-associated molecular patterns in human diseases Part I – Promoting inflammation and immunity. *Sultan Qaboos University Med J.*, 2015, Vol. 15, Iss. 1, pp. e9-e21
62. Langan D., Rose N.R., Moudgil K.D. Common innate pathways to autoimmune disease. *Clin. Immunol.*, 2020, Vol. 212, 108361. doi: 10.1016/j.clim.2020.108361.
63. Lee H.K., Lund J.M., Ramanathan B., Mizushima N., Iwasaki A. Autophagy-dependent viral recognition by plasmacytoid dendritic cells. *Science*, 2007, Vol. 315, pp. 1398-1401.
64. Li W., Deng M., Loughran P.A., Yang M., Lin M., Yang C., Gao W., Jin S., Li S., Cai J., Lu B., Billiar T.R., Scott M.J. LPS Induces Active HMGB1 release from hepatocytes into exosomes through the coordinated activities of TLR4 and Caspase-11/GSDMD Signaling. *Front. Immunol.*, 2020, Vol. 11, 229. doi: 10.3389/fimmu.2020.00229.
65. Lu H.Y., Ma J.L., Shan J.Y., Zhang J., Wang Q.X., Zhang Q. High-mobility group box-1 and receptor for advanced glycation end products in preterm infants with brain injury. *World J. Pediatr.*, 2016, Vol. 13, no. 3, pp. 228-235.
66. Maeda A., Fadeel B. Mitochondria released by cells undergoing TNF- α -induced necroptosis act as danger signals. *Cell Death Dis.*, 2014, Vol. 5, no. 7, e1312. doi: 10.1038/cddis.2014.277.
67. Marichal T., Ohata K., Bedoret D., Mesnil C., Sabatel C., Kobiyama K., Lekeux P., Coban C., Akira S., Ishii K.J., Bureau F., Desmet C.J. DNA released from dying host cells mediates aluminum adjuvant activity. *Nat. Med.*, 2011, Vol. 17, no. 8, pp. 996-1002.
68. Marshak-Rothstein A., Rifkin I.R. Immunologically active autoantigens: the role of toll-like receptors in the development of chronic inflammatory disease. *Annu. Rev. Immunol.*, 2007, Vol. 25, pp. 419-441.
69. Martinon F., Mayor A., Tschopp J. The inflammasomes: guardians of the body. *Annu. Rev. Immunol.*, 2009, Vol. 27, pp. 229-265.
70. Matzinger P. The danger model: a renewed sense of self. *Science*, 2002, Vol. 296, no. 5566, pp. 301-305.
71. Matzinger P. Tolerance, danger, and the extended family. *Annu. Rev. Immunol.*, 1994, Vol. 12, pp. 991-1045.
72. McCachren S.S., Lightner V.A.. Expression of human tenascin in synovitis and its regulation by interleukin-1. *Arthritis Rheum.*, 1992, Vol. 35, no. 10, pp. 1185-1196.
73. McDonald B., Pittman K., Menezes G.B., Hirota S. A., Slaba I., Waterhouse C.C., Beck P.L., Muruve D.A., Kubes P. Intravascular danger signals guide neutrophils to sites of sterile inflammation. *Science*, 2010, Vol. 330, pp. 362-366.
74. Medzhitov R., Janeway C.A. Innate immunity: impact on the adaptive immune response. *Curr. Opin. Immunol.*, 1997, Vol. 9, pp. 4-9.

75. Medzhitov R., Preston-Hurlburt P., Janeway C.A. A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature*, 1997, Vol. 388, no. 6640, pp. 394-397.
76. Merline R., Moreth K., Beckmann J., Nastase M.V., Zeng-Brouwers J., Tralhão J.G., Lemarchand P., Pfeilschifter J., Schaefer R.M., Iozzo R.V., Schaefer L. Signaling by the matrix proteoglycan decorin controls inflammation and cancer through PDCD4 and microRNA-21. *Sci. Signal.*, 2011, Vol. 4, no. 199, ra75. doi: 10.1126/scisignal.2001868.
77. Midwood K., Sacre S., Piccinini A.M., Inglis J., Trebault A., Chan E., Drexler S., Sofat N., Kashiwagi M., Orend G., Brennan F., Foxwell B. Tenascin-C is an endogenous activator of Toll-like receptor 4 that is essential for maintaining inflammation in arthritic joint disease. *Nat. Med.*, 2009, Vol. 15, no. 7, pp. 774-780.
78. Montico B., Nigro A., Casolaro V., Dal Col J. Immunogenic apoptosis as a novel tool for anticancer vaccine development. *Int. J. Mol. Sci.*, 2018, Vol. 19, no. 2, 594. doi: 10.3390/ijms19020594.
79. Moreth K., Brodbeck R., Babelova A., Gretz N., Spieker T., Zeng-Brouwers J., Pfeilschifter J., Young M.F., Schaefer R.M., Schaefer L. The proteoglycan biglycan regulates expression of the B cell chemoattractant CXCL13 and aggravates murine lupus nephritis. *J. Clin. Invest.*, 2010, Vol. 120, no. 12, pp. 4251-4272.
80. Murao A., Aziz M., Wang H., Brenner M., Wang P. Release mechanisms of major DAMPs. *Apoptosis*, 2021, Vol. 26, no. 3-4, pp. 152-162.
81. Murao A., Brenner M., Aziz M., Wang P. Exosomes in sepsis. *Front. Immunol.*, 2020, Vol. 11, 2140. doi: 10.3389/fimmu.2020.02140.
82. O'Reilly S. Pound the alarm: danger signals in rheumatic diseases. *Clin. Sci.*, 2015, Vol. 128, no. 5, pp. 297-305.
83. Obeid M., Tesniere A., Ghiringhelli F., Fimia G.M., Apeto L., Perfettini J.L., Castedo M., Mignot G., Panaretakis T., Casares N., Metivier D., Larochette N., van Endert P., Ciccocanti F., Piacentini M., Zitvogel L., Kroemer G. Calreticulin exposure dictates the immunogenicity of cancer cell death. *Nat. Med.*, 2007, Vol. 13, no. 1, pp. 54-61.
84. Palm N.W., Medzhitov R. Pattern recognition receptors and control of adaptive immunity. *Immunol. Rev.*, 2009, Vol. 227, no. 1, pp. 221-233.
85. Pasare C., Medzhitov R. Toll-like receptors: linking innate and adaptive immunity. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 2005, Vol. 560, pp. 11-18.
86. Piccinini A.M., Midwood K.S. DAMPening inflammation by modulating TLR Signalling. *Mediators Inflamm.*, 2010, Vol. 2010, 672395. doi: 10.1155/2010/672395.
87. Pisetsky D.S. The translocation of nuclear molecules during inflammation and cell death. *Antioxid. Redox Signal.*, 2014, Vol. 20, no. 7, pp. 1117-1125.
88. Quintana F.J., Cohen I.R. Heat shock proteins as endogenous adjuvants in sterile and septic inflammation. *J. Immunol.*, 2005, Vol. 175, no. 5, pp. 2777-2782.
89. Rawson P.M., Molette C., Videtta M., Altieri L., Franceschini D., Donato T., Finocchi L., Propato A., Paroli M., Meloni F., Mastroianni C.M., d'Ettoire G., Sidney J., Sette A., Barnaba V. Cross-presentation of caspase-cleaved apoptotic self antigens in HIV infection. *Nat. Med.*, 2007, Vol. 13, no. 12, pp. 1431-1439.
90. Rice J.W., Veal J.M., Fadden R.P., Barabasz A.F., Partridge J.M., Barta T.E., Dubois G.L., Huang K.H., Mabbett S.R., Silinski M.A., Steed P.M., Hall S.E. Small molecule inhibitors of Hsp90 potentially affect inflammatory disease pathways and exhibit activity in models of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.*, 2008, Vol. 58, no. 12, pp. 3765-3775.
91. Rock K.L., Lai J.-J., Kono H. Innate and adaptive immune responses to cell death. *Immunol. Rev.*, 2011, Vol. 243, no. 1, pp. 191-205.
92. Roh J.S., Sohn D.H. Damage-associated molecular patterns in inflammatory diseases. *Immune Netw.*, 2018, Vol. 18, no. 4, e27. doi: 10.4110/in.2018.18.e27.
93. Sabbah A., Chang T.H., Harnack R., Frohlich V., Tominaga K., Dube P.H., Xiang Y., Bose S. Activation of innate immune antiviral responses by Nod2. *Nat. Immunol.*, 2009, Vol. 10, pp. 1073-1080.
94. Sancho D., Joffre O.P., Keller A.M., Rogers N.C., Martinez D., Falcon P.H., Rosewell I., Sousa C.R. Identification of a dendritic cell receptor that couples sensing of necrosis to immunity. *Nature*, 2009, Vol. 458, pp. 899-903.
95. Scaffidi P., Misteli T., Bianchi M.E. Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation. *Nature*, 2002, Vol. 418, no. 6894, pp. 191-195.
96. Schaefer L. Complexity of danger: the diverse nature of damage-associated molecular patterns. *J. Biol. Chem.*, 2014, Vol. 289, no. 51, pp. 35237-35245.
97. Schaefer L., Babelova A., Kiss E., Hausser H.J., Baliova M., Krzyzankova M., Marsche G., Young M.F., Mihalik D., Götte M., Malle E., Schaefer R.M., Gröne H.J. The matrix component biglycan is proinflammatory and signals through Toll-like receptors 4 and 2 in macrophages. *J. Clin. Invest.*, 2005, Vol. 115, no. 8, pp. 2223-2233.
98. Schroder K., Zhou R., Tschopp J. The NLRP3 inflammasome: a sensor for metabolic danger? *Science*, 2010, Vol. 327, pp. 296-300.

99. Schulz O., Diebold S.S., Chen M., Nöslund T.I., Nolte M.A., Alexopoulou L., Azuma Y.-T., Flavell R.A., Lijestrom P., Sousa C.R. Toll-like receptor 3 promotes cross-priming to virus-infected cells. *Nature*, 2005, Vol. 433, no. 7028, pp. 887-892.
100. Shi J., Gao W., Shao F. Pyroptosis: Gasdermin-mediated programmed necrotic cell death. *Trends Biochem. Sci.*, 2017, Vol. 42, no. 4, pp. 245-254.
101. Shi Y., Evans J.E., Rock K.L. Molecular identification of a danger signal that alerts the immune system to dying cells. *Nature*, 2003, Vol. 425, pp. 516-521.
102. Smiley S.T., King J.A., Hancock W.W. Fibrinogen stimulates macrophage chemokine secretion through Toll-like receptor 4. *J. Immunol.*, 2001, Vol. 167, no. 5, pp. 2887-2894.
103. Takaoka A., Wang Z., Choi M. K., Yanai H., Negishi H., Ban T., Lu Y., Miyagishi M., Kodama T., Honda K., Ohba Y., Taniguchi T. DAI (DLM-1/ZBP1) is a cytosolic DNA sensor and an activator of innate immune response. *Nature*, 2007, Vol. 448, no. 7152, pp. 501-505.
104. Tang D., Chen X., Kang R., Kroemer G. Ferroptosis: molecular mechanisms and health implications. *Cell Res.*, 2021, Vol. 31, no. 2, pp. 107-125.
105. Tang D., Kang R., Berghe T.V., Vandenabeele P., Kroemer G. The molecular machinery of regulated cell death. *Cell Res.*, 2019, Vol. 29, no. 5, pp. 347-364.
106. Tang D., Kang R., Coyne C.B., Zeh H., Lotze M.T. PAMPs and DAMPs: signal 0s that spur autophagy and immunity. *Immunol. Rev.*, 2012, Vol. 249, pp. 158-175.
107. Taniguchi N., Kawahara K.-I., Yone K., Hashiguchi T., Yamakuchi M., Goto M., Inoue K., Yamada S., Ijiri K., Matsunaga S., Nakajima T., Komiyama S., Maruyama I. High mobility group box chromosomal protein 1 plays a role in the pathogenesis of rheumatoid arthritis as a novel cytokine. *Arthritis Rheum.*, 2003, Vol. 48, no. 4, pp. 971-981.
108. Tian J., Avalos A.M., Mao S.-Y., Chen B., Senthil K., Wu H., Parroche P., Drabic S., Golenbock D., Sirois C., Hua J., An L.L., Audoly L., Rosa G.L., Bierhaus A., Naworth P., Marshak-Rothstein A., Crow M.K., Fitzgerald K.A., Latz E., Kiener P.A., Coyle A.J. Toll-like receptor 9-dependent activation by DNA-containing immune complexes is mediated by HMGB1 and RAGE. *Nat. Immunol.*, 2007, Vol. 8, no. 5, pp. 487-496.
109. Torchinsky M.B., Garaude J., Martin A.P., Blander J.M. Innate immune recognition of infected apoptotic cells directs TH17 cell differentiation. *Nature*, 2009, Vol. 458, no. 7234, pp. 78-82.
110. Uehara A., Fujimoto Y., Fukase K., Takada H. Various human epithelial cells express functional Toll-like receptors, NOD1 and NOD2 to produce anti-microbial peptides, but not proinflammatory cytokines. *Mol. Immunol.*, 2007, Vol. 44, no. 12, pp. 3100-3111.
111. Uehara A., Imamura T., Potempa J., Travis J., Takada H. Gingipains from *Porphyromonas gingivalis* synergistically induce the production of proinflammatory cytokines through protease-activated receptors with Toll-like receptor and NOD1/2 ligands in human monocytic cells. *Cell. Microbiol.*, 2008, Vol. 10, no. 5, pp. 1181-1189.
112. Uematsu S., Fujimoto K., Jang M.H., Yang B.-G., Jung Y.-J., Nishiyama M., Sato S., Tsujimura T., Yamamoto M., Yokota Y., Kiyono H., Miyasaka M., Ishii J., Akira S. Regulation of humoral and cellular gut immunity by lamina propria dendritic cells expressing Toll-like receptor 5. *Nat. Immunol.*, 2008, Vol. 9, no. 7, pp. 769-776.
113. Uhl M., O Kepp H., Jusforgues-Saklani H., Vicencio J.-M., Kroemer G., Albert M.L. Autophagy within the antigen donor cell facilitates efficient antigen cross-priming of virus-specific CD8⁺ T cells. *Cell Death Differ.* 2009, Vol. 16, no. 7, pp. 991-1005.
114. Urbanaviciute V., Furnrohr B.G., Meister S., Munoz L., Heyder P., de Marchis F., Bianchi M.E., Kirschning C., Wagner H., Manfredi A.A., Kalden J.R., Schett G., Rovere-Querini P., Herrmann M., Voll R.E. Induction of inflammatory and immune responses by HMGB1- nucleosome complexes: implications for the pathogenesis of SLE. *J. Exp. Med.*, 2008, Vol. 205, no. 13, pp. 3007-3018.
115. Vabulas R.M., Wagner H., Schild, H. Heat shock proteins as ligands of Toll-like receptors. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 2002, Vol. 270, pp. 169-184.
116. Volchuk A., Ye A., Chi L., Steinberg B.E., Goldenberg N.M. Indirect regulation of HMGB1 release by gasdermin D. *Nat. Commun.*, 2020, Vol. 11, no. 1, 4561. doi:10.1038/s41467-020-18443-3.
117. Walsh D., McCarthy J., O'Driscoll C., Melgar S. Pattern recognition receptors-molecular orchestrators of inflammation in inflammatory bowel disease. *Cytokine Growth Factor Rev.*, 2013, Vol. 24, no. 2, pp. 91-104.
118. Willingham S.B., Allen I.C., Bergstralh D.T., Brickey W.J., Huang M.T., Taxman D.J., Duncan J.A., Ting J.P. NLRP3 (NALP3, Cryopyrin) facilitates *in vivo* caspase-1 activation, necrosis, and HMGB1 release via inflammasome-dependent and -independent pathways. *J. Immunol.*, 2009, Vol. 183, no. 3, pp. 2008-2015.
119. Wu J., Chen Z.J. Innate immune sensing and signaling of cytosolic nucleic acids. *Annu. Rev. Immunol.*, 2014, Vol. 32, pp. 461-488.
120. Wynn T.A., Ramalingam T.R. Mechanisms of fibrosis: therapeutic translation for fibrotic disease. *Nat. Med.*, 2012, Vol. 18, no. 7, pp. 1028-1040.
121. Xu J., Zhang X., Pelayo R., Monestier M., Ammollo C.T., Semeraro F., Taylor F.B., Esmon N.L., Lupu F., Esmon C.T. Extracellular histones are major mediators of death in sepsis. *Nat. Med.*, 2009, Vol. 15, no. 11, pp. 1318-1321.
122. Yatim N., Cullen S., Albert M.L. Dying cells actively regulate adaptive immune responses. *Nat. Rev. Immunol.*, 2017, Vol. 17, no. 4, pp. 262-275.

123. Zelenay S., Reis Sousa C. Adaptive immunity after cell death. *Trends Immunol.*, 2013, Vol. 34, no. 7, pp. 329-335.
124. Zhang D. A toll-like receptor that prevents infection by uropathogenic bacteria. *Science*, 2004, Vol. 303, pp. 1522-1526.
125. Zhang Q., Kang R., Zeh H.J., Lotze M.T., Tang D. DAMPs and autophagy: cellular adaptation to injury and unscheduled cell death. *Autophagy*, 2013, Vol. 9, no. 4, pp. 451-458.
126. Zhang Q., Raoof M., Chen Y., Sumi Y., Sursal T., Junger W., Brohi K., Itagaki K., Hauser C.J. Circulating mitochondrial DAMPs cause inflammatory responses to injury. *Nature*, 2010, Vol. 464, no. 7285, pp. 104-107.
127. Zhong, Y., Kinio A., Saleh M. Functions of NOD-like receptors in human diseases. *Front. Immunol.*, 2013, Vol. 4, 333. doi: 10.3389/fimmu.2013.00333.
128. Zindel J., Kuberski P. DAMPs, PAMPs, and LAMPs in immunity and sterile inflammation. *Ann. Rev. Pathol.*, 2020, Vol. 15, pp. 493-518.

Автор:

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

Author:

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

Поступила 16.07.2022

Принята к печати 29.07.2022

Дата онлайн-публикации 18.11.2022

Received 16.07.2022

Accepted 29.07.2022

Date of publication online 18.11.2022

ОПРЕДЕЛЯЮЩАЯ РОЛЬ ТИМУСА В ИММУНОПАТОГЕНЕЗЕ АУТОИММУННЫХ, ОНКОЛОГИЧЕСКИХ И ИНФЕКЦИОННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

Козлов В.А.

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

Резюме. Материал, представленный в статье, базируется, прежде всего, на том, что тимус, являясь, вместе с костным мозгом, центральным органом иммунной системы, в котором образуются все популяции Т-клеток, которые после миграции из тимуса на периферию принимают участие в процессах формирования иммунного ответа ко всем антигенам вирусного, бактериального, тканевого происхождения, ко всем аллергенам. Это и есть принципиальное отличие тимуса от другого центрального органа костного мозга, в котором образуются другие участники иммунного ответа: дендритные клетки, макрофаги, В-лимфоциты. Кстати, в костном мозге образуются клетки, которые мигрируют в тимус, где и дифференцируются в Т-клеточные элементы. За последние 50 лет в литературе накопился громадный материал о ведущей роли иммунной системы в патогенезе практически всех социально значимых заболеваний современного человека, включая инфекционные и онкологические заболевания, атеросклероз, аутоиммунные и аллергические болезни. В то же время в представленных исследованиях показано, что ведущее положение в патогенезе этих заболеваний занимают нарушения в функциях различных популяций Т-клеток. Оказалось, что эти нарушения функций Т-клеток на периферии в различных органах в основном формируются на территории тимуса. Т. е. по существу, тимус является органом производителем Т-лимфоцитов с нарушенными функциональными активностями, которые при миграции на периферии и формируют иммунопатогенез указанных заболеваний. В настоящее время весь многокомпонентный арсенал методов иммунотерапии направлен на коррекцию нарушений тех же Т-клеток, различной популяционной принадлежности, на периферии, при этом не учитывая механизмы в тимусе, которые и индуцировали эти нарушения, еще до миграции клеток из тимуса. Очевидно, следует разрабатывать методы и способы коррекции этих нарушений на территории тимуса.

Ключевые слова: тимус, клетки-супрессоры, миграция Т-клеток, негативная селекция

Адрес для переписки:

Козлов Владимир Александрович
ФГБНУ «Научно-исследовательский институт
фундаментальной и клинической иммунологии»
630099, Россия, г. Новосибирск, ул. Ядринцевская, 14.
Тел.: 8 (383) 222-26-74.
Факс: 8 (383) 222-70-28.
E-mail: vakoz40@yandex.ru

Address for correspondence:

Vladimir A. Kozlov
Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology
14 Yadrintsevskaya St
Novosibirsk
630099 Russian Federation
Phone: +7 (383) 222-26-74.
Fax: +7 (383) 222-70-28.
E-mail: vakoz40@yandex.ru

Образец цитирования:

В.А. Козлов «Определяющая роль тимуса в иммунопатогенезе аутоиммунных, онкологических и инфекционных заболеваний» // Медицинская иммунология, 2023. Т. 25, № 1. С. 39-58.
doi: 10.15789/1563-0625-DRO-2591

© Козлов В.А., 2023

Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

V.A. Kozlov "Determining role of thymus in immune pathogenesis of autoimmune, oncological and infectious diseases", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2023, Vol. 25, no. 1, pp. 39-58.
doi: 10.15789/1563-0625-DRO-2591

© Kozlov V.A., 2023

The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License

DOI: 10.15789/1563-0625-DRO-2591

DETERMINING ROLE OF THYMUS IN IMMUNE PATHOGENESIS OF AUTOIMMUNE, ONCOLOGICAL AND INFECTIOUS DISEASES

Kozlov V.A.

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

Abstract. Research data presented in the article are based, mainly, on the concept that thymus, together with bone marrow represent the central organ of immune system being the source of all T cell populations that, following their migration from thymus to periphery, participate in development of immune response to any antigens of viral, bacterial and tissue origin, and to any allergens. This difference is principal, as opposed to the bone marrow which produces other members of immune response, i.e., dendritic cells, macrophages, B cells. E.g., the bone marrow also generates the cells which migrate to thymus where they undergo differentiation to the T cells. Over last 50 years, a plethora of data was accumulated on the leading role of immune system in pathogenesis of virtually all socially significant human diseases affecting the modern mankind, including infectious and malignant disorders, atherosclerosis, autoimmune and allergic diseases. Moreover, current studies show that the aberrant functions of different T cell populations play the leading role in pathogenesis of these diseases. These T cell disturbances in peripheral areas of different organs are proven to develop, mainly in the thymic area. Hence, thymus is a producing organ of T cells with altered functional activities which promote pathogenetic changes in these disorders. Currently, the entire set of immunotherapeutic approaches is aimed for correction of disturbances among the same T cells subpopulations at periphery, without taking into account thymic mechanisms which have induced these disturbances before their emigration from thymus. One should, therefore, develop novel methods and approaches to correct these alterations within thymic area.

Keywords: thymus, suppressor cells, T cell migration, negative selection

Современная клиническая иммунология касается проблем патогенеза всех наиболее значимых заболеваний современного человека, включая аллергические и аутоиммунные заболевания, атеросклероз и онкологические болезни. Однако все исследования по изучению механизмов иммунопатогенеза заболеваний проводятся по оценке изменений показателей иммунной системы на периферии. Это в основном и на первом месте в периферической крови и очень редко в периферических лимфоидных органах.

В то же время считается, что и тимус, и костный мозг являются центральными органами иммунной системы в организме, где роль периферийных органов принадлежит селезенке, лимфатическим узлам и различным лимфообразованиям, располагающимся в отдельных органах и тканях организма. К сожалению, в настоящее время клиническая иммунология не располагает четкой методологией решения проблем изучения функций этих центральных органов иммунной системы, так же как и методами их оценки.

Принципиальными различиями между двумя центральными органами иммунной системы яв-

ляется то, что костный мозг является местом и возникновения и обитания функционально различных клеточных популяций и субпопуляций, включая два вида основных стволовых клеток (полипотентные стволовые кроветворные клетки и стволовые мезенхимальные клетки), различного рода клеток коммитированных предшественников эритроидного, гранулоидного, макрофагального, тромбоцитарного, лимфоидного и предшественников других рядов направления дифференцировки этих стволовых клеток. В этом отношении костный мозг как единый орган, но со множеством его составляющих, еще ждет глубоких исследований, решающих проблему выяснения механизмов пролиферации и дифференцировки клеток разных популяций и субпопуляций, механизмов взаимодействий между этими клеточными составляющими. Относительно иммунной системы, то костный мозг является источником таких клеток иммунной системы, как макрофаг, дендритная клетка, В-лимфоцит и NK (клетка естественный киллер).

Другой центральный орган иммунной системы – тимус, является источником клеток только

одного ряда дифференцировки – Т-лимфоцитов. Можно задать много вопросов, почему такое «неравноправие», но ответ, по-видимому, пока один: кому-то так было надо. Древние греки очень почитательно относились к тимусу, обозначая место, только место, где, как потом выяснялось, располагается орган тимус, *thymos*, со многими возможными уточнениями перевода, как то: добрая душа, страсть, сердце, жизненный принцип, прости жизнь. Если вдуматься, то все эти определения в той или иной мере соответствуют (по человеческим понятиям) действительной роли тимуса в организме на протяжении всей его жизни.

И здесь все-таки следует отметить главенствующую роль костного мозга, ибо происходят все тимоциты, а потом и все Т-лимфоциты на периферии, из клеток предшественников, мигрировавших в тимус из костного мозга.

После появления в тимусе костномозговых клеток предшественников происходит ряд дифференцировочных событий, которые заканчиваются накоплением в тимусе Т-клеток с потенциальными способностями стать на периферии клетками помощниками различной направленности, (Th) клетками, цитотоксическими лимфоцитами (CTL) и регуляторными Т-клетками (Treg). Предшественники из костного мозга сначала дифференцируются в CD4⁺CD8⁻ “doublenegative” (DN) предшественники (составляют 5% от общего числа клеток в тимусе), которые в коре тимуса претерпевают процессы спецификации и дифференцировки. После продуктивной реаранжировки сегмента гена Т-клеточного рецептора β (ТКРβ) DN-timoциты коэкспрессируют рецепторы CD4 и CD8 и обозначаются как “doublepositive” (DP) (составляют 80% от общего числа клеток в тимусе), которые претерпевают реаранжировку ТКРα и процесс заканчивается экспрессией функционального ТКРαβ гетеродимера со способностью последнего сканировать аутопептид / ГКГС комплексы, презентируемые кортикальными тимическими эпителиальными клетками (кТЭК). В дальнейшем только те тимоциты выживают и дифференцируются в CD4⁺ и CD8⁺ “singlepositive”(SP) (составляют 15% от общего числа клеток в тимусе) в результате позитивной селекции, которые экспрессируют достаточной аффинности ТКР для комплексования с пептидами ГКГС I и II. В принципе, степень аффинности ТКР Т-клеток, прошедших позитивную селекцию, будет определять лимиты активации Т-клеток на периферии [55, 59]. После позитивной селекции тимоциты мигрируют в мозговое вещество тимуса, место формирования центральной толе-

рантности. В пределах мозгового вещества ТЭК и АПК мониторируют разнообразный набор аутопептидов, представляющих собой набор тканево-рестриктированных антигенов. При этом тимоциты с ТКР достаточно высокой аффинности апоптозируются через негативную селекцию, а с аффинностью менее выраженной дифференцируются в регуляторные Treg с установлением центральной толерантности [57]. Все эти комплексные процессы в тимусе позитивной и негативной селекции, обуславливающие создание центральной толерантности, направлены на сохранение специфического разнообразия аутореактивного репертуара ТКР, а в организме накапливается до более чем 10¹⁵ разнообразных ТКР в популяциях Т-клеток на периферии. На периферии популяция Т-клеток singlepositive CD4⁺ и CD8⁺ с этим набором ТКР составляет основу «рабочей команды» адаптивного иммунитета. Однако здесь перед ними встает, возможно, главнейшая задача – не прореагировать при миграции на периферию против собственных антигенов. Доказано, что при взаимодействии с антигенпрезентирующими клетками, Т-клетки реагируют с помощью ТКР на комплекс из антигенов ГКГС и эпитопа любого антигена, будь то чужеродный антиген, или аутоантиген. Вот здесь и сформирована целая система из разных клеточных элементов для ограничения реагирования Т-клеток на собственные, аутоантигены, на создание состояния иммунной толерантности. Следует подчеркнуть, что даже те Т-клетки, которые мигрировали из тимуса с экспрессией низко-аффинных рецепторов, которые должны будут реагировать на чужеродные антигены, в определенных условиях, на фоне возросшей экспрессии аутоантигенов, могут реагировать на них с последующей индукцией аутоиммунной реакции.

В тимусе, как в центральном органе иммунной системы, происходят главные клеточные процессы, обуславливающие создание в организме состояния иммунной толерантности к аутоантигенам, которая и обозначается как центральная толерантность. Сущность центральной толерантности заключается в клеточном отборе на основе двух физико-химических процессах: аффинности и авидности ТКР. В литературе порой эти процессы приравниваются друг к другу, хотя они характеризуют разную степень взаимодействия ТКР с молекулярной мишенью из антигенов ГКГС и эпитопа антигена. И все же это разные степени процесса: аффинность – термодинамическая характеристика, количественно описывающая силу взаимодействия антигена с антителом (ТКР с комплексом из белков ГКГС и антигена), это

степень специфического сродства между активным центром антитела и антигенного эпитопа; авидность – это прочность связи между антителом и антигеном. Величина авидности зависит от аффинности. Формально различают три степени аффинности. При низкой степени аффинности ТКР Т-клетки мигрируют на периферию, где формируют популяцию наивных Т-лимфоцитов. При высокой степени аффинности ТКР к аутоантигенам эти тимоциты погибают в тимусе в результате после контакта с эпителиальными клетками тимуса (ТЭК) и/или с дендритными клетками (ДК). При какой-то средней степени, по мнению одних авторов, тимоциты дифференцируются в регуляторные клетки Treg, которые потом мигрируют на периферию.

Следует отметить, что общая клеточность, состав ТЭК, антигенпрезентирующих дендритных клеток гемопоэтического происхождения (ДК) и В-клеток в тимусе изменяются с возрастом. Так, как и ТЭК и ДК играют определяющую роль в процессе формирования центральной толерантности, связанные с возрастом изменения в тимическом микроокружении, несомненно, будут воздействовать на процессы селекции тимоцитов, установления центральной толерантности и, следовательно, на характеристику Т-клеток мигрантов из тимуса на периферии. Так оно и происходит, скорее всего, ибо в результате изменений в процессе негативной селекции в тимусе, например, отмечается увеличение накопления в тимусе Treg [48, 81]. Предполагается, в условиях измененного с возрастом микроокружения в мозговом веществе тимуса Treg выживают в большем количестве, чем Tconv. Возможно, это связано со снижениями уровня сигнала от комплекса ГКГС II / эпитоп для ТКР и Т-клетки с ТКР низкой аффинности становятся анергичными и подвергаются апоптозу. Но этого сигнала хватает для индукции Treg из тимоцитов с ТКР средней аффинности. Но этой силы сигнала не хватает для индукции гибели в тимусе Т-клеток с ТКР высокой аффинности и часть из них, возможно, мигрирует на периферию, обуславливая увеличение аутоиммунных патологических процессов при старении организма.

При изучении роли тимуса в развитии различных иммунопатологических состояний следует учитывать процесс внутри тимуса, несомненно, вносящие свой вклад в иммунопатогенез заболеваний. Например, стоит обратить внимание на время начала миграции Treg из тимуса, которое у мышей ограничивается 3-мя сутками и удаление тимуса до этого срока приводит к развитию аутоиммунной патологии, а если позднее, то подоб-

ный эффект тимэктомии не прослеживается [76, 78]. Можно предполагать, что миграция Treg в более поздние сроки будет одной из возможных причин развития аутоиммунной патологии. И наоборот, более ранняя миграция из тимуса Treg будет способствовать, возможно, росту опухоли. Во всяком случае, на эту проблему стоит обратить внимание и попытаться разработать методу оценки миграции Treg из тимуса у людей. Крайне интересной представляется проблема ре-миграции в тимус с периферии зрелых Treg.

Сам процесс ремиграции описан и подробно обсужден в обзоре [95]. Однако остается неясной физиологическая его значимость и возможный вклад нарушения процесса в иммунопатогенез заболеваний. Предполагается, что ре-миграция в тимус зрелых Treg периферии тормозит развитие в тимусе собственных Treg, что может способствовать формированию аутоиммунной патологии [85, 116].

Тимус в иммунопатогенезе аутоиммунных заболеваний

В настоящее время описаны два гена, функционирующие в клетках тимуса, AIRE (autoimmune regulator) и FEZF2 (forebrain expressed zinc finger 2), продукты которых несут ответственность за формирование иммунной толерантности к аутоантигенам. Это они отвечают за презентацию ТЭК, ДК и В-клетками в тимусе эпитопов ауто-тканево-специфических антигенов (ТСА), беспорядочно экспрессированных соответствующих продуктов генов, при взаимодействии с которыми тимоциты с высокой аффинностью ТКР гибнут в тимусе, а интактные тимоциты с ТКР низкой аффинности и Treg мигрируют на периферию [95]. По-видимому, с активностью AIRE гена связана экспрессия более чем 3000 ТСА, представляющих собой только около 40% всех ТСА, экспрессированных в тимусе [22, 105]. С активностью AIRE гена связан также процесс формирования в тимусе популяции Treg [58]. Остается не выясненным вопрос о механизмах, когда в одном случае индуцируются Treg ТСА, связанными с AIRE, а в другом – индуцируется делеция Т-клеток [62, 112]. AIRE тем самым способствует формированию активной толерантности (при пассивной толерантности регистрируется делеция Т-клеток), обуславливая накопление в тимусе иммуносупрессорных Treg, особенно это касается раннего периода жизни [63, 129]. Обнаружено, что у AIRE-дефицитных мышей в первые 10-35 дней после рождения определяется уменьшенное количество Treg. При этом и у мышей, и у человека при дефиците AIRE значительно снижена иммуносупрессорная функция Treg [108]. Данные

подчеркивают значимое влияние гена AIRE в тимусе как на количество образованных Treg, так и на их качество. Можно только предполагать, что при функциональном дефиците AIRE, помимо увеличения миграции из тимуса T-клеток, не прошедших негативную селекцию, а может быть и за счет этого, снижается число клеток с промежуточной аффинностью ТКР, которые под влиянием AIRE должны были дифференцироваться в Treg. При этом, по-видимому, снижается сила сигнала от взаимодействия T-клеток с ТЭК, что и обуславливает понижение супрессорной активности образованных Treg.

Считается, что в тимусе только 1-3% ТЭК мозгового вещества экспрессируют AIRE-зависимые ТСА, и для контакта с ними T-клетки должны обладать высокой степенью подвижности для формирования толерантности. Показано, снижение подвижности проявляется в виде индукции аутоиммунной патологии [25]. Складывается впечатление, что любые, с виду незначительные нарушения в процессах функционирования всех клеточных элементов в тимусе, могут приводить к развитию аутоиммунной патологии. Например, блокада расщепления в аутофаговых пузырьках у мышей приводит к развитию аутоиммунного колита и поли-органному воспалению. При этом блокируется доставка пептидов к молекулам ГКГС II [3].

При нарушениях экспрессии гена AIRE (описано более 140 мутаций этого гена) у животных и у человека развивается аутоиммунный полигландулярный синдром типа 1 (APS1/APECED), который проявляется аутоиммунными нарушениями многих органов и гиперчувствительностью к муккозальным грибкам с подобием аутоиммунного ответа к IL-17, IFN α и другим цитокинам [27, 75]. Данный синдром обозначают как autoimmune polyendocrine disease andidiiasis-epidermal dystrophy (APECED) со сниженной активностью Treg [45]. Заболевание характеризуется мультиорганным аутоиммунитетом, чувствительностью к «фирменным» инфекциям и хроническим кожно-слизистыми кандидамикозам [11].

Показано, что в человеческой популяции определяется одна мутация AIRE гена на 1000 [80], что предполагает широкое участие дисфункции гена AIRE в патогенезе аутоиммунных заболеваний у человека и в экспериментах на мышах. Нередко, нарушения механизмов центральной толерантности в тимусе сочетаются с нарушениями механизмов периферической толерантности, что в более яркой форме проявляется в развитии аутоиммунной патологии [8, 87]. У больных с APS-1 синдромом регистрируется более чем 30

различных манифестаций, из которых более 25 связаны с мишенями не эндокринных тканей. Участие в патогенезе сочетанных нарушений механизмов центральной и периферической толерантности соответствует мультиударной гипотезе развития аутоиммунных заболеваний [35].

Описано, что полиморфизм AIRE гена связан с такими заболеваниями, как спорадическая витилиго [113], ревматоидный полиартрит. Дефицит экспрессии AIRE гена определяется при тимоме у человека [69].

В условиях нарушенной экспрессии Fezf2 гена, так же как и в случае AIRE, развиваются аутоиммунные нарушения [56]. С нарушением экспрессии таких зависимых от Fezf2 белков, как Ttg Amy2a, связывают развитие ревматоидного полиартрита и аутоиммунного панкреатита [99]. Однако органы мишени в обоих случаях различаются между собой, практически не перекрещиваясь друг с другом. При этом FEZF2 ген контролирует экспрессию около 400 ТСА. Экспрессия примерно 1000 ТСА совместно контролируется AIRE и FEZF2. Недавно был описан еще один протеин Chd4 (chromodomain helicase DNA-binding protein 4), принимающий участие в экспрессии ТСА в тимусе совместно с FEZF2 в 25% и совместно с AIRE – в 30% [117].

Данные свидетельствуют об участии TNF-рецепторов RANK, CD40 и LT β R в механизмах центральной толерантности и экспрессии ТСА. Первые два регулируют экспрессию AIRE гена и развитие мТЭК. Активность LT β R в большей степени реализуется через Fezf2. По-видимому, RANK/CD40 и LT β R регулируют индукцию различных ТСА через AIRE и Fezf2 соответственно. Интересно, что активность гена AIRE в основном касается ТСА секретируемых белков, а Fezf2 – внутриклеточных и мембранных белков [110].

Следует подчеркнуть, что различные иммунопатологические состояния могут развиваться при нарушениях функционирования телец Hassall, тимических нянь-клеток, тимических миелоидных клеток, ДК- и В-клеток [69]. Что касается Treg в тимусе, то показано, что нарушение связывания фактора транскрипции SATB1 в CD4⁺CD8⁺ клетках с ДНК приводит к дефициту Treg и развитию аутоиммунитета [54]. К развитию иммунопатологии могут приводить такие изменения в тимусе, как экспансия коркового вещества в мозговое, что типично для развития тимомы, ремиграция в тимус активированных T-клеток с периферии с атрофией тимуса, и первичным нарушением функций клеток коркового вещества тимуса [131]. Наконец, следует упомянуть, что с инволюцией тимуса в процессе старения повышается

риск развития аутоиммунной патологии [134]. В некоторых случаях, в результате мутационных процессов в тимусе ослабляются процессы адгезии между тимоцитами и АПК, нарушаются процессы позитивной и негативной селекции и возрастает миграционный поток Т-клеток из тимуса на периферию, где развивается олиго- или моноклональная лимфопролиферация, инфильтрация органов с развитием аутоантитело-опосредованной цитопении [41, 75, 97, 102]. Описан еще один механизм, способствующий негативному участию тимуса в патогенезе аутоиммунных заболеваний. Это касается обнаруженной обратной миграции зрелых Treg в тимуса (recirculating Treg), где они препятствуют *de novo* образованию Treg, снижая возможность IL-2 оказывать позитивный эффект на количество и активность вновь образующихся регуляторных клеток, что будет обуславливать уменьшение количества зрелых Treg на периферии. Последнее и будет способствовать развитию аутоиммунной патологии [114]. Показано, что рециркулирующей активностью обладают Treg, экспрессирующие рецептор к IL-18, отвечающему за экспрессию на клетках хемокинового рецептора CCR6, необходимого для процесса обратной миграции Treg в тимус [85].

Что касается возможной терапии аутоиммунных заболеваний через влияние на функции тимуса, то это должно касаться таких процессов, как интенсификация процесса взаимодействия эпителиальных и ДК с презентруемыми антигенами с Т-клетками для усиления процесса негативной селекции, а также увеличения образования Treg и их миграции на периферию. Имеются данные о негативном влиянии TGF- β на развитие и функции ТЭК. Оказалось, что блокада экспрессии TGF- β RII или системное введение ингибитора TGF- β RI обуславливало увеличение генерации ТЭК мозгового вещества тимуса (мТЭК) на фоне возросшей презентации ауто-тканево-специфических антигенов. При этом не было обнаружено влияния на ТЭК коркового вещества позитивной селекции, в то время блокада TGF- β оказывала позитивный, протективный эффект на развитие аутоиммунной реакции у мышей с деплецированными Treg на периферии [10]. Говоря о роли тимуса в аутоиммунной патологии, нельзя не упомянуть и миастению гравис, как аутоиммунное заболевание с антителами против ацетилхолиновых рецепторов, с развитием фолликулярной гиперплазией в тимусе [69].

Подводя итог возможному участию тимуса в индукции аутоиммунной патологии, следует отметить следующие моменты: нарушается функция ТЭК с последующим снижением презентации

числа эпитопов ТСА тимоцитам, так что часть клеток с высокоаффинным ТКР мигрирует из тимуса на периферию, где и индуцирует развитие аутоиммунной патологии. Как было сказано выше, ремиграция в тимус Treg также может обуславливать уменьшение вновь образованных в тимусе клеток Treg. Если учесть данные о снижении на периферии у больных с аутоиммунной патологией числа nTreg, то можно думать о нарушении их продукции в тимусе за счет изменений функции ТЭК на фоне увеличения дифференцировки тимоцитов в клетки с низко- и высокоаффинными ТКР с последующей миграцией миграции из тимуса. По крайней мере существует предположение, что при определенных ситуациях, например в процессе старения организма, часть клеток в тимусе с ТКР высокой аффинности, которые должны были погибнуть в процессе негативной селекции, остались живыми и дифференцировались в nTreg на фоне действия сигнала промежуточной силы [81].

Принимая во внимание данные о снижении супрессорной активности самих nTreg на периферии, то можно думать, что либо эти изменения произошли уже в тимусе, либо они были индуцированы на периферии факторами микроокружения в тех же лимфатических узлах, которые они заселяют после миграции из тимуса. Здесь следует думать о таких возможных механизмах, как снижение экспрессии уже в тимусе на Treg CD25 с уменьшением употребления этими клетками IL-2, который необходим для функционирования наивных Т-клеток. Нельзя исключить снижение на Treg экспрессии CTLA-4, одного из главных супрессорных факторов регуляторных клеток, действующих через механизм захвата с ДК молекул CD80 и CD86, в результате чего снижается стимулирующий эффект ДК на T_{eff}, участвующие в иммунном ответе [82, 122, 126]. Снижение супрессорной активности данной популяции Treg можно объяснить также снижением активности таких супрессорных молекул, как, TGF- β , IL-36, TIGIT, CD39, CD73, в норме принимающих активное участие в подавлении аутоиммунных реакции [127, 128].

Тимус в иммунопатогенезе онкологических заболеваний

Проблема противоопухолевого иммунитета и роли в нем тимуса как центрального органа иммунной системы непосредственно связана с другой проблемой, связанной с механизмами «убегания» опухоли от иммунной системы и роли тимуса в этом процессе.

Здесь следует четко обозначить следующее. Любая опухолевая клетка характеризуется нали-

чием на мембране и, возможно, внутри клетки двух видов антигенов: опухоль ассоциированные антигены (ОАА), которые следует относить к собственным (self) аутоантигенам, характеризующим не только опухолевые клетки, но и многие клетки здорового, нормального организма; опухоль специфические антигены (ОСА), не-оантигены, не собственные (non-self) антигены, которые определяют специфичность клеток данной конкретной опухоли [78]. Именно сочетание этих двух видов антигенов, по-видимому, и определяет всю сложность участия иммунной системы в противоопухолевом иммунитете, когда до 90% антигенных эпитопов на опухолевой клетки относятся к разряду «своих, родных» ОАА. Считается, что в клетках нормальных тканей ОАА экспрессируются на более низком уровне, по сравнению с опухолевыми клетками [9]. В принципе, уже этот факт может стать причиной реагирования на них Т-клеток даже с низкой аффинностью ТКР, не говоря уже о Т-клетках с высокоаффинным ТКР. Показано, что в принципе Т-клетки с низкой авидности ТКР могут узнавать опухолевые антигены и формировать цитотоксический ответ [16]. Почему иммунная система «молчит» про рост опухоли в организме? Следует учитывать, прежде всего, тот факт, что большая часть антигенов опухолевых клеток относится к разряду ОАА. Неучастие иммунной системы в формировании ответа к этим антигенам следует рассматривать с двух сторон: с точки зрения центральной, толерантности [88], которая формируется в тимусе, и периферической, формирование которой связано с активностью на периферии Treg [34]. Следует предположить, что либо ко всем ОАА была индуцирована толерантность в тимусе в результате гибели специфических Т-клеток в процессе негативной селекции, либо центральная толерантность была выработана к части ОАА, а к остальным ОАА толерантность была индуцирована на периферии с участием Treg. Можно указать несколько возможных механизмов, участвующих в процессе формирования периферической толерантности: периферическая клональная делеция [51], 1990), клональная анергия [90], подавление экспрессии TCR и CD8-молекул [90], а также активная супрессия или регуляция [93]. Последнее предположение кажется предпочтительней в силу наличия данных о возможности индукции иммунного противоопухолевого ответа с помощью введения Т-клеток с ТКР, специфическими против ОАА аутоантигенов [91]. Описана возможность реагирования Т-клеток с высокоаффинным ТКР на ОАА, экспрессируемыми опухолевыми клетка-

ми. Однако при этом регистрировались признаки деструкции клеток собственных тканей организма. То есть, по существу, развивалась аутоиммунная патология [50, 84].

Предполагается, что в случае меланомы у мышей отсутствие иммунного ответа против опухолевых антигенов, таких, например, как меланома-ассоциированные антигены (МАО), которые являются нормальными антигенами, экспрессируемыми в течение дифференцировки меланоцитов, связано с установлением к ним толерантности по центральному типу в тимусе с помощью гена AIRE. Показано, что экспрессия клетками mТЭК в тимусе у мышей TRP-меланоцит / меланома антигена сопровождается клональной делецией CD4⁺Т-клеток, специфических к TRP-1 антигену и ростом опухоли. У мышей с отсутствующим этим геном (AIRE^{-/-}) отмечалось торможением роста опухоли на фоне продукции антител к МАО и появления CD4⁺ и CD8⁺Т-клеток, специфических для МАО [118]. По мнению авторов это можно объяснить с точки зрения возможности миграции их тимуса Т-клеток, специфических к данным антигенам, которые и отвечают за формирование специфического, противоопухолевого иммунного ответа у мышей с меланомой. Отмечается, что у пациентов с меланомой гораздо реже регистрируется определенный единичный полиморфизм AIRE, связанный с уменьшенной стабильностью AIRE, чем среди здоровых пациентов [15]. Возможно, что в условиях нестабильности гена AIRE значительно реже подвергаются делеции в тимусе Т-клетки с TCR специфичными для аутоантигенов. При этом допускается, в данном случае возможна передифференцировка Treg в Tconven клетки с потерей супрессорной активности. И наоборот, в пределах опухолевого окружения часть Tconven могут, по-видимому, превращаться в Treg, усиливая супрессорную обстановку в опухоли [109].

При определенных условиях тимус может резервуаром опухолевых клеток, мигрирующих по кровяному руслу. Это регистрируется в случаях после воздействия химиопрепаратов или в процессе старения, которые оказывают значительное негативное влияние на функции различных клеточных элементов тимуса, включая возможную иммунную реакцию на опухолевые клетки [4, 83, 124].

Предполагается, что в опухолях накапливаются в основном Treg недавние мигранты из тимуса, взаимодействующие в тимусе с ТЭК с участием продуктов гена AIRE, а не популяция индуцированных из наивных Т-клеток Treg. Это может свидетельствовать о нарушении механизмов цен-

тральной толерантности в тимусе [47, 67, 121]. Если это так, то из тимуса могут мигрировать клетки, узнающие аутоантигены на опухолевых клетках, т. е. ОАА, а не ОСА. И именно в иммунном ответе к ОАА индуцируется накопление антиген-специфических Treg в опухоли. Кстати, подсчитано, что до 80-90% pTreg на периферии происходят из тимусного происхождения nTreg, неся в себе отпечаток последних [57, 86]. Возможно, они также участвуют в подавлении противоопухолевого иммунитета.

По всей вероятности, AIRE ограничивает противоопухолевый иммунитет не только у мышей, но и у человека. Аутоантитела у AIRE-дефицитных пациентов с APS1 заболеванием специфичны для многих (~ 20) опухолевых антигенов яичка [28], включая MAGE-AиMAGE-B членов фамилии, экспрессируемые клетками меланомы и других опухолей, а также не опухолевыми клетками яичек. Это является солидным доказательством поломы центральной толерантности к опухолевым антигенам, которые экспрессируются в нормальными тканями. Это также согласуется с данными, что мТЭК в тимусе экспрессируют целый ряд ОАА, включая MAGE-A1, MAGE-A3, MAGE-A4, NY-ESO, MART1, tyrosinase, MUC1, иCEA [13, 37]. Было обнаружено, что AIRE полиморфизм (rs1800520 SNP) с дестабилизацией AIRE mRNA ассоциируется с протекцией развития меланомы [15]. Это еще раз подчеркивает критическую роль AIRE в ограничении иммунного отторжения опухоли у человека. Складывается убеждение, что увеличенная экспрессия AIRE защищает организм от аутоиммунного реагирования, но способствует подавлению иммунного ответа к опухоли, в то время как сниженная экспрессия гена предрасполагает к развитию аутоиммунного реагирования, но способствует повышению противоопухолевого иммунитета. Показано, что дефицит активности AIRE-гена у TRP-1 TCRTg мышей подавляет рост трансплантированных клеток меланомы B16. Делеция AIRE⁺ мТЭК после введения анти-RANKL антител ингибирует клональную делецию TRP-1-специфических Т-клеток и способствует выживанию мышей в условиях трансплантации им опухолевых клеток [53]. Все эти данные говорят о том, что ген AIRE обуславливает ограничение противоопухолевого иммунитета через клональную делецию Т-клеток с противоопухолевой активностью. Кроме того, сниженная активность AIRE может отвечать за подавление развития Treg с реактивностью против специфичностей собственных опухолей, способствуя их дифференцировке в наивные Т-клетки. Предполагается, что AIRE

ген отвечает за активность Treg, определяемых в районе рака простаты [68].

Имеются данные, свидетельствующие о позитивном влиянии на развитие и количество мТЭК факторов суперсемейства TNF, включая RANKL (receptor activator of NF-κB ligand). RANKL, продуцируемый тимоцитами, особенно важен для функционирования мТЭК, экспрессирующих AIRE ген [111]. Было сделано предположение, что *in vivo* блокада RANKL может селективно и временно ингибировать развитие мТЭК с последующим изменением центральной толерантности у Т-клеток. Оказалось, что блокада *in vivo* RANKL нейтрализующими антителами обуславливала значительное уменьшение числа мТЭК, особенно экспрессирующих AIRE [53]. На мышях было показано, что анти-RANKL-воздействия приводили к увеличению пула меланома-специфических Т-клеток и увеличению продолжительности жизни опухолевых животных с меланомой. При этом авторы отмечали отсутствие всплеска аутоиммунных реакций, а также факт полного восстановления популяции мТЭК после отмены препаратов [53]. Показано, что у трансгенных мышей по ТКРκ TRP-1 AIRE дефицит обуславливает торможение роста трансплантируемой опухоли B16 и меланомы и значительно удлиняет сроки выживания. Деплеция AIRE⁺ мТЭК после введения анти-RANKL препаратов способствует сохранению TRP-1 специфических Т-клеток, которые не подвергаются негативной селекции в тимусе и мигрируют на периферию, оказывая противоопухолевый эффект [53]. Данные еще раз свидетельствуют о подавлении AIRE противоопухолевого иммунитета с помощью клональной делеции Т-клеток с противоопухолевой активностью.

Показано, что у взрослых мышей период полужизни клеток мТЭК равняется 2 неделям в течение которых в тимусе деплецируется более 80% мТЭК [31, 38, 53], что, по-видимому, достаточно для вмешательства в процесс обновления мТЭК в тимусе у мышей. Следовательно, по мнению авторов, селективная блокада RANKL временно подавляет выраженность центральной толерантности и индуцирует накопление Т-клеток на периферии со специфичностью для опухолевых антигенов, которые подвергались делеции в тимусе при нормальном функционировании RANKL. Ранее было показано, что ОАА многих опухолей экспрессируются мТЭК и высокоаффинные Т-клетки, узнающие эти ОАА, эффективно подвергаются делеции в тимусе [5, 118]. Выдвигается мнение, что краткосрочная, обратимая блокада мТЭК может быть использована в качестве мето-

да терапии опухолей за счет избегания делеции в тимусе антиген-специфических Т-клеток [53].

В последнее время накопились данные о противоопухолевом эффекте препарата denosumab, который эффективно используется для лечения остеопороза. Оказалось, что препарат действует на экспрессию AIRE в клетках тимуса, снижая выраженность последней через подавление активности RANKL. В поддержку анти-RANKL-повышения противоопухолевого эффекта имеются данные о том, что введение denosumab женщинам с остеопорозом каждые 6 мес. обуславливало повышение количества Т-клеток на периферии [92].

Очень важными представляются данные о совместном использовании анти-RANKL и anti-check-point препаратов. Описывается аддитивный противоопухолевый эффект анти-RANKL и анти-CTLA-4 при меланоме, CT26 карциноме прямой кишки, MCA1956 фибросаркоме, Tramp-C1 раке простаты и др. опухолях у мышей [103]. Имеются данные об аддитивном эффекте совместного использования анти-CTLA-4 и анти-RANKL препаратов у пациентов с метастазирующей меланомой с выраженным терапевтическим эффектом [1, 2, 7]. Кроме того, аддитивный противоопухолевый эффект был получен при совместном использовании анти-RANKL и анти-PD-1 или анти-PDL-1 препаратов, а также анти-RANKL и комплекса из анти-CTLA-4/PD-1 [1, 2].

Следовательно, в последних случаях речь о комплексном противоопухолевом эффекте полама как центральной толерантности, так и периферической. В первом случае в основе механизма действия лежит миграция из тимуса на периферию Т-клеток со специфичностью ТКР против эпитопов опухолевых ОАА. Во втором речь идет о подавлении супрессорной активности клеток, экспрессирующих CTLA-4, PD-1, PDL-1 молекулы. Кроме того, результаты этих исследований свидетельствуют в пользу мнения, что противоопухолевый иммунитет, в данных исследованиях, основан на реакции Т-клеток на ОАА, а не на ОСА. С одной стороны, в пользу этой точки зрения говорят данные о влиянии анти-RANKL, связанным с миграцией из тимуса тех Т-клеток с ТКР для аутоантигенов, которых не коснулась негативная селекция и тимус «выпустил» их на периферию. С другой стороны, показано, что довольно часто после действия антител против checkpoint молекул возникают аутоиммунные реакции. Это означает, что те же Treg в опухоли подавляли противоопухолевую активность Teff со специфичностью к ОАА, которые (ОАА) и уча-

ствовали в индукции аутоиммунитета, действуя на иммунный ответ к эпитопам антигенов, общих для клеток опухоли и нормальных тканей.

Остается открытым вопрос о неспособности иммунной системы подавить рост опухоли, несмотря на наличие у опухолевых клеток не только ОАА, но и ОСА, или неоантигенов, специфических для каждой опухоли, и которые не презентировались в тимусе mTЭК и значит к ним должен индуцироваться нормальный иммунный ответ по всем законам функционирования иммунной системы. Почему же такого ответа не формируется в организме и опухоль «прекрасно себя чувствует»? Здесь следует отметить несколько моментов с прямым и косвенным участием тимуса.

Прежде всего, следует думать об участии периферических рДК в этом процессе. Показано, что незрелые рДК с тканевым антигеном, экспрессирующие хемокиновый рецептор CCR9, могут мигрировать в тимус и там индуцировать деплецию Т-клеток по механизмам негативной селекции с последующей индукцией центральной толерантности к данному антигену [39]. Интересно, что эти же рДК с экспрессией CCR9 могут индуцировать образование Treg из наивных Т-клеток на периферии. Это может свидетельствовать об их участии и в индукции периферической толерантности [40]. Можно предположить, что в качестве антигенов, транспортируемых рДК в тимус, могут выступать ОСА, которые фагоцитируются рДК на периферии и в тимусе принимают участие в индукции центральной толерантности к этим неоантигенам за счет делеции антиген-специфических Т-клеток с участием в процессе mTЭК.

Не исключено, что подобно рДК в процесс ремиграции в тимуса могут принимать участие Т-лимфоциты. Литературные данные указывают на возможность миграции в тимус Т-клеток, активированных антигеном на периферии [6, 42, 104]. Более того, мигрировать в тимус с периферии могут зрелые Т-клетки с антигенами на своей поверхности с последующей индукцией центральной толерантности к этим антигенам [36, 116, 125].

Следует подчеркнуть, что для реагирования с участием ТКР для Treg достаточно более низкая доза антигена, чем для Teff, что говорит о более высокой чувствительности Treg к антигену [94]. Возможно, это очень важный момент для объяснения отсутствия должной реакции Teff на ОСА, количество которых на клетках опухоли значительно уступает количеству ОАА. По-видимому, это является дополнением к объяснению механизмов снижения противоопухолевого иммунитета, особенно с учетом данных о возможной ве-

дущей роли Treg к ОАА в подавлении иммунного ответа к антигенам опухоли. Возможное формирование этих механизмов подавления реакций иммунной системы на ОСА несомненно будут вносить свой вклад в создание благоприятных условий для роста опухоли в организме.

По-видимому, существуют другие механизмы подавления иммунной реакции на ОСА, только косвенно связанные с функцией тимуса, поскольку в них принимают участие Treg, либо мигрировавшие из тимуса на периферию, либо iTreg, возникшие на периферии под влиянием тех же nTreg. Достаточно много данных имеется в литературе о возможном подавлении иммунной реакции ко второму антигену, если последний вводился вместе с другим антигеном, к которому предварительно индуцировалось состояние иммунной толерантности после многократной его инъекции. Причем подобного рода результаты были описаны при использовании самых различных сочетаний антигенов: не аллергенные белок-белок, аллерген-аллерген, белок-аллерген и т. д. Феномен был обозначен как "bystander suppression" – свидетель подавления. Интересно, что при индукции *in vivo* толерантности к одному антигену регистрировалась подавление реагирования клеток иммунной системы на антигены, участвующих в воспалительном процессе, например, кишечника [25, 71]. При этом в презентации этих двух антигенов могли участвовать как различные АПК, так одни и те же АПК, презентующие оба антигена [115]. Более того, феномен «свидетель подавления» проявляется при презентации АПК двух различных эпитопов одного и того же антигена, которые распознаются различными Т-клетками и феномен обозначили как "linked-suppression" – сопряженное подавление, где в качестве супрессоров выступают анергичные, антиген-специфические CD4⁺Т-клетки [29, 65]. Можно себе представить, что подобного рода реагирования клеток иммунной системы может сопровождать и рост опухоли, когда на фоне имеющейся толерантности к ОАА формируется толерантность к ОСА по типу «свидетель подавления». Следует подчеркнуть, что в данных случаях в индукции толерантности к ОАА принимают участие, скорее всего, Treg местного расположения и толерантность не опосредуется делецией Т-клеток в тимусе, экспрессирующих ТКР, специфические для ОАА. Об этом могут свидетельствовать данные о появлении аутоиммунной реактивности у пациентов с опухолями после введения антител к checkpoint молекулам. Можно утверждать, что в опухолевом окружении находятся Teff со специфичностью к ОАА, ак-

тивность которых заблокирована клетками Treg. При подавлении активности Treg возрастает активность Teff в отношении как ОАА на клетках опухоли, что приводит к торможению развития опухоли, так и в отношении аутоантигенов на нормальных клетках, что обуславливает появление аутоиммунных реакций.

Уже более 50 лет тому назад [32] была сформулирована концепция "Infectious Tolerance". В принципе, данная концепция заключается в способности CD4⁺CD25⁺Treg индуцировать образование себе подобных клеток из наивных CD4⁺Т-клеток с экспрессией FoxP3-фактора, полноценной супрессорной активностью и специфичностью к различным антигенам. Это приводит к значительному усилению иммуносупрессорного статуса в организме. В механизмах данного превращения участвуют такие факторы, как TGF-β, внеклеточный аденозин, продукты катаболизма триптофан [14, 52, 100]. Интересно, что в зависимости от экспрессии интегринов Treg могут превращать наивные Т-клетки в разные субпопуляции Treg: при экспрессии α₄β₇-наивные CD4⁺Т-клетки превращаются в Tr1, продуцирующие IL-10, при экспрессии α₄β₁ – в Th3-подобные клетки, продуцирующие TGF-β [107].

Таким образом, можно предположить, что Treg, участвующие в подавление специфического иммунного ответа к ОАА через механизмы "infectious tolerance" будут индуцировать накопление новых Treg, способных ингибировать иммунные ответы к различным антигенам, включая ОСА.

Что же касается непосредственного участия тимуса в онкогенезе, то следует подчеркнуть два механизма. Это, прежде всего, «убегание» от механизмов негативной селекции в тимусе клеток Teff, по-видимому, с высокоаффинными рецепторами к ОАА, активность которых в районах опухолевого роста подавляется Treg с иммуносупрессорными функциями на фоне расширенного подключения в супрессорный процесс большего числа клеток Treg различного происхождения. Не следует исключить возможность гибели в результате негативной селекции в тимусе клеток эффекторов с высокоаффинными рецепторами к отдельным ОАА, которые не будут потенциальными участниками противоопухолевой иммунной реакции. С другой стороны, возможная миграция в тимус ДК и Т-клеток с эпитопами ОСА будет способствовать гибели Т-клеток в тимусе в результате негативной селекции, со специфическими для них ТКР, что, несомненно, отрицательно скажется на ответе у ОСА данной опухоли на фоне формирования к отдельным эпитомам

этих антигенов состояния иммунной толерантности с последующим снижением выраженности иммунного ответа. Нельзя пока исключить увеличенной миграции из тимуса процента Treg в процессе опухолевого роста, по сравнению с контрольными показателями. Кроме того, на периферии, под влиянием различных факторов микроокружения, возрастает пролиферативная активность клеток Treg с последующим увеличением их числа и усилением супрессорной активности отдельно взятой клетки.

Наконец, тимус, по-видимому, может оказывать влияние на рост опухоли в организме за счет продуцированного им ряда гуморальных факторов. Показано, что увеличение уровня у опухолевых мышей факторов тимического происхождения $PTM\alpha$ (prothymosin α) и T β 15b1 (thymosinbeta) обуславливают увеличение метастазирования в первом случае, и роста самой опухоли во втором [102].

Учитывая данные о возможной ремиграции в тимус клеток Treg с последующим подавлением производства новых Treg, можно думать, что при росте опухоли этот процесс нарушен и Treg не ремигрируют в тимус и не подавляют образование в тимусе новых регуляторных клеток. Скажем, это может обусловлено снижением уровня IL-18 в процессе роста опухоли, который и участвует в индукции процесса ремиграции [85]. Имеются данные, что при росте ряда опухолей в организме резко возрастает уровень IL-18BP, рецептор-ловушки для IL-18 с последующим понижением уровня цитокина и, возможно, уменьшением ремиграционной активности Treg [135].

Тимус в иммунопатогенезе инфекционных болезней

Достаточно большое разнообразие данных имеется в литературе о теснейшей взаимосвязи между инфекциями и индуцированными ими аутоиммунными патологиями [33]. По-видимому, не приходится сомневаться, что последний постулат базируется на многих исследованиях о негативном, патогенетическом влиянии инфекций на иммунную систему.

Можно считать, что основным признаком участия тимуса в патогенезе инфекционных заболеваний является атрофия тимуса. Причем атрофия в основном происходит за счет коркового вещества тимуса при практически полной сохранности мозгового вещества органа и регистрируется при таких инфекциях у человека и животных, как *AIDS*, *Rabies*, *Measles*, *Hepatitis*, *Ebola infection*, *Tularemia*, *Syphilis*, *Plasmodium chaubi*, *Schistosoma mansoni*, *Trichinella spiralis*, *Francisella tularensis*, *T. cruzi* и многих других [96]. Следует подчеркнуть,

что атрофию тимуса вызывают самые различные патогены, проникающие в орган, включая вирусы, бактерии, паразиты, грибки. В свою очередь, отмечается разнообразие механизмов индукции атрофии тимуса различными патогенами, в основе которых могут лежать нарушения функций как double- и single-позитивных тимоцитов, так и ТЭК, ДК, В-лимфоцитов. Подчеркивается, что кора тимуса является основной частью органа атрофического эффекта патогенов [66].

Данные свидетельствуют об участии нескольких механизмов в процессе атрофии. Это, прежде всего, глюкокортикоиды, вызывающих апоптоз тимоцитов через специфические рецепторы [46]. При ряде инфекций у мышей за процесс атрофии тимуса отвечают такие факторы, как TNF α , perforin, galectin-3, Fas / Fas-L взаимодействие [17, 20, 21, 120]. При атрофии тимуса у мышей регистрировалось снижение пролиферативного ответа тимоцитов в ответ на стимуляции Con-A и анти-CD3 антителами на фоне уменьшенной продукции IL-2 [61]. Помимо этого, в эпителиальных клетках тимуса отмечается целый ряд изменений в их активности, сопровождающие инфекционный процесс [96]. Было обнаружено, что атрофия тимуса при инфекционных процессах у животных и у человека, например, при HIV-инфекции характеризуется снижением числа недавних мигрантов из тимуса, оцениваемых по числу TREC позитивных клеток [23]. Следует подчеркнуть, что последнее событие регистрируется на фоне индуцированной этим вирусом атрофии тимуса [77]. Важными представляются данные об увеличении миграции из тимуса, по крайней мере при инфекциях у мышей, CD4⁺CD8⁺ тимоцитов [18], которые в норме должны дифференцироваться в CD4⁺ и CD8⁺ с дальнейшим прохождением негативной селекции, где часть тимоцитов с высокоаффинными ТКР должны погибнуть. Так как эти double-позитивные клетки не подвергаются негативной селекции, а они имеют ТКР разной аффинности и часть из них может обладать аутоагрессивной активностью и участвовать в индукции аутоиммунной патологии. Было найдено, что у больных с ВИЧ или вирусной инфекцией Эпштейн–Барра, у больных вирусным гепатитом В и С процент double-позитивных клеток может возрасть до 20% от общего числа циркулирующих в крови лимфоцитов [30, 49, 73] с характеристиками повышенной активности у мышей клеток памяти single-позитивных Т-клеток с увеличенной продукцией IFN γ [72].

Еще одни данные достойны пристального внимания. Речь идет о проникновении в тимус

целого ряда инфекционных агентов, включая вирусы HIV, SIV, лимфохориоменингита и др. [96]. Во-первых, факторы, выделяемые микробами, могут быть непосредственными индукторами гибели тимоцитов, как это показано в отношении бактериального ЛПС [77]. Тот же вирус HIV в тимусе вызывает гибель не только CD4⁺ клеток [108], но и ДК, и ТЭК [98, 106], что вносит вклад в выраженность атрофии данного органа. Интересно, что вирус лейкемии у мышей в тимусе размножается как в double-позитивных, так и в double-негативных, индуцируя апоптоз в инфицированных клетках тимуса задолго до наступления периода лейкемии на фоне большей гибели инфицированных клеток по сравнению с интактными клетками [132]. Приводя к структурным изменениям в тимусе инфекционные агенты меняют миграционную активность клеток тимуса, способствуя, например, увеличению миграции из тимуса на периферию CD4⁺CD8⁻ и CD4⁺CD8⁺ клеток [79]. В принципе, существует мнение, что повышенный процент этих клеток является показателем нарушенных функций тимуса.

Однако влияние проникновения в тимус инфекционных агентов не ограничивается этими механизмами. Одним из важнейших механизмов их эффекта заключается в индукции толерантности к антигенным эпитопам вирусов, бактерий и других микроорганизмов. Показано, что Т-клетки из тимуса животных, инфицированных *M. avian* или *M. tuberculosis*, отвечали субоптимально к соответствующим антигенам, по сравнению с клетками тимуса не инфицированных животных [77]. Т. е., по существу, здесь мы имеем дело с формированием ослабленного иммунного ответа к возбудителю за счет установления толерантности к отдельным эпитопам антигенов возбудителя.

К сожалению, сейчас нет четких методик определения у человека возбудителей в тимусе, что в значительной степени оказало бы содействие в установлении степени сформированного иммунодефицитного состояния при данной конкретной инфекции за счет оценки тех эпитопов, к которым не формируется иммунный ответ за счет гибели специфических к ним Т-клеток в результате действия негативной селекции.

Становится очевидным, что важнейшим моментом в проблеме участия тимуса в инфекционном процессе является провоцирование инфекционным агентом возникновения аутоиммунных реакций. Особенно четко это показано в отношении вируса Коксаки В, обладающего тропностью к клеткам поджелудочной железы, которому и приписывается его участие в индукции диабета

типа 1. Цепь событий разворачивается с попаданием вируса в железу, где он индуцирует гибель β, характеризуемой ядерным пикнозом. В результате из погибших клеток появляются антигены, к которым не вырабатывалось состояние иммунной толерантности. На эти антигены начинают реагировать Т-лимфоциты, обладающие цитотоксичностью в отношении клеток железы. Началу аутоиммунной реакции положено. Далее, вирус проникает в тимус либо непосредственно, минуя барьер, либо при транспортировке в тимус дендритных клеток, инфицированных вирусом. Затем следует два возможных события. К отдельным эпитопам антигенов вируса вырабатывается толерантность за счет гибели Т-клеток, специфичных для этих эпитопов, по законам негативной селекции, что определяет степень подавления иммунного ответа к вирусу с формированием частичного, специфического иммунодефицита. Кроме того, пребывание вируса в тимусе, как и многих других вирусов, обуславливает нарушение функционирования генов AIRE и FEZF2с результатом миграции на периферию того или иного количества Т-клеток с высокоаффинными рецепторами, с их потенциальной агрессивностью против аутоантигенов той же поджелудочной железы и индукцией аутоиммунной патологии. Здесь следует упомянуть данные о том, что органы мишени развития аутоиммунной патологии различны в зависимости от дефицита функционирования этих двух генов в тимусе [110]. Это показано в отношении вируса Коксаки в экспериментах, когда в тимусе не была обнаружена презентация отдельных инсулин-подобных антигенов, т. е. не была выработана толерантность. Не понятно также, какой из двух генов (AIRE или FEZF2) отвечает за индукцию толерантности к антигенам поджелудочной железы. Предполагается, что на периферии эти мигрировавшие Т-клетки, избежавшие процесса негативной селекции, будут реагировать на эти антигены в поджелудочной железе, поддерживая развитие диабета 1-го типа [43, 70]. Просматривается двойное участие тимуса в патогенезе диабета 1-го типа. С одной стороны, он отвечает за создание толерантности к эпитопам антигенов вируса, с другой стороны он «выпускает» на периферию клетки, агрессивные против антигенов поджелудочной железы.

Многочисленные данные свидетельствуют об активном участии тимуса в патогенезе заболевания, индуцированного вирусом COVID-19. В настоящее время остаются не ясными механизмы проникновения вируса в тимус. Один из основных рецепторов ACE2 (angiotensin-converting

enzyme 2), способствующий проникновению вируса в клетки, не определяется в тимусе [44]. Не исключается возможность проникновения вируса в тимус с помощью «троянского коня» в виде дендритных клеток с фагоцитированными частицами вируса и Т-лимфоцитов, у которых на периферии определяется экспрессия ACE2. Предполагается также возможность проникновения вируса в клетки тимуса через другой специфический рецептор CD147 [64, 123]. Можно считать, что следствием проникновения вируса в тимус с последующим негативным влиянием на функции его клеток, является миграция из тимуса на периферии не зрелых CD4⁺CD8⁻ и CD4⁺CD8⁺Т-клеток, склонных к индукции аутоиммунных реакций [133].

Было обнаружено, что у значительной части больных (у 66% из 50 пациентов) в различное время после начала заболевания COVID-19 отмечается не атрофия тимуса, а увеличение его размеров. Смертность среди этих пациентов была где-то в 5 раз ниже, по сравнению с пациентами без увеличения тимуса. Уровень IL-7 у них был выше пропорционально лимфопении, а увеличение уровня IL-6 вообще не отмечалось. Предполагается, что у этих пациентов увеличение размеров тимуса является компенсаторным процессом на развитие лимфопении [19]. По всей вероятности, последнее предположение может говорить об участии тимуса в механизмах нормализации лимфопении за счет клеток мигрантов из тимуса.

По всей вероятности, тимус в значительной мере отвечает за течение в более легкой форме заболевания вирусной инфекции COVID-19 у детей, по сравнению со взрослыми. Оказалось, что в тимусе детей, начиная с 1-го года жизни, в периваскулярных пространствах накапливаются плазматические клетки, синтезирующие антитела IgG3- и IgG1-субклассов, участвующих в нейтрализации вируса [89]. Отмечается, что у детей со сниженным питанием инволюция тимуса в результате инфекции вирусом более выражена, возможно, в результате индуцированного вирусом липидного шторма с накоплением метаболитов арахидоновой кислоты, из которых TxA₂ индуцирует апоптоз CD4⁺CD8⁺ тимоцитов через тромбоксановые рецепторы на незрелых тимоцитах. В принципе, липидный шторм более выраженно протекает у взрослых, зараженных вирусом [12].

Не приходится сомневаться в выраженной зависимости от функционального состояния тимуса течения заболевания, вызванной вирусом COVID-19: чем слабее он функционирует, тем тяжелее протекает заболевание. От состояния тимуса зависит и профилактические мероприятия.

При недостаточной функциональной активности тимуса рекомендуется применять вакцины в более высоких дозах или совместно с адъювантов [60, 119].

Нельзя не упомянуть об одном из тяжелейших осложнений заболеваний COVID-19 в виде самой различной аутоиммунной патологии, включая антифосфолипидный синдром, болезнь Kawasaki, системная красная волчанка и др. [22, 95, 130]. Многочисленные данные свидетельствуют о том, что лимфопения у пациентов является одним из основных симптомов, указывающих на тяжесть заболевания и его неблагоприятный исход. Учитывая тимусное происхождение Т-лимфоцитов в периферической крови, не приходится сомневаться участие тимуса в патогенезе данного, постковидных заболеваний. При этом выдвигаются два основных предположения о механизмах. На первом месте стоит положение о роли вируса в гиперстимуляции иммунной системы, приводящей в конце концов к развитию аутоиммунной патологии. Далее следует предположение о сходстве структуры эпитопов антигенов вируса и аутоантигенов, на которые отвечает иммунная система [22]. В то же время следует предположить возможность проникновения вируса в тимус либо непосредственно через тканевой барьер, либо с помощью «троянского коня – дендритных клеток и лимфоцитов». Чем это может закончиться: либо формированием центральной толерантности к эпитопам антигенов вируса с последующим снижением величины иммунного ответа к вирусу, либо миграцией на периферию Т-клеток с высокоаффинными рецепторами к эпитопам аутоантигенов и индукцией аутоиммунной реакции. Скорее всего, работают оба эти механизмы.

Заключение

Таким образом, представленные в статье литературные данные довольно убедительно говорят о весьма значимой, если не определяющей, роли тимуса в процессах возникновения указанных в статье патологий. Следует подчеркнуть, что весомая роль тимуса, как центрального органа иммунной системы организма, проявляется не только в индукции заболевания, но в течение заболевания, от состояния которой зависит и исход последнего. Осталось осветить очень важный, принципиально важный момент, касающийся терапии всех тех заболеваний, где тимус занимает ведущее место в иммунопатогенезе. Если согласиться с этим утвердительным положением, то тогда и о терапии следует думать, как о терапии тимуса и разрабатывать методы комплексных, корригирующих воздействий на функциональ-

ную активность данного органа, который должен стать основной мишенью таргетной иммунотерапии при самых различных заболеваниях, терапия которых носит подчас принципиально иной характер. В настоящее время мы лечим «периферию» иммунной системы, а должны лечить ее «центр». Если научимся, то можно будет подумать об излечении многих заболеваний, а не только о лечении.

Греки разделяли душу человеческую на три составляющие: душа бессмертная, душа злая, душа добрая. Первую они поместили в мозг, вторую в печень, а добрую душу они расположили за грудиной и назвали ее тимусом (θυμος – thymos). Так давайте научимся лечить «добрую душу» человека, чтобы умирал он не от болезней, а со спокойной триединой душой уходил из этого мира в...

Список литературы / References

1. Ahern E., Harjunpää H., O'Donnell J.S., Allen S., Dougall W.C., Teng M.W.L., Smyth M.J. RANKL blockade improves efficacy of PD1-PD-L1 blockade or dual PD1-PD-L1 and CTLA4 blockade in mouse models of cancer. *Oncoimmunology*, 2018, Vol. 7, no. 6, e1431088. doi: 10.1080/2162402X.2018.1431088.
2. Ahern E., Smyth M.J., Dougall W.C., Teng M.W.L. Roles of the RANKL-RANK axis in antitumour immunity – implications for therapy. *Nat. Rev. Clin. Oncol.*, 2018, Vol. 15, pp. 676-693.
3. Aichinger M., Wu C., Nedjic J., Klein L. Macroautophagy substrates are loaded onto MHC class II of medullary thymic epithelial cells for central tolerance. *J. Exp. Med.*, 2013, Vol. 210, no. 2, pp. 287-300.
4. Alix-Panabiers C., Schwarzenbach H., Pantel K. Circulating tumor cells and circulating tumor DNA. *Annu. Rev. Med.*, 2012, Vol. 63, pp. 199-215.
5. Bos R., van Duikeren S., van Hall T., Kaaijk P., Taubert R., Kyewski B., Klein L., Melief C.J., Offringa R. Expression of a natural tumor antigen by thymic epithelial cells impairs the tumor-protective CD4⁺ T-cell repertoire. *Cancer Res.*, 2005, Vol. 65, pp. 6443-6449.
6. Bosco N., Kirberg J., Cereedig R., Agenes F. Peripheral T cells in the thymus: have they just lost their way or do they do something? *Immunol. Cell Biol.*, 2009, Vol. 87, pp. 50-57.
7. Bostwick A.D., Salama A.K., Hanks B.A. Rapid complete response of metastatic melanoma in a patient undergoing ipilimumab immunotherapy in the setting of active ulcerative colitis. *J. Immunother. Cancer*, 2015, Vol. 3, 19. doi: 10.1186/s40425-015-0064-2.
8. Cetani F., Barbesino G., Borsari S., Pardi E., Cianferotti L., Pinchera A., Marcocci C. A novel mutation of the autoimmune regulator gene in an Italian kindred with autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy, acting in a dominant fashion and strongly cosegregating with hypothyroid autoimmune thyroiditis. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 2001, Vol. 86, pp. 4747-4752.
9. Cheever M.A., Allison J.P., Ferris A.S., Finn O.J., Hastings B.M., Hecht T.T., Mellman I., Prindiville S.A., Viner J.L., Weiner L.M., Matrisian L.M. The prioritization of cancer antigens: a national cancer institute pilot project for the acceleration of translational research. *Clin. Cancer Res.*, 2009, Vol. 15, pp. 5323-5337.
10. Chen W., ten Dijke P. Immunoregulation by members of the TGF[β] superfamily. *Nat. Rev. Immunol.*, 2016, Vol. 16, pp. 723-740.
11. Cheng M.H., Anderson M.S. Monogenic autoimmunity. *Annu. Rev. Immunol.*, 2012, Vol. 30, pp. 393-427.
12. Chiang K.C., Kalantar-Zadeh K., Gupta A. Thymic dysfunction and atrophy in COVID-19 disease complicated by inflammation, malnutrition and cachexia. *Nutr. Health*, 2022, Vol. 28, no. 2, pp. 199-206.
13. Cloosen S., Arnold J., Thio M., Bos G.M.J., Kyewski B., Germeraad W.T.V. Expression of tumor-associated differentiation antigens, MUC1 glycoforms and CEA, in human thymic epithelial cells: Implications for self-tolerance and tumor therapy. *Cancer Res.*, 2007, Vol. 67, pp. 3919-3926.
14. Cobbold S.P., Adams E., Farquhar C.A., Nolan K.F., Howie D., Lui K.O., Fairchild P.J., Mellor A.L., Ron D., Waldmann H. Infectious tolerance via the consumption of essential amino acids and mTOR signaling. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 2009, Vol. 106, no. 29, pp. 12055-12060.
15. Conteduca G., Ferrera F., Pastorino L., Fenoglio D., Negrini S., Sormani M.P., Indiveri F., Scarrà G.B., Filaci G. The role of AIRE polymorphisms in melanoma. *Clin. Immunol.*, 2010, Vol. 136, no. 1, pp. 96-104.
16. Cordaro T.A., de Visser K.E., Tirion F.H., Schumacher T.N.M., Kruisbeek A.M. Can the low-avidity self-specific T cell repertoire be exploited for tumor rejection? *J. Immunol.*, 2002, Vol. 168, no. 2, pp. 651-660.
17. Correa-de-Santana F., Paez-Pereda M., Theodoropoulou M., Gruebler Y., Nihei O.K., Bozza M., Arzt E., Villa-Verde D.M.S., Renner U., Stalla J., Stalla G.K., Savino W. Hypothalamus-pituitary-

adrenal axis during *Trypanosoma cruzi* acute infection in mice. *J. Neuroimmunol.*, 2006, Vol. 173, pp. 12-22.

18. Cotta-de-Almeida V., Mendes-da-Cruz D.A., Bonomo A., Savino W. Acute *Trypanosoma cruzi* infection modulates intrathymic contents of extracellular matrix ligands and receptors and alters thymocyte migration. *Eur. J. Immunol.*, 2003, Vol. 33, pp. 2439-2448.

19. Cuvelier P., Roux H., Couëdel-Courteille A., Dutrieux J., Naudin C., de Muylder B.C., Cheynier R., Squara P., Marullo S. Protective reactive thymus hyperplasia in COVID-19 acute respiratory distress syndrome. *Crit. Care*, 2021, Vol. 25, no. 1, pp. 4-10.

20. de Meis J., Mendes-da-Cruz D.A., Farias-de-Oliveira D.A., Correa-de-Santana E., Pinto-Mariz F., Cotta-de-Almeida V., Bonomo A., Savino W. Atrophy of mesenteric lymph nodes in experimental Chagas' disease: Differential role of Fas/Fas-L and TNFR1/TNF pathways. *Microbes Infect.*, 2006, Vol. 8, pp. 221-231.

21. de Meis J., Farias-de-Oliveira D.A., Nunes Panzenhagen P.H., Maran N., Villa-Verde D.M.S., Morrot A., Savino W. Thymus Atrophy and Double-Positive Escape Are Common Features in Infectious Diseases. *J. Parasitol. Res.*, 2012, 2012, 574020. doi: 10.1155/2012/574020.

22. Derbinski J., Schulte A., Kyewski B., Klein L. Promiscuous gene expression in medullary thymic epithelial cells mirrors the peripheral self. *Nat. Immunol.*, 2001, Vol. 2, no. 11, pp. 1032-1039.

23. Dotan A., Muller S., Kanduc D., David P., Halpert G., Shoenfeld Y. The SARS-CoV-2 as an instrumental trigger of autoimmunity. *Autoimm. Rev.*, 2021, Vol. 20, no. 4, 102792. doi: 10.1016/j.autrev.2021.102792.

24. Douek D.C., Betts M.R., Hill B.J., Little S.J., Lempicki R., Metcalf J.A., Casazza J., Yoder C., Adelsberger J.W., Stevens R.A., Baseler M.W., Keiser P., Richman D.D., Davey R.T., Koup R.A. Evidence for increased T cell turnover and decreased thymic output in HIV infection. *J. Immunol.*, 2001, Vol. 167, pp. 6663-6668.

25. Duke-Cohan J.S., Ishikawa Y., Yoshizawa A., Choi Y.I., Lee C.N., Acuto O., Kissler S., Reinherz E.L. Regulation of thymocyte trafficking by Tagap, a GAP domain protein linked to human autoimmunity. *Sci. Signal.*, 2018, Vol. 11, no. 534, eaan8799. doi: 10.1126/scisignal.aan8799.

26. Dunkin D., Berin C., Mondoulet L., Tobar S., Yeretssian G., Tordesillas L., Iuga A., Larcher T., Guillespie V., Benhamou P.-H., Colombel J.-F., Sampson H.A. Epicutaneous tolerance induction to a bystander antigen abrogates colitis and ileitis in mice. *Inflamm. Bowel Dis.*, 2017, Vol. 23, no. 11, pp. 1972-1982.

27. Finnish-German APECED Consortium. An autoimmune disease, APECED, caused by mutations in a novel gene featuring two PHD-type zinc-finger domains. *Nat. Genet.*, 1997, Vol. 17, no. 4, pp. 399-403.

28. Fishman D., Kisand K., Hertel C., Rothe M., Remm A., Pihlap M., Adler P., Vilo J., Peet A., Meloni A., Podkrajsek K.T., Battelino T., Bruslerud Ø., Wolff A.S.B., Husebye E.S., Kluger N., Krohn K., Ranki A., Peterson H., Hayday A., Peterson P. Autoantibody repertoire in APECED patients targets two distinct subgroups of proteins. *Front. Immunol.*, 2017, Vol. 8, 976. doi: 10.3389/fimmu.2017.00976.

29. Frasca L., Carmichael P., Lechler R., Lombardi G. Anergic T cells effect linked suppression. *Eur. J. Immunol.*, 1997, Vol. 27, no. 12, pp. 3191-3197.

30. Fritz E.A., Geisbert J.B., Geisbert T.W., Hensley L.E., Reed D.S. Cellular immune response to Marburg virus infection in cynomolgus macaques. *Viral Immunol.*, 2008, Vol. 21, no. 3, pp. 355-363.

31. Gäbler J., Arnold J., Kyewski B. Promiscuous gene expression and the developmental dynamics of medullary thymic epithelial cells. *Eur. J. Immunol.*, 2007, Vol. 37, pp. 3363-3372.

32. Gershon R.K., Kondo K. Infectious immunological tolerance. *Immunology*, 1971, Vol. 21, pp. 903-914.

33. Getts D.R., Chastain E.M., Terry R.L., Miller S.D. Virus infection, antiviral immunity, and autoimmunity. *Immunol. Rev.*, 2013, Vol. 255, no. 1, pp. 197-209.

34. Giganti G., Atif M., Mohseni Y., Mastronicola D., Grageda N., Povolieri G.A.M., Miyara M., Scottà C. Treg cell therapy: How cell heterogeneity can make the difference. *Eur. J. Immunol.*, 2021, Vol. 51, no. 1, pp. 39-55.

35. Goodnow C.C. Multistep pathogenesis of autoimmune disease. *Cell*, 2007, Vol. 130, pp. 25-35.

36. Gopinathan R., de Paz H.A., Oluwole O.O., Ali A.O., Garrovillo M., Engelstad K., Hardy M.A., Oluwole S.F. Role of reentry of *in vivo* alloMHC peptide-activated T cells into the adult thymus in acquired systemic tolerance. *Transplantation*, 2001, Vol. 72, pp. 1533-1541.

37. Gotter J., Brors B., Hergenbahn M., Kyewski B. Medullary epithelial cells of the human thymus express a highly diverse selection of tissue-specific genes colocalized in chromosomal clusters. *J. Exp. Med.*, 2004, Vol. 199, no. 2, pp. 155-166.

38. Gray D.J., Abramson J., Benoist C., Mathis D. Proliferative arrest and rapid turnover of thymic epithelial cells expressing Aire. *J. Exp. Med.*, 2007, Vol. 204, no. 11, pp. 2521-2528.

39. Hadeiba H., Lahl K., Edalati A., Oderup C., Habtezion A., Pachynski R., Nguyen L., Ghodsi A., Adler S., Butcher E.C. Plasmacytoid dendritic cells transport peripheral antigens to the thymus to promote central tolerance. *Immunity*, 2012, Vol. 36, no. 3, pp. 438-450.

40. Hadeiba H., Butcher E.C. Thymus-homing dendritic cells in central tolerance. *Eur. J. Immunol.*, 2013, Vol. 43, no. 6, pp. 1425-1429.

41. Halacli S.O., Ayvaz D.C., Sun-Tan C., Erman B., Uz E., Yilmaz D.Y., Ozgul K., Tezcan İ., Sanal O. STK4 (MST1) deficiency in two siblings with autoimmune cytopenias: a novel mutation. *Clin. Immunol.*, 2015, Vol. 161, no. 2, pp. 316-323.
42. Hale J.S., Fink P.J. Back to the thymus: peripheral T cells come home. *Immunol. Cell Biol.*, 2009, Vol. 87, no. 1, pp. 58-64.
43. Halouani A., Michaux H., Jmii H., Trussart C., Chahbi A., Martens H., Renard C., Aouni M., Hober D., Geenen V., Jaidane H. Coxsackievirus B4 Transplacental Infection Severely Disturbs Central Tolerogenic Mechanisms in the Fetal Thymus. *Microorganisms*, 2021, Vol. 9, no. 7, 1537. doi: 10.3390/microorganisms9071537.
44. Hamming I., Timens W., Bulthuis M.L.C., Lely A.T., Navis G.J., van Goor H. Tissue distribution of ACE2 protein, the functional receptor for SARS coronavirus. A first step in understanding SARS pathogenesis. *J. Pathol.*, 2004, Vol. 203, no. 2, pp. 631-637.
45. Hardtke-Wolenski M., Taubert R., Noyan F., Sievers M., Dywicky J., Schlue J., Falk C.S., Lundgren B.A., Scott H.S., Pich A., Anderson M.S., Manns M.P., Jaeckel E. Autoimmune hepatitis in a murine autoimmune polyendocrine syndrome type 1 model is directed against multiple autoantigens. *Hepatology*, 2015, Vol. 61, pp. 1295-1305.
46. Herold M.J., McPherson K.G., Reichardt H.M. Glucocorticoids in T cell apoptosis and function. *Cell. Mol. Life Sci.*, 2006, Vol. 63, pp. 60-72.
47. Hindley J.P., Ferreira C., Jones E., Lauder S.N., Ladell K., Wynn K.K., Betts G.J., Singh Y., Price D.A., Godkin A.J., Dyson J., Gallimore A. Analysis of the T-cell receptor repertoires of tumor-infiltrating conventional and regulatory T cells reveals no evidence for conversion in carcinogen-induced tumors. *Cancer Res.*, 2011, Vol. 71, pp. 736-746.
48. Hinterberger M., Aichinger M., da Costa O.P., Voehringer D., Hoffmann R., Klein L. Autonomous role of medullary thymic epithelial cells in central CD4⁺ T cell tolerance. *Nat. Immunol.*, 2010, Vol. 11, pp. 512-519.
49. Hughes G.J., Cochrane A., Leen C., Morris S., Bell J.E., Simmonds P. HIV-1-infected CD8⁺CD4⁺ T cells decay *in vivo* at a similar rate to infected CD4 T cells during HAART. *AIDS*, 2008, Vol. 22, no. 1, pp. 57-65.
50. Johnson L.A., Morgan R.A., Dudley M.E., Cassard L., Yang J.C., Hughes M.S., Kammula U.S., Royal R.E., Sherry R.M., Wunderlich J.R., Lee C.-C.R., Restifo N.P., Schwarz S.L., Cogdill A.P., Bishop R.J., Kim H., Brewer C.C., Rudy S.F., VanWaes C., Davis J.L., Mathur A., Ripley R.T., Nathan D.A., Laurencot C.M., Rosenberg S.A. Gene therapy with human and mouse T-cell receptors mediates cancer regression and targets normal tissues expressing cognate antigen. *Blood*, 2009, Vol. 114, pp. 535-546.
51. Jones L.A., Chin L.T., Longo D.L., Kruisbeek A.M. Peripheral clonal elimination of functional T cells. *Science*, 1990, Vol. 250, no. 4988, pp. 1726-1729.
52. Jonuleit H., Schmitt E., Kakirman H., Stassen M., Knop J., Enk A. Infectious tolerance human CD25⁺ regulatory T cells convey suppressor activity to conventional CD4⁺ T helper cells. *J. Exp. Med.*, 2002, Vol. 196, no. 2, pp. 255-260.
53. Khan I.S., Mouchess M.L., Zhu M.L., Conley B., Fasano K.J., Hou Y., Fong L., Su M.A., Anderson M.S. Enhancement of an anti-tumor immune response by transient blockade of central T cell tolerance. *J. Exp. Med.*, 2014, Vol. 211, no. 5, pp. 761-768.
54. Kitagawa Y., Ohkura N., Kidani Y., Vandenbon A., Hirota K., Kawakami R., Yasuda K., Motooka D., Nakamura S., Kondo M., Taniuchi I., Kohwi-Shigematsu T., Sakaguchi S. Guidance of regulatory T cell development by Satb1-dependent super enhancer establishment. *Nat. Immunol.*, 2017, Vol. 18, no. 2, pp. 173-183.
55. Klein L., Kyewski B., Allen P.M., Hogquist K.A. Positive and negative selection of the T Cell repertoire: What thymocytes see (and Don't See). *Nat. Rev. Immunol.*, 2014, Vol. 14, no. 6, pp. 377-391.
56. Klein L. Aire gets company for immune tolerance. *Cell*, 2015, Vol. 163, no. 4, pp. 794-795.
57. Klein L., Robey E.A., Hsieh C.S. Central CD4(+) T Cell tolerance: Deletion versus regulatory T Cell differentiation. *Nat. Rev. Immunol.*, 2019, Vol. 19, no. 1, pp. 7-18.
58. Laakso S.M., Laurinolli T.-T., Rossi L.H., Lehtoviita A., Sairanen H., Perheentupa J., Kekäläinen E., Arstila T.P. Regulatory T cell defect in APECED patients is associated with loss of naive FOXP3(+) precursors and impaired activated population. *J. Autoimmun.*, 2010, Vol. 35, no. 4, pp. 351-357.
59. Lancaster J.N., Li Y., Ehrlich L.I.R. Chemokine-mediated choreography of thymocyte development and selection. *Trends Immunol.*, 2018, Vol. 39, no. 2, pp. 86-98.
60. Lee J.K.H., Lam G.K.L., Shin T., Kim J., Krishnan A., Greenberg D.P., Chit A. Efficacy and effectiveness of high-dose versus standard-dose influenza vaccination for older adults: a systematic review and meta-analysis. *Expert Rev. Vaccines*, 2018, Vol. 17, no. 5, pp. 435-443.
61. Leite de Moraes M.C., Minoprio P., Dy M., Dardenne M., Savino W., Hontebeyrie-Joskowicz M. Endogenous IL-10 and IFN- γ production controls thymic cell proliferation in mice acutely infected by *Trypanosoma cruzi*. *Scand. J. Immunol.*, 1994, Vol. 39, pp. 51-58.
62. Leonard J.D., Gilmore D.C., Dileepan T., Nawrocka W.I., Chao J.L., Schoenbach M.H., Jenkins M.K., Adams E.J., Savage P.A. Identification of natural regulatory T Cell epitopes reveals convergence on a dominant autoantigen. *Immunity*, 2017, Vol. 47, no. 1, pp. 107-117.e108.

63. Lei Y., Ripen A.M., Ishimaru N., Ohigashi I., Nagasawa T., Jeker L.T., Bösl M.R., Holländer G.A., Hayashi Y., de Waal Malefyt R., Nitta T., Takahama Y. Aire-dependent production of XCL1 mediates medullary accumulation of thymic dendritic cells and contributes to regulatory T cell development. *J. Exp. Med.*, 2011, Vol. 208, no. 2, pp. 383-394.
64. Lins M.P., Smaniotto S. Potential impact of SARS-CoV-2 infection on the thymus. *Can. J. Microbiol.*, 2021, Vol. 67, no. 1, pp. 23-28.
65. Lombardi S., Sidhu S., Batchelor R., Lechler R. Anergic T cells as suppressor cells *in vitro*. *Science*, 1994, Vol. 264, no. 5165, pp. 1587-1599.
66. Luo M., Xu L., Qian Z., Sun X. Infection-associated thymic atrophy. *Front. Immunol.*, 2021, Vol. 12, 652538. doi: 10.3389/fimmu.2021.652538.
67. Malchow S., Leventhal D.S., Nishi S., Fischer B.I., Shen L., Paner G.P., Amit A.S., Kang C., Geddes J.E., Allison J.P., Socci N.D., Savage P.A. Aire-dependent thymic development of tumor-associated regulatory T cells. *Science*, 2013, Vol. 339, pp. 1219-1224.
68. Malchow S., Leventhal D.S., Lee V., Nishi S., Socci N.D., Savage P.A. Aire enforces immune tolerance by directing autoreactive T cells into the regulatory T cell lineage. *Immunity*, 2016, Vol. 44, no. 5, pp. 1102-1113.
69. Marx A., Yamada Y., Simon-Keller K., Schalke B., Willcox N., Ströbel P., Weis C.-A. Thymus and autoimmunity. *Semin. Immunopathol.*, 2021, Vol. 43, pp. 45-64.
70. Michaux H., Martens H., Jaïdane H., Halouani A., Hober D., Geenen V. How does thymus infection by coxsackievirus contribute to the pathogenesis of type 1 diabetes? *Front. Immunol.*, 2015 Jun 30, Vol. 6, 338. doi: 10.3389/fimmu.2015.00338.
71. Moldaver D.M., Bharhani M.S., Rudulier C.D., Wattie J., Inman M.D., Larche M. Induction of bystander tolerance and immune deviation after Fel d 1 peptide Immunotherapy. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2019, Vol. 143, no. 3, pp. 1087-1099.
72. Morrot A., Terra-Granado E., Perez A.R., Silva-Barbosa S.D., Milićević N.M., Farias-de-Oliveira D.A., Berbert L.R., de Meis J., Takiya C.M., Beloscar J., Wang X., Kont V., Peterson P., Bottasso O., Savino W. Chagasic thymic atrophy does not affect negative selection but results in the export of activated CD4⁺CD8⁺ T cells in severe forms of human disease. *PLoS Negl. Trop. Dis.*, 2011, Vol. 5, no. 8, e1268. doi: 10.1371/journal.pntd.0001268.
73. Nascimbeni M., Pol S., Saunier B. Distinct CD4⁺CD8⁺ double-positive T cells in the blood and liver of patients during chronic hepatitis B and C. *PLoS One*, 2011, Vol. 6, no. 5, e20145. doi: 10.1371/journal.pone.0020145.
74. Nagamine K., Peterson P., Scott H.S., Kudoh J., Minoshima S., Heino M., Krohn K.J., Lalioti M.D., Mullis P.E., Antonarakis S.E., Kawasaki K., Asakawa S., Ito F., Shimizu N. Positional cloning of the APECED gene. *Nat. Genet.*, 1997, Vol. 17, no. 4, pp. 393-398. doi: 10.1038/ng1297-393.
75. Nehme N.T., Schmid J.P., Debeurme F., André-Schmutz I., Lim A., Nitschke P., Rieux-Laucat F., Lutz P., Picard C., Mahlaoui N., Fischer A., de Saint Basile G. MST1 mutations in autosomal recessive primary immunodeficiency characterized by defective naive T-cell survival. *Blood*, 2012, Vol. 119, no. 15, pp. 3458-3468.
76. Nishizuka Y., Sakakura T. Thymus and reproduction: sex-linked dysgenesis of the gonad after neonatal thymectomy in mice. *Science*, 1969, Vol. 166, pp. 753-755.
77. Nobrega C., Nunes-Alves C., Cerqueira-Rodrigues B., Roque S., Barreira-Silva P., Behar S.M., Correia-Neves M. T cells home to the thymus and control infection. *J. Immunol.*, 2013, Vol. 190, no. 4, pp. 1646-1658.
78. Novellino L., Castelli C., Parmiani G. A listing of human tumor antigens recognized by T cells: March 2004 update. *Cancer Immunol. Immunother.*, 2005, Vol. 54, pp. 187-207.
79. Nunes-Alves C., Nobrega C., Behar S.M., Correia-Neves M. Tolerance has its limits: how the thymus copes with infection. *Trends Immunol.*, 2013, Vol. 34, no. 10, pp. 502-510.
80. Oftedal B.E., Hellesen A., Erichsen M.M., Bratland E., Vardi A., Perheentupa J., Kemp E.H., Fiskerstrand T., Viken M.K., Weetman A.P., Fleishman S.J., Banka S., Newman W.G., Sewell W.A.C., Sozaeva L.S., Zayats T., Haugarvoll K., Orlova E.M., Haavik J., Johansson S., Knappskog P.M., Løvås K., Wolff A.S.B., Abramson J., Husebye E.S. Dominant mutations in the autoimmune regulator AIRE are associated with common organ-specific autoimmune diseases. *Immunity*, 2015, Vol. 42, pp. 1185-1196.
81. Oh J., Weikan W., Thomas R., Su D.-M. Capacity of tTreg generation is not impaired in the atrophied thymus. *PLoS Biol.*, 2017, Vol. 15, no. 11, pp. 1-22.
82. Onishi Y., Fehervari Z., Yamaguchi T., Sakaguchi S. Foxp3⁺ natural regulatory T cells preferentially form aggregates on dendritic cells *in vitro* and actively inhibit their maturation. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 2008, Vol. 105, pp. 10113-10118.
83. Pantel K., Alix-Panabieres C. Circulating tumour cells in cancer patients: challenges and perspectives. *Trends Mol. Med.*, 2010, Vol. 16, pp. 398-406.
84. Parkhurst M.R., Yang J.C., Langan R.C., Dudley M.E., Nathan D.-A.N., Feldman S.A., Davis J.L., Morgan R.A., Merino M.J., Sherry R.M., Hughes M.S., Kammula U.S., Phan G.Q., Lim R.M., Wank S.A., Restifo N.P., Robbins P.F., Laurencot C.M., Rosenberg S.A. T Cells targeting carcinoembryonic antigen can mediate regression of metastatic colorectal cancer but induce severe transient colitis. *Mol. Ther.*, 2011, Vol. 19, pp. 620-626.

85. Peligero-Cruz C., Tal Givony T., Sebe-Pedros A., Dobes J., Kadouri N., Nevo S., Roncato F., Alon R., Goldfarb Y., Abramson J. IL-18 signaling promotes homing of mature Tregs into the thymus. *Life*, 2020, Vol. 9, e58213. doi: 10.7554/eLife.58213
86. Pohar J., Simon Q., Fillatreau S. Antigen-specificity in the thymic development and peripheral activity of CD4(+)FOXP3(+) T regulatory cells. *Front. Immunol.*, 2018, Vol. 9, 1701. doi: 10.3389/fimmu.2018.01701.
87. Proekt I., Miller C.N., Jeanne M., Fasano K.J., Moon J.J., Lowell C.A., Gould D.B., Anderson M.S., DeFranco A.L. LYN- and AIRE-mediated tolerance checkpoint defects synergize to trigger organ-specific autoimmunity. *J. Clin. Invest.*, 2016, Vol. 126, pp. 3758-3771.
88. Proekt I., Miller C.N., Lionakis M.S., Anderson M.S. Insights into immune tolerance from AIRE deficiency. *Curr. Opin. Immunol.* 2017, Vol. 49, pp. 71-78.
89. Rehman S., Majeed T., Ansari M.A., Ali U., Sabit H., Al-Suhaimi .EA. Current scenario of COVID-19 in pediatric age group and physiology of immune and thymus response. *Saudi J. Biol. Sci.*, 2020, Vol. 27, no. 10, pp. 2567-2573.
90. Rocha B., von Boehmer H. Peripheral selection of the T cell repertoire. *Science*, 1991, Vol. 251, no. 4998, pp. 1225-1228.
91. Rosenberg S.A., Restifo N.P. Adoptive cell transfer as personalized immunotherapy for human cancer. *Science*, 2015, Vol. 348, no. 6230, pp. 62-68.
92. Rossini M., Viapiana O., Adami S., Idolazzi L., Ghellere F., Tripi G., Ortolani R., Zanotti R., Gatti D. Effects of denosumab on peripheral lymphocyte subpopulations. *Endocrine*, 2016, Vol. 53, pp. 857-869.
93. Santamaria J.C., Borelli A., Irla M. Regulatory T Cell heterogeneity in the thymus: impact on their functional activities. *Front. Immunol.*, 2021, Vol. 12, 643153. doi: 10.3389/fimmu.2021.643153.
94. Sakaguchi S., Sakaguchi N., Shimizu J., Yamazaki S., Sakihama T., Itoh M., Kuniyasu Y., Nomura T., Toda M., Takahashi T. Immunologic tolerance maintained by CD25⁺ CD4⁺ regulatory T cells: their common role in controlling autoimmunity, tumor immunity, and transplantation tolerance. *Immunol. Rev.* 2001, Vol. 182, no. 1, pp. 18-32.
95. Salle V. Coronavirus-induced autoimmunity. *Clin. Immunol.*, 2021, Vol. 226, 108694. doi: 10.1016/j.clim.2021.108694.
96. Savino W. The thymus is a common target organ in infectious diseases. *PLoS Pathog.*, 2006, Vol. 2, no. 6, e62. doi: 10.1371/journal.ppat.0020062.
97. Schipp C., Schlütermann D., Hönscheid A., Nabhani S., Höll J., Oommen P.T., Ginzel S., Fleckenstein B., Stork B., Borkhardt A., Stepensky P., Fischer U. EBV negative lymphoma and autoimmune lymphoproliferative syndrome like phenotype extend the clinical spectrum of primary immunodeficiency caused by STK4 deficiency. *Front. Immunol.*, 2018, Vol. 9, 2400. doi: 10.3389/fimmu.2018.02400.
98. Schmitt N., Nugeyre M.T., Scott-Algara D., Cumont M.C., Barré-Sinoussi F., Pancino G., Israël N. Differential susceptibility of human thymic dendritic cell subsets to X4 and R5 HIV-1 infection. *AIDS*, 2006, Vol. 20, no. 4, pp. 533-542.
99. Sharma S., Ghosh S., Singh L.K., Sarkar A., Malhotra R., Garg O.P., Singh Y., Sharma R.S., Bhakuni D.S., Das T.K., Biswas S. Identification of autoantibodies against transthyretin for the screening and diagnosis of rheumatoid arthritis. *PLoS One*, 2014, Vol. 9, no. 4, e93905. doi: 10.1371/journal.pone.0093905.
100. Shevach E.M., Piccirillo C.A., Thornton A.M., McHugh R.S. Control of T cell activation by CD4⁺CD25⁺ suppressor T cells. *Novartis Found. Symp.*, 2003, Vol. 252, pp. 106-114.
101. Shi H., Liu C., Tan H., Li Y., Nguyen T.M., Dhungana Y., Guy C., Vogel P., Neale G., Rankin S., Feng Y., Peng J., Tao W., Chi H. Hippo kinases Mst1 and Mst2 sense and amplify IL-2/STAT5 signaling in regulatory T cells to establish stable regulatory activity. *Immunity*, 2018, Vol. 49, no. 5, pp. 899-914.e896.
102. Shi D., Shui Y., Xub X., Hec K., Yang F., Gao J. Thymic function affects breast cancer development and metastasis by regulating expression of thymus secretions PTM α and T β 15b1. *Transl. Oncol.*, 2021, Vol. 14, no. 1, 100980. doi: 10.1016/j.tranon.2020.100980.
103. Smyth M.J., Yagita H., McArthur G.A. Combination Anti-CTLA-4 and Anti-RANKL in Metastatic Melanoma. *J. Clin. Oncol.*, 2016, Vol. 34, pp. e104-e106.
104. Sprent J., Surh C.D. Re-entry of mature T cells to the thymus: an epiphenomenon? *Immunol. Cell Biol.*, 2009, Vol. 87, no. 1, pp. 46-49.
105. St-Pierre C., Trofimov A., Brochu S., Lemieux S., Perreault C. Differential features of AIRE-induced and AIRE-independent promiscuous gene expression in thymic epithelial cells. *J. Immunol.*, 2015, Vol. 195, no. 2, pp. 498-506.
106. Stanley S.K., Fauci A.S. T cell homeostasis in HIV infection: part of the solution, or part of the problem? *J. Acquir. Immune Defic. Syndr. (1988)*, 1993, Vol. 6, no. 2, pp. 142-143.
107. Stassen M., Schmitt E., Jonlett H. Human CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells and infectious tolerance. *Transplantation*, 2004, Vol. 77, no. 1, pp. S23-S25.

108. Su L., Kaneshima H., Bonyhadi M., Salimi S., Kraft D., Rabin L., McCune J.M. HIV-1-induced thymocyte depletion is associated with indirect cytopathogenicity and infection of progenitor cells *in vivo*. *Immunity*, 1995, Vol. 2, no. 1, pp. 25-36.
109. Su M.A., Anderson M.S. Pulling RANK on cancer: blocking Aire-mediated central tolerance to enhance immunotherapy. *Cancer Immunol. Res.*, 2019, Vol. 7, no. 6, pp. 854-859.
110. Takaba H., Morishita Y., Tomofuji Y., Danks L., Nitta T, Komatsu N., Kodama T., Takayanagi H. Fezf2 orchestrates a thymic program of self-antigen expression for immune tolerance. *Cell*, 2015, Vol. 163, pp. 975-987.
111. Takahama Y., Ohigashi I., Baik S., Anderson G. Generation of diversity in thymic epithelial cells. *Nat. Rev. Immunol.*, 2017, Vol. 17, no. 5, pp. 295-305.
112. Taniguchi R.T., de Voss J.J., Moon J.J., Sidney J., Sette A., Jenkins M.K., Anderson M.S. Detection of an autoreactive T-cell population within the polyclonal repertoire that undergoes distinct autoimmune regulator (AIRE)-mediated selection. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 2012, Vol. 109, no. 20, pp. 7847-7852.
113. Tazi-Ahnini R., McDonagh A.J., Wengraf D.A., Lovewell T.R., Vasilopoulos Y., Messenger A.G., Cork M.J., Gawkrödger D.J. The autoimmune regulator gene (AIRE) is strongly associated with vitiligo. *Br. J. Dermatol.*, 2008, Vol. 159, no. 3, pp. 591-596.
114. Thiault N., Darrigues J., Adoue V., Gros M., Binet B., Perals C., Leobon B., Fazilleau N., Joffre O.P., Robey E.A., van Meerwijk J.P.M., Romagnoli P. Peripheral regulatory T lymphocytes recirculating to the thymus suppress the development of their precursors. *Nat. Immunol.*, 2015, Vol. 16, no. 6, pp. 628-634.
115. Thornton A.M., Shevach E.M. Suppressor effector function of CD4⁺CD25⁺ immunoregulatory T cells is antigen nonspecific. *J. Immunol.*, 2000, Vol. 164, pp. 183-190.
116. Tian C., Bagley J., Forman D., Iacomini J. Induction of central tolerance by mature T cells. *J. Immunol.*, 2004, Vol. 173, pp. 7217-7222.
117. Tomofuji Y., Takaba H., Suzuki H.I., Benlaribi R., Martinez C.D.P., Abe Y., Morishita Y., Okamura T., Taguchi A., Kodama T., Takayanagi H. Chd4 choreographs self-antigen expression for central immune tolerance. *Nat. Immunol.*, 2020, Vol. 21, no. 8, pp. 892-901.
118. Träger U., Sierro S., Djordjevic G., Bouzo B., Khandwala S., Meloni A., Mortensen M., Simon A.K. The immune response to melanoma is limited by thymic selection of self-antigens. *PLoS One*, 2012, Vol. 7, no. 4, e35005. doi: 10.1371/journal.pone.0035005.
119. Tregoning J.S., Russe R.F., Kinnear E. Adjuvanted influenza vaccines. *Hum. Vaccin. Immunother.*, 2018, Vol. 14, no. 3, pp. 550-564.
120. Villa-Verde D.M.S., Silva-Monteiro E., Jasiulionis M., Farias-de-Oliveira D.A., Brentani R.R., Savino W., Chammas R. Galectin-3 modulates carbohydrate dependent thymocyte interactions with the thymic microenvironment. *Eur. J. Immunol.*, 2002, Vol. 32, pp. 1434-1444.
121. Wainwright D.A., Sengupta S., Han Y., Lesniak M.S. Thymus-derived rather than tumor-induced regulatory T cells predominate in brain tumors. *Neuro Oncol.*, 2011, Vol. 13, pp. 1308-1323.
122. Walker L.S.K., Sansom D.M. The emerging role of CTLA4 as a cell-extrinsic regulator of T cell responses. *Nat. Rev. Immunol.*, 2011, Vol. 11, pp. 852-863.
123. Wang K., Chen W., Zhang Z., Deng Y., Lian J.Q., Du P., Wei D., Zhang Y., Sun X.-X., Gong L., Yang X., He L., Zhang L., Yang Z., Geng J.-J., Chen R., Zhang H., Wang B., Zhu Y.-M., Nan G., Jiang J.-L., Li L., Wu J., Lin P., Huang W., Xie L., Zheng Z.-H., Zhang K., Miao J.-L., Cui H.-Y., Huang M., Zhang J., Fu L., Yang X.-M., Zhao Z., Sun S., Gu H., Wang Z., Wang C.-F., Lu Y., Liu Y.-Y., Wang Q.-Y., Bian H., Zhu P., Chen Z.-N. CD147-spike protein is a novel route for SARS-CoV-2 infection to host cells. *Signal Transduct. Target. Ther.*, 2020, Vol. 5, no. 1, 283. doi: 10.1038/s41392-020-00426-x.
124. Wang W., Thomas R., Sizova O., Su D.-M. Thymic Function Associated With Cancer Development, Relapse, and Antitumor Immunity – A Mini-Review. *Front. Immunol.*, 2020, Vol. 11, 773. doi: 10.3389/fimmu.2020.00773.
125. Webb S.R., Sprent J. Induction of neonatal tolerance to Mlsa antigens by CD8⁺ T cells. *Science*, 1990, Vol. 248, no. 4963, pp. 1643-1646.
126. Wing J.B., Sakaguchi S. Multiple treg suppressive modules and their adaptability. *Front. Immunol.*, 2012, Vol. 3, 178. doi: 10.3389/fimmu.2012.00178.
127. Wing J.B., Tanaka A., Sakaguchi S. Human FOXP3⁺ regulatory T cells heterogeneity and function in autoimmunity and cancer. *Immunity*, 2019, Vol. 50, pp. 302-316.
128. Yamaguchi T., Wing J.B., Sakaguchi S. Two modes of immune suppression by Foxp3(+) regulatory T cells under inflammatory or non-inflammatory conditions. *Semin. Immunol.*, 2011, Vol. 23, pp. 424-430.
129. Yang S., Fujikado N., Kolodin D., Benoist C., Mathis D. Immune tolerance. Regulatory T cells generated early in life play a distinct role in maintaining self-tolerance. *Science*, 2015, Vol. 348, no. 6234, pp. 589-594.
130. Yazdanpanah N., Rezaei N. Autoimmune complications of COVID-19. *J. Med. Virol.*, 2021, Vol. 94, pp. 54-62.
131. Yin C., Pei X.Y., Shen H., Gao Y.N., Sun X.Y., Wang W., Ge Q., Zhang Y. Thymic homing of activated CD4(+) T cells induces degeneration of the thymic epithelium through excessive RANK signaling. *Sci. Rep.*, 2017, Vol. 7, no. 1, 2421. doi: 10.1038/s41598-017-02653-9.

132. Yoshimura F.K., Luo X. Induction of endoplasmic reticulum stress in thymic lymphocytes by the envelope precursor polyprotein of a murine leukemia virus during the pre-leukemic period. *J. Virol.*, 2007, Vol. 81, no. 8, pp. 4374-4377.

133. Zahran A.M., Zahran Z.A.M., Mady Y.H., Mahran E.E.M.O., Rashad A., Makboul A., Nasif K.A., Abdelmaksoud A.A., El-Badawy O. Differential alterations in peripheral lymphocyte subsets in COVID-19 patients: upregulation of double-positive and double-negative T cells. *Multidiscip. Respir. Med.*, Vol. 16, no. 2, 758. doi: 10.4081/mrm.2021.758.

134. Zhang J., Wang Y., Aili A., Sun X., Pang X., Ge Q., Zhang Y., Jin R. Th1 biased progressive autoimmunity in aged AIRE deficient mice accelerated thymic epithelial cell senescence. *Aging Dis.*, 2019, Vol. 10, no. 3, pp. 497-509.

135. Zhou T., Damsky W., Weizman O.-E., McGeary M.K, Hartmann P., Rosen C.E., Fischer S., Jackson R., Flavell R.A., Wang J., Sanmamed M.F., Bosenberg M.W., Ring A.M. IL-18BP is a secreted immune checkpoint and barrier to IL-18 immunotherapy. *Nature*, 2020, Vol. 583, no. 7817, pp. 609-614.

Автор:

Козлов В.А. — д.м.н., профессор, академик РАН, научный руководитель ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

Author:

Kozlov V.A., PhD, MD (Medicine), Professor, Full Member, Russian Academy of Sciences, Scientific Director, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

*Поступила 12.10.2022
Принята к печати 15.10.2022*

*Received 12.10.2022
Accepted 15.10.2022*

ЭВОЛЮЦИОННЫЕ АСПЕКТЫ ТИМОЛОГИИ В ПЕДИАТРИЧЕСКОЙ ПРАКТИКЕ

Ровда Ю.И.¹, Миняйлова Н.Н.¹, Ведерникова А.В.¹,
Шабалдин А.В.², Халивопуло И.К.², Зинчук С.Ф.¹,
Шмакова О.В.¹, Лобыкина А.А.¹

¹ ФГБОУ «Кемеровский государственный медицинский университет», г. Кемерово, Россия

² ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний»,
г. Кемерово, Россия

Резюме. Тимус в настоящее время рассматривается как производное иммунной системы и в большей степени как ее центральный орган. Иммунодефицитные состояния и иммунная дисрегуляция зависят от качества вилочковой железы, которая может быть генетически и фетопатически детерминирована, а также от возможности и характера ее прижизненных повреждений, возрастной инволюции в различные периоды жизни. Не случайно в детской популяции встречаются различные морфометрические биполярные состояния вилочковой железы (3–7%), где его размеры на порядок могут быть больше/меньше вариативных величин. В определенных случаях феномен тимомегалии (например, у новорожденных) рассматривается как результат генетических поломок (нервно-эндокринно-иммунный синдром с тимомегалией), индуцированный модифицированными Нох-генами. Этот синдром может ассоциироваться и с врожденной патологией сердца. Также предметом дискуссии является вопрос избыточной инфекционной респираторной заболеваемости (чаще вирусной этиологии) у детей раннего возраста с биполярными состояниями тимуса, где оппоненты придерживаются прямо противоположных точек зрения.

Достаточно разноречивы и немногочисленны работы по оценке иммунного статуса у вынужденно тимэктомированных детей (например, при операциях на сердце). И это даже в тех случаях, когда проведено субтотальное удаление вилочковой железы.

Диалектически понятия «морфология» и «функция органа» неотделимы. Морфометрические трансформации в органах (даже транзиторные), в пределах более 95 и менее 5 перцентиля почти всегда должны иметь под собой определенный патоморфоз, причины и характер которого требуют верификации. Тем не менее на сегодня оценка патоморфологии тимуса умерших детей не всегда критична или часто носит описательный характер. Вероятно, такая ситуация связана с чрезвычайной сложностью морфологической интерпретации ВЖ.

Представляется, что до сих пор окончательная точка в научном споре об иммунодефицитных состояниях или иммунной дисрегуляции у детей с биполярными трансформациями тимуса еще не поставлена, и причина этого кроется в отсутствии надежных иммуноопосредованных биомаркеров,

Адрес для переписки:

Ведерникова Алена Владимировна
ФГБОУ «Кемеровский государственный медицинский университет»
650000, Россия, г. Кемерово, ул. Орджоникидзе, 5, кв. 45.
Тел.: 8 (929) 351-43-82.
E-mail: cmombilla@gmail.com

Address for correspondence:

Alena V. Vedernikova
Kemerovo State Medical University
5 Ordzhonikidze St, Apt 45
Kemerovo
650000 Russian Federation
Phone: +7 (929) 351-43-82.
E-mail: cmombilla@gmail.com

Образец цитирования:

Ю.И. Ровда, Н.Н. Миняйлова, А.В. Ведерникова, А.В. Шабалдин, И.К. Халивопуло, С.Ф. Зинчук, О.В. Шмакова, А.А. Лобыкина «Эволюционные аспекты тимологии в педиатрической практике» // Медицинская иммунология, 2023. Т. 25, № 1. С. 59–68. doi: 10.15789/1563-0625-EAO-2544

© Ровда Ю.И. и соавт., 2023

Эта статья распространяется по лицензии Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

Yu.I. Rovda, N.N. Minyailova, A.V. Vedernikova, A.V. Shabaldin, I.K. Khalivopulo, S.F. Zinchuk, O.V. Shmakova, A.A. Lobykina "Evolutionary aspects of thymology in pediatric practice", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2023, Vol. 25, no. 1, pp. 59–68. doi: 10.15789/1563-0625-EAO-2544

© Rovda Yu.I. et al., 2023

The article can be used under the Creative Commons Attribution 4.0 License

DOI: 10.15789/1563-0625-EAO-2544

практической малодоступности генетической диагностики первичных иммунодефицитов, в снижении интереса медицинской науки к проблеме биполярных состояний вилочковой железы в раннем возрасте, в отсутствии длительных лонгитудальных наблюдений за этой категорией больных и т. д. Данная статья является попыткой авторов привлечь внимание исследователей к этой проблеме.

Ключевые слова: тимус, вилочковая железа, дети, иммунодефицитные состояния, тимэктомия

EVOLUTIONARY ASPECTS OF THYMOLOGY IN PEDIATRIC PRACTICE

Rovda Yu.I.^a, Minyailova N.N.^a, Vedernikova A.V.^a, Shabal'din A.V.^b, Khalivopulo I.K.^b, Zinchuk S.F.^a, Shmakova O.V.^a, Lobykina A.A.^a

^a Kemerovo State Medical University, Kemerovo, Russian Federation

^b Research Institute of Complex Problems of Cardiovascular Diseases, Kemerovo, Russian Federation

Abstract. The thymus is now considered a derivative of the immune system being, to greater extent, its central organ. Immunodeficiency states and immune dysregulation also depend on the quality of the thymus, which may be determined both genetically and by fetopathic approach as well as due to the possibility and mode of its intravital injuries, age-related involution over different periods of life. Not accidentally, there are various morphometric bipolar states of the thymus gland in the pediatric population (3–7%), whereas its size may be sufficiently larger or smaller than the reference variable values. In certain cases, the phenomenon of thymomegaly (for example, in newborns) is considered a result of genetic errors (neuro-endocrine-immune syndrome with thymomegaly) induced by the mutated Hox genes. This syndrome may also be associated with congenital heart disorders. Moreover, the excessive morbidity in respiratory infections (commonly, viral by their etiology) among young children with bipolar thymus conditions remains the subject of sharp discussions. Some works assessing immune status in the children subjected to forced thymectomy, e.g., during heart surgery, yielded quite controversial results, even in cases of subtotal removal of thymus gland.

Dialectically, the concepts of “morphology” and “organ function” could not be separated from one another. The morphometric transformations in organs (even transient ones) occurring within the range of > 95 and < 5 percentiles, should be almost always underlied by a certain pathomorphosis which require verification of their causes and origin. Even today, however, the assessment of thymus pathomorphology in the deceased children is not always critical, being often descriptive. This situation is, probably, associated with extreme complexity of thymic morphology assessment. The final point seems to be not set in the discussion about immunodeficiency states or immune dysregulation among children with bipolar thymus transformations. This is due to current absence of reliable immune-mediated biomarkers, the limited availability of genetic diagnostics in primary immunodeficiency conditions, and a decreased interest of clinical science in the issues of bipolar conditions of the thymus gland at the early age, in the absence of longitudinal observations in this category of patients, etc. In this article, the authors attempt to draw attention of researchers to this problem.

Keywords: thymus, thymus gland, children, immunodeficiency states, thymectomy

Главным потенциалом благополучия стран являются не только природные ресурсы, но и человеческий капитал. А фактор продуктивности народа обеспечивают его физическое, психическое и духовное здоровье, которые определяют и основной вектор его же целеполагания — сокращение заболеваемости населения. Не вызывает сомнения колоссальная значимость качества иммунной системы человека в происхождении не только инфекционных, но и онкологических, аутоиммунных заболеваний, склонности к аллергии и т. д. Понятно, что качество иммунной

системы может зависеть как от наследственных и фетальных причин, так и возможности и характера ее прижизненных повреждений, возрастной инволюции в различные периоды жизни. Нарушения функций иммунной системы в детской практике чаще проявляются иммунодефицитными и дисрегуляторными состояниями, которые подразделяются во многих классификациях на первичные (ПИДС) и вторичные (приобретенные) [36].

В России к группе риска наличия иммунодефицитных состояний (особенно у детей раннего

возраста) традиционно относили детей с высоким инфекционным индексом. Эта категория обозначалась как группа часто и длительно болеющих детей, в основном острой инфекцией респираторного тракта. Согласно классификации Баранова А.А., Альбицкого В.Ю. (1986), это чаще дети первых 4 лет жизни, у которых число острых респираторных заболеваний в течение года превышало 4-6 раз. Но в федеральных клинических рекомендациях «Острая респираторная вирусная инфекция (ОРВИ) у детей» от 2018 года допускается (цитирую): «У детей до 5 лет в среднем 6-8 эпизодов ОРВИ в год. ОРВИ, в отсутствие бактериальных осложнений, скоротечны, хотя и могут оставлять на 1-2 недели такие симптомы, как отделяемое из носовых ходов, кашель. Мнение о том, что повторные ОРВИ, особенно частые, являются проявлением или приводят к развитию «вторичного иммунодефицита» безосновательно [31]. Вышеобозначенная частота эпизодов ОРВИ чаще связана с внешними причинами: это инфицированность в условиях дошкольного учреждения (неудовлетворительная работа фильтров, скученность), это дома ребенка, детские дома, школы с многосменными занятиями, школы-интернаты, социально неблагополучные семьи и т. д. Создание им оптимальных санитарно-эпидемиологических и социально-экономических условий — решение проблемы относительно высокой заболеваемости.

Тем не менее педиатры выделяли достаточно типичную немногочисленную группу, где дети редко бывают здоровыми. У них высокая восприимчивость к переохлаждению, часты ассоциации вирусной инфекции; респираторные заболевания протекают более длительно, а иногда с высоким токсикозом. ОРВИ, бронхиты, отиты, фарингиты, ларинготрахеиты, аденоидиты, синуситы и т. д. — в основном вирусного происхождения [1, 4, 9, 22, 24, 42], но в ряде случаев осложняющиеся бактериальной инфекцией. Процесс из носоглотки нередко распространяется на среднее ухо, пазухи, бронхи, легочную ткань [19, 27]. Интеркуррентные инфекции редко, но чаще чем в популяции, имеют склонность к генерализованному, молниеносному или рецидивирующему течению с длительным субфебрилитетом [23, 54]. Обследования на респираторный аллергоз и первичные иммунодефицитные заболевания (на доступном уровне) в большей части с отрицательным результатом. Достаточно часто в отечественной и реже в зарубежной литературе встречаются источники, прямым образом указывающие на связь подобной высокой респираторной заболеваемости с синдромом увеличенной и уменьшенной вилочковой железы. Речь идет о размерах вилочковой железы, превышающих 90 перцентиль и меньше

10 перцентиль (а чаще превышающих 95 перцентиль и меньше 5 перцентиль) в соответствующих по возрасту таблицах. Многие авторы рассматривают морфометрические трансформации ВЖ как нормальную адаптивную реакцию на стресс (например, на инфекцию), при которой процесс увеличения(уменьшения) тимуса происходит стадийно (I-V стадии) в рамках акцидентальной инволюции [12, 17, 39, 40, 41, 48]. За рубежом рассматривают уменьшение объема и массы тимуса (помимо возрастной причины) с развитием острой атрофии в условиях любого наступившего стресса [33, 44, 46, 50, 51, 53]. Существует и прямо противоположное мнение, когда такой феномен, как ТМ, рассматривается как патологическое состояние, сопровождающееся иммунодефицитом, иногда сочетающееся с нарушением функции нейроэндокринной системы [5, 13, 15, 22, 26, 34, 53]. В некоторых случаях тимомегалия рассматривалась как врожденная в результате фетодисплазии, особенно если она выявлялась при рождении (или у мертворожденных), а еще чаще — в сочетании с врожденными пороками [10, 11, 12, 20, 21]. В частности, Л.Г. Кузьменко обращала внимание на то, что детям с врожденной тимомегалией присущ дизрафический статус, проявляющийся, либо пороками развития центральной нервной и эндокринной систем, либо нарушением функции этих органов (в той или иной степени), что также сопряжено с их определенным дисморфизмом. Автор указывала, что ТМ в подобных случаях, является одним из сочетанных симптомов поражения нервной, эндокринной, и иммунной систем, которые можно рассматривать в рамках нервно-эндокринно-иммунного синдрома с ТМ (НЭИСТМ) [18]. Этот синдром может быть как изолированным, так и сочетаться с другими признаками дизэмбриогенеза и не являться проявлением «лимфатического диатеза». Ссылаясь на работы Nicols J.G. и соавт. (2003) и Lemons D. и соавт. (2006), автор достаточно логично обосновывает и связывает появление такого клинического полиморфизма с нарушением формообразования (органогенеза) на очень ранней стадии эмбриогенеза, а именно с влиянием семейства генов, определяющих судьбу каждого сегмента эмбриона — Нох-генов (контролирующих экспрессию других функционально взаимосвязанных между собой генов) [18, 29, 49]. Ранее было доказано, что продуцируемые тимусом Т-лимфоциты и нейроны головного мозга экспрессируют один и тот же антиген (Thy-антиген), считавшийся до этого момента специфическим антигеном Т-лимфоцитов. Это открытие явилось важной вехой в изучении взаимодействия иммунной системы с другими структурами организма [2, 18, 45]. Выявлен общий молекулярный

«язык» (с помощью медиаторов межклеточного взаимодействия) для обмена сигнальной информацией между клетками, тканями и органами трех указанных систем – регуляторов (нервной, эндокринной, иммунной) [18, 32, 56]. Так, среди нейроиммуноэндокринных сигнальных молекул тимуса различают собственно гормоны тимуса, биогенные амины и пептидные гормоны, синтезируемые в APUD-клетках, лимфоцитах и клетках микроокружения (ТЭК, ретикулоэндотелиальные, тучные и дендритные клетки, макрофаги, клетки APUD-серии). Это микроокружение секретирует такие регуляторные пептиды, как: тот же соматотропин, гонадотропины, адренокортикотропный гормон, тиреотропин, эндорфины и энкефалины, пролактин, нейропептиды (нейротензин, вещество P, ВИП, холецистокинин, соматостатин, окситоцин, вазопрессин, нейротензины, метэнкефалин, АКТГ, предсердный натрийуретический пептид), что свидетельствует о том, что сама вилочковая железа выступает не только как иммунный орган, но и как эндокринный [8, 38, 47]. Цитокины и тимические гормоны осуществляют свое специфическое действие аутокринным или паракринным путем, влияя на дифференцировку Т-лимфоцитов и гемопоэтические клетки [8]. В свою очередь, гормоны, продуцируемые эндокринными железами, прежде всего гипофизом и надпочечниками (включая СТГ и ГК), также вовлечены в тимическое микроокружение [8].

В последние несколько лет, с развитием диагностических технологий по выявлению иммунологических биомаркеров, например, таких как TREC (KREC), определение функциональной активности различных белков (WAS, SAP, IXAP, FOXP3), бурст-тест, секвенирование по Сэнгеру и секвенирование нового поколения (NGS), среди детей групп медико-биологического риска все чаще выявляются первичные иммунодефицитные и иммунодисрегуляторные состояния (ПИДС) [34].

В среднем частота генетических дефектов иммунных клеток составляет 1 на 10 000, и это только для верифицированной группы ПИД, исключая селективный дефицит IgA [36]. К настоящему моменту описано более 415 ПИДС (из 10 000 предполагаемых), для большинства из которых установлена молекулярная основа патогенеза и прослежены фенотипические проявления [29]. Среди выявляемых ПИДС наиболее часто выявляются патология гуморального звена, комбинированная иммунная недостаточность, первичные расстройства клеточной иммунной регуляции, связанных, например, с пороками развития сердечно-сосудистой и нервной систем, десятки синдромальных ПИД и др. [36]. Многие

новорожденные с низкой и экстремально низкой массой, имеющие высокую смертность, также попадают в эту группу расстройств клеточной регуляции [16, 36, 43]. Румянцев А.Г. отмечает: «Всеобъемлющая теория иммунитета появится не скоро, так как иммунология приобрела новую научную и практическую парадигму, в основе которой лежат изучение и познание клеточной регуляции многоклеточного организма человека от плода до глубокой старости [35].

Появление и разработка этих методов диагностики, новой концепции способствовали в том числе и переоценке роли тимомегалии в происхождении иммунодефицита и связанной с ними инфекционной заболеваемости у детей раннего возраста. Например, цитирую результаты сквозного поиска Макарова С.Ю. и соавт. (2015) по электронной версии всемирно известного учебника по педиатрии Nelson Textbook of Pediatrics, 19th edition: «На его страницах 23 раза встречается слово “thymus”, упоминаний о тимомегалии в нем нет. Также нет такого диагноза в Международной классификации болезней 10-го пересмотра; единственный термин, вызывающий отдаленные ассоциации с тимомегалией, – это «E32.0 – стойкая гиперплазия вилочковой железы» [25]. Примечание: скорее всего, здесь также указано на случаи истинной идиопатической гиперплазии ВЖ, которые чрезвычайно редки и не являются темой для данной статьи. Те же авторы указывают и на снижение во второй половине XX века научного интереса к вопросу связи тимомегалии с синдромом внезапной младенческой смерти детей раннего возраста [25], хотя имеются вполне современные зарубежные работы, где эта сопряженность категорично не отвергается [57]. На то, что в иностранной литературе не упоминается термин «тимомегалия», указывают и Толстова Е.М., Зайцева О.В. [37]. Вместе с тем, с научной точки зрения, крайние биполярные трансформации тимуса (увеличение ВЖ более 95 перцентилей и уменьшение ее в границах менее 5 перцентилей) на наш взгляд заслуживают определенного внимания. Особенно в эпоху внедрения ультразвуковых методов диагностики, когда истинные размеры и массу органа можно оценивать в режиме мониторинга, прижизненно, по возрастно и на популяционном уровне. Работы такого масштаба достаточно многочисленны в отечественной медицине, как и многочисленны доказательства связи, например тимомегалии, с более высокой респираторной заболеваемостью. Выше упомянуто, что многие авторы расценивают эту реакцию как адаптивный ответ ВЖ на инфекцию в рамках акцидентальной инволюции и не связывают с развитием иммунодефицитного состояния. Тем более что стали более демокра-

тичными критерии ЧДБ детей раннего возраста. Другие авторы рассматривают тимомегалию как вторичную гиперплазию ВЖ, как феномен «рикошета» после перенесенных инфекционных заболеваний или после проведения химиотерапии, стероидной терапии, термических ожогов (акцидентальная инволюция с последующей возвратной "rebound" гиперплазией) [14, 38]. На этом огромном массиве исследований факт о том, что у детей с крайней степенью тимомегалии и микро-тимуса относительно чаще регистрируют инфекционные заболевания респираторного тракта, трудно оспорить. С позиций доступных клинико-диагностических критериев речь не идет об иммунодефицитном состоянии, поскольку эти эпизоды транзиторны, иммунный профиль сыворотки крови без особых изменений; дети в целом имеют благоприятный прогноз. Более отдаленный прогноз, например, в юношеском, зрелом, пожилом возрасте у таких детей неизвестен.

В последние годы в литературе стало чаще упоминаться и о сопряженности микро-тимуса с негативными факторами в жизни ребенка, например, курение матери во время беременности [25], или в условиях любого наступившего стресса, в частности инфекции [52], или отлучение ребенка от груди, беременность [46, 52]. Многие зарубежные авторы такую трансформацию тимуса расценивают, как острую атрофию [33, 44, 46, 50, 51, 53], отечественные авторы – как: гипоплазию, атрофию, субатрофию, дисплазию, акцидентальную инволюцию (IV-V стадии), острую инволюцию, случайную инволюцию, микро-тимус [7, 12, 21, 37, 41, 44, 55]. Стойкую гипоплазию тимуса (микро-тимус) в детском возрасте часто ассоциируют с первичными иммунодефицитными состояниями. Ряд наследственных синдромов с гипоплазией тимуса ассоциирован также с патологией нервной, эндокринной систем, развитием мезенхимальных злокачественных опухолей. В одних случаях (лимфоцитозитиз Гланзмана и Риникера, атаксия-телеангиэктазия Луи-Бар) возникает дефект клеточного и гуморального иммунитета, при других (синдром Незелофа, синдром ДиДжорджи) – дефект только клеточного иммунитета [38].

Диалектически понятия «морфология» и «функция органа» неотделимы. Но возникает вопрос о некоторых парадоксальных реакциях ВЖ на стресс у детей раннего возраста (в частности на инфекцию и не всегда с тяжелым токсикозом). Понятно, что величина стресса может быть разная, в том числе чрезмерная, но даже при такой ее величине (тяжелая инфекция, сепсис, остро наступившая смерть и т. д.), на аутопсии морфологи видят разные морфологические реакции и изменения в ВЖ, а именно: в одних случаях –

огромный тимус, в других – остатки тимической ткани. Морфометрические трансформации в органах (даже транзиторные), в пределах более 95 и менее 5 перцентиля, почти всегда должны иметь под собой определенный патоморфоз, причины и характер которого требуют верификации. Тем не менее на сегодня оценка патоморфологии тимуса умерших детей (например, в результате инфекции) не всегда критична (гипоплазия, дисплазия, гиперплазия, акцидентальная инволюция, атрофия) или часто носят описательный характер [3, 28, 41]. Вероятно, такая ситуация связана с чрезвычайной сложностью морфологической интерпретации ВЖ.

Вместе с этим нет достаточно убедительных сравнительных катамнестических лонгитудинальных исследований здоровья детей (имеющих в раннем детстве крайние биполярные трансформации ТМ) на протяжении жизни, если иметь в виду научно доказанные факты клинического дебюта ПИДС в различном возрасте (в том числе и преклонном). Может быть, эти трансформации тимуса в детстве «первые ласточки» генетически детерминированного ИДС, который клинически проявится намного позднее тогда, когда к этому добавятся и процессы возрастной инволюции ВЖ. Данная точка зрения заслуживает внимания еще и потому, что на сегодня еще нет достаточно надежной и доступной скрининговой диагностики, которая могла бы обеспечить раннее выявление ПИДС. Практика выявления ПИДС основана на применении выше обозначенных дорогостоящих методик в случаях уже клинически зримого иммунодефицита, и случаям биполярных трансформаций тимуса в раннем детстве не придают значения (а чаще родители или сами пациенты об этом не помнят, или в медицинских документах эти факты не отражаются). По крайней мере, в доступных литературных источниках данному предположению нет доказательств утверждающих обратное.

Не исключено, что помимо генетического дефекта (определяющего морфологическую неполноценность органов и клеток иммунной системы, в том числе и тимуса) имеются и фетальные факторы, которые также могут влиять на качество развития и дифференцировки ВЖ. Поэтому, наверное, целесообразно при выявлении на сонографии тимомегалии (95 перцентиль и более) и микро-тимуса (менее 5 перцентиля) ставить более радикально вопрос по выявлению иммунологических биомаркеров ПИДС и функциональной оценки наиболее значимых клеточных популяций иммунной системы. Тем более в ситуации планируемой вынужденной тимэктомии (при операциях на порочном сердце), когда ВЖ при предоперационном УЗ-исследовании

имеет критично малые или большие размеры. Не вызывает сомнения, что во всех этих случаях необходимо принимать во внимание клинико-анамнестические и семейные факторы. Поэтому интерес педиатров к этой области знаний связан с определенным пониманием онтогенеза человека от рождения до старости, где тимус играет основную роль в антенатальном периоде и раннем детстве. И на основании вышесказанного, целью данной статьи является попытка авторов вновь привлечь внимание научного сообщества к проблеме морфологической и морфометрической трансформации (инволюции) вилочковой железы в детском и более старшем возрасте.

Основной ряд суждений по данному научному направлению имеет не только теоретический характер, но и важен с практической точки зрения. Поскольку любая критическая инволюция тимуса либо врожденная морфологическая несостоятельность сопровождается потерей числа генерируемых и экспортируемых клеток, терапия на заместительной или стимулирующей основе может стать альтернативной стратегией для восстановления органа, увеличения пролиферации

тимоцитов и экспорта зрелых Т-клеток в периферические лимфоидные органы. И здесь тоже может быть правомочна рекомендация академика А.Г. Румянцева о том, что эмпирический выбор иммунотерапевтических опций оправдан как с точки зрения желания помочь больному, так и с точки зрения оценки ятрогенных последствий иммунотерапии» [36]. Тем более когда появились огромные возможности клинической иммунологии благодаря разработке эффективных гносеологических методов, таких как: генетический нокаут (knock-out), использование гормонов, нейротрансмиттеров и клеток микроокружения тимуса, изучение трансгенных моделей на животных с переносом стволовых клеток человека, трансплантация гемопоэтических и иммунопоэтических клеток при первичных (ПИД) и вторичных иммунодефицитах, опухолях иммунной системы, аутовоспалительных заболеваниях и, наконец, инфекциях иммунной системы [36]. Пока что выполнение большинства из этих технологий возможно только в условиях крупного федерального центра [36].

Список литературы / References

1. Азова М.М., Гигани О.Б., Иткес А.В., Кузьменко Л.Г. Тимомегалия и раннее инфицирование вирусами Эпштейна-Барр и Цитомегалии // Детские инфекции, 2004. № 4. С. 23-24. [Azova M.M., Gigani O.B., Itkes A.V., Kuzmenko L.G. Thymomegaly and early infection with Epstein-Barr viruses and cytomegaly. *Detskiye Infektsii = Children Infections*, 2004, no. 4, pp. 23-24. (In Russ.)]
2. Белокрылов Г.А. Влияние веществ полипептидной природы, выделенных из тимуса, коры и белого вещества головного мозга на клеточные и гуморальные показатели иммунитета у тимэктомированных мышей // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины, 1979. Т. 87, № 6. С. 572-574. [Belokrylov G.A. Effect of polypeptide substances isolated from the thymus, cortex and white matter of the brain on cellular and humoral parameters of immunity in thymectomized mice. *Byulleten eksperimentalnoy biologii i meditsiny = Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 1979, Vol. 87, no. 6, pp. 572-574. (In Russ.)]
3. Бибикова А.А., Пикалова Л.П., Блинова Н.В., Медведева А.А. Патоморфология вилочковой железы у детей первых трех лет жизни по Тверской области за 2016 год // Тверской медицинский журнал, 2020. № 4. С. 18-22. [Bibikova A.A., Pikalova L.P., Blinova N.V., Medvedeva A.A. Pathomorphology of the thymus gland in children of the first three years of life in the Tver region in 2016. *Tverskoy meditsinskiy zhurnal = Tver Medical Journal*, 2020, no. 4, pp. 18-22. (In Russ.)]
4. Ваганов П.Д., Донецкова А.Д., Никонова М.Ф., Яновская Э.Ю., Петряйкина Е.Е., Пугачева И.А., Самсонович И.Р., Ярилин А.А. Влияние терапии тактивином на Т-лимфопоэз при тимомегалии у детей раннего возраста с острым обструктивным бронхитом // Российский медицинский журнал, 2015. Т. 21, № 4. С. 18-20. [Vaganov P.D., Donetskova A.D., Nikonova M.F., Yanovskaya E.Yu., Petryaikina E.E., Pugacheva I.A., Samsonovich I.R., Yarilin A.A. The effect of tactivin therapy on T-lymphopoiesis under thymomegaly in children of early age with acute obstructive bronchitis. *Rossiyskiy meditsinskiy zhurnal = Medical Journal of the Russian Federation*, 2015, Vol. 21, no. 4, pp. 18-20. (In Russ.)]
5. Ваганов П.Д., Мартынов М.И., Михеева И.Г. Гормональные нарушения у детей с синдромом увеличения вилочковой железы и возможная их коррекция // Российский вестник перинатологии и педиатрии, 2000. Т. 45, № 4. С. 32. [Vaganov P.D., Martynov M.I., Miheeva I.G. Hormonal disorders in children with thymus enlargement syndrome and possible correction. *Rossiyskiy vestnik perinatologii i pediatrii = Russian Bulletin of Perinatology and Pediatrics*, 2000, Vol. 45, no. 4, p. 32. (In Russ.)]
6. Ваганов П.Д., Мартынова М.И., Арион В.Я. Клинико-иммунологическая характеристика детей с синдромом увеличенной вилочковой железы и их коррекция // Российский вестник перинатологии и педиатрии, 2001. Т. 46, № 3. С. 59-60. [Vaganov P.D., Martynova M.I., Arion V.Ya. The clinicimmunological

characteristics of children with thymomegaly syndrome and their correction. *Rossiyskiy vestnik perinatologii i pediatrii* = *Russian Bulletin of Perinatology and Pediatrics*, 2001, Vol. 46, no. 3, pp. 59-60. (In Russ.)]

7. Вербицкая А.И., Солохин Ю.А., Назарова Н.Ф. Особенности эхографии вилочковой железы у детей в различные возрастные периоды // Ультразвуковая и функциональная диагностика, 2001. № 3. С. 34-39. [Verbitskaya A.I., Solohin Yu.A., Nazarova N.F., Tutuyeva T.A., Gavrilova A.J. The echography characteristics of the thymus gland at the children of various age periods. *Ultrazvukovaya i funktsionalnaya diagnostika* = *Ultrasound and Functional Diagnostics*, 2001, no. 3, pp. 34-39. (In Russ.)]

8. Гормоны тимуса. [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://www.biochemmack.ru/upload/uf/b6f/b6f1abc98b16f25fd01147980fe2cb37.pdf> (дата обращения: 20.06.2022. [Thymus Hormones [Electronic resource]. Access mode: <https://www.biochemmack.ru/upload/uf/b6f/b6f1abc98b16f25fd01147980fe2cb37.pdf> (date of application June 20, 2006)]

9. Гузаревиц В.Б., Осипова Е.А., Кизелевич А.И., Хлебовец Н.И. Тимомегалия у детей грудного возраста // Журнал Гродненского государственного медицинского университета, 2005. № 3. С. 227-228. [Guzarevich V.B., Osipova Ye.A., Kizelevich A.I., Hlebovets N.I. Thymomegalia in breast-fed children. *Zhurnal Grodnenskogo gosudarstvennogo meditsinskogo universiteta* = *Journal of the Grodno State Medical University*, 2005, no. 3, pp. 227-228. (In Russ.)]

10. Ерофеева Л.М. Морфология тимуса человека в детские возрастные периоды // Успехи современного естествознания, 2003. № 8. С. 93. [Erofeeva L.M. The morphology of the human thymus in childhood. *Uspekhi sovremennoye yestestvoznaniya* = *Advances in Current Natural Sciences*, 2003, no. 8, p. 93. (In Russ.)]

11. Зайратьянц О.В., Серов В.В., Кузьменко Л.Г. Новые данные о тимомегалии и синдроме иммунного дефицита // Архив патологии, 1990. Т. 52, № 6. С. 33-39. [Zajrat'janc O.V., Serov V.V., Kuzmenko L.G. New evidence on thymomegaly and immune deficiency syndrome. *Arkhiv patologii* = *Archive of Pathology*, 1990, Vol. 52, no. 6, pp. 33-39. (In Russ.)]

12. Ивановская Т.Е., Зайратьянц О.В., Леонова Л.В., Волощук И.Н. Патология тимуса у детей. СПб.: Сотис, 1996. 270 с. [Ivanovskaya T.E., Zajratyants O.V., Leonova L.V., Voloshchuk I.N. Thymus pathology in children. St. Petersburg: Sotis, 1996. 270 p.]

13. Иноземцева-Фермин Е.А., Кузьменко Л.Г., Острые инфекционные заболевания у детей с увеличенной вилочковой железой в анамнезе // Педиатрия, 1993. № 5. С. 107-108. [Inozemtseva-Fermin E.A., Kuzmenko L.G., Acute infectious diseases in children with an enlarged thymus in history. *Pediatriya* = *Pediatrics*, 1993, no. 5, pp. 107-108. (In Russ.)]

14. Кварацхелия А.Г., Ключкова С.В., Никитюк Д.Б., Алексеева Н.Т. Морфологическая характеристика тимуса и селезенки при воздействии факторов различного происхождения // Журнал анатомии и гистопатологии, 2016. Т. 5, № 3. С. 77-83. [Kvaratskheliya A.G., Klochkova S.V., Nikityuk D.B., Alexeeva N.T. Morphological characteristics of the thymus and spleen under different factors of origin. *Zhurnal anatomii i gistopatologii* = *Journal of Anatomy and Histopathology*, 2016, Vol. 5, no. 3, pp. 77-83. (In Russ.)]

15. Кельцов В.А. Современные представления о роли эндокринной системы в регуляции иммуногенеза в норме и патологии // Вопросы охраны материнства и детства, 1986. № 7. С. 58-60. [Keltsov V.A. Modern concepts of the role of the endocrine system in the regulation of immunogenesis in health and disease. *Voprosy okhrany materinstva i detstva* = *Problems of Maternity and Child Care*, 1986, no. 7, pp. 58-60. (In Russ.)]

16. Корсунский И.А., Кудлай Д.А., Продеус А.П., Щербина А.Ю., Румянцев А.Г. Неонатальный скрининг на первичные иммунодефицитные состояния и Т-/В-клеточные лимфопении как основа формирования групп риска детей с врожденными патологиями // Педиатрия. Журнал им. Г.Н. Сперанского, 2020. Т. 99, № 2. С. 8-15. [Korsunsky I.A., Kudlay D.A., Prodeus A.P., Shcherbina A.Yu., Rumyantsev A.G. Neonatal screening for primary immunodeficiency and WB-cell lymphopenia as the basis for the formation of risk groups for children with congenital pathologies. *Pediatriya. Zhurnal im. G.N. Speranskogo* = *Pediatrics. G. Speransky Journal*, 2020, Vol. 99, no. 2, pp. 8-15. (In Russ.)]

17. Косенкова Т.В., Леонова Е.С., Ляликова Г.В. Уровни активации системы комплемента и его компонентов у здоровых детей // Педиатрия. Журнал им. Г.Н. Сперанского. 1990. № 7. С. 104. [Kosenkova T.V., Leonova E.S., Lyalikova G.V. Levels of activation of the complement system and its components in healthy children. *Pediatriya. Zhurnal im. G.N. Speranskogo* = *Pediatrics. G. Speransky Journal*, 1990, no. 7. p. 104. (In Russ.)]

18. Кузьменко Л.Г. Концептуальный взгляд на генез врожденной тимомегалии // Педиатрия. Журнал им. Г.Н. Сперанского, 2012. Т. 91, № 3. С. 37-43. [Kuzmenko L.G. Conceptual look at the genesis of congenital thymomegaly. *Pediatriya. Zhurnal im. G.N. Speranskogo* = *Pediatrics. G. Speransky Journal*, 2012, Vol. 91, no. 3, pp. 37-43. (In Russ.)]

19. Кузьменко Л.Г. Тимомегалия и синдром Платтера // Лечащий врач, 2002. № 2. С. 33-37. [Kuzmenko L.G. Thymomegaly and Platter's syndrome. *Prakticheskaya meditsina* = *Attending Physician*, 2002, no. 2, pp. 33-37. (In Russ.)]

20. Кузьменко Л.Г., Смыслова З.В., Агарвал Р.К. Величина тимуса, внутриутробная инфицированность и врожденные пороки развития // Электронный научно-образовательный вестник «Здоровье и образование в XXI веке», 2015. Т. 17, № 1. С. 8-14. [Kuzmenko L.G., Smyslova Z.V., Agarval R.K. The size of the thymus, fetal infection, and congenital malformations. *Elektronnyy nauchno-obrazovatelnyy vestnik "Zdorovye i obrazovaniye v XXI veke"* = *Online Scientific & Educational Bulletin "Health & Education Millennium"*, 2015, Vol. 17, no. 1, pp. 8-14. (In Russ.)]

21. Кузьменко Л.Г., Смылова З.В., Киселева Н.М., Быстрова О.В., Агарвал Р.К. К вопросу о тимусе, связанной с ним терминологии и состоянии здоровья детей с большим тимусом // Журнал научных статей «Здоровье и образование в XXI веке», 2015. Т. 17, № 4. С. 97-107. [Kuzmenko L.G., Smysova Z.V., Kiseleva N.M., Bystrova O.V., Agarval R.K. To the question of the thymus, associated terminology, and health status of children with a large thymus. *Zhurnal nauchnykh statey "Zdorov'ye i obrazovaniye v XXI veke" = Journal of Scientific Articles "Health and Education Millennium"*, 2015, Vol. 17, no. 4, pp. 97-107. (In Russ.)]
22. Кузьменко Л.Г., Тюрин Н.А., Мазурина М.А. Особенности анамнеза, соматического и нервно-психического статуса детей первого года жизни с тимомегалией // Педиатрия, 1985. Т. 64, № 2. С. 26-29. [Kuzmenko L.G., Tjurin N.A., Mazurina M.A. Features of anamnesis, somatic and neuropsychic status of children in the first year of life with thymomegaly. *Pediatrics = Pediatrya*, 1985, Vol. 64, no. 2, pp. 26-29. (In Russ.)]
23. Ластовка И.Н., Матвеев В.А. Клиническая характеристика острых респираторных инфекций у детей раннего возраста с синдромом увеличенной вилочковой железы // ARS medica, 2010. № 14. С. 35-40. [Lastovka I.N., Matveev V.A. Clinical characteristics of acute respiratory infections in young children with enlarged thymus syndrome. *ARS medica = ARS medica*, 2010, no. 14, pp. 35-40. (In Russ.)]
24. Лукашевич М.Г., Суразакова Т.Н. Тимомегалия и состояние здоровья детей первого года жизни // Российский вестник перинатологии и педиатрии, 2016. Т. 61, № 4. С. 163. [Lukashevich M.G., Surazakova T.N. Thymomegaly and the state of health of children in the first year of life. *Rossiyskiy Vestnik Perinatologii i Pediatрии = Russian Bulletin of Perinatology and Pediatrics*, 2016, Vol. 61, no. 4, p. 163. (In Russ.)]
25. Макаров С.Ю., Катиллов А.В., Макаров О.И. Тимомегалия тень прошлого в клинической практике настоящего // Дитячий лікар, 2015. № 8. С. 5-10. [Makarov S.Yu., Katilov A.V., Makarov O.I. Thymomegaly is a shadow of the past in the clinical practice of the present. *Dityachiy likar = Children's Doctor*, 2015, no. 8, pp. 5-10. (In Russ.)]
26. Матковская Т.В. К патогенезу тимомегалии у детей // Проблемы эндокринологии, 1988. Т. 34, № 2. С. 34-38. [Matkovskaya T.V. To the pathogenesis of thymomegaly in children. *Problemy endokrinologii = Problems of Endocrinology*, 1988, Vol. 34, no. 2, pp. 34-38. (In Russ.)]
27. Матковская Т.В. Увеличение тимуса у детей. Томск, 1991. 152 с. [Matkovskaya T.V. Thymus enlargement in children]. Tomsk, 1991. 152 p.
28. Мудрак Д.А., Наволкин А.М., Мыльников А.М., Положенов А.Е., Маслякова Г.Н. Гистологические признаки увеличения вилочковой железы // Журнал анатомии и гистопатологии, 2020. Т. 9, № 2. С. 46-52. [Mudrak D.A., Navolokin N.A., Mylnikov A.M., Polozhenkov A.E., Maslyakova G.N. Histological signs of the thymic enlargement. *Zhurnal anatomii i gistopatologii = Journal of Anatomy and Histopathology*, 2020, Vol. 9, no. 2, pp. 46-52. (In Russ.)]
29. Мухина А.А., Кузьменко Н.Б., Родина Ю.А., Кондратенко И.В., Бологов А.А., Латышева Т.В., Прордеус А.П., Пампура А.Н., Ильина Н.И., Латышева Е.А., Балашов Д.Н., Костинова А.М., Пашченко О.Е., Зиновьева Н.В., Зимин С.Б., Хорева А.Л., Моисеева А.А., Кутлянцева А.Ю., Филоненко Д.А., Барычева Л.Ю., Аллагулиева С.М., Хачирова Л.С., Сибгатулина Ф.И., Тузанкина И.А., Болков М.А., Шахова Н.В., Камалтынова Е.М., Хайруллина Р.М., Пролыгина Д.Д., Кальметьева Л.Р., Давлетбаева Г.А., Мирсаяпова И.А., Сулима Е.И., Гусева М.Н., Тоголян 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., Печкурова А.Д., Бармина Е.В., Парфенова А.Н., Исакова С.Н., Аверина Е.В., Сазонова И.В., Старикова С.Ю., Шилова Т.Ю., Асекретова Т.В., Супрун Р.Н., Клещенко Е.И., Лебедев В.В., Демихова Е.В., Демихов В.Г., Калинин В.А., Тимофеева Е.В., Павлова Т.Б., Шинкарева В.М., Гуркина М.В., Щербина А.Ю., Новичкова Г.А., Румянцев А.Г. Характеристика пациентов с первичными иммунодефицитными состояниями в Российской Федерации: от рождения до старости // Педиатрия. Журнал им. Г.Н. Сперанского, 2019. Т. 98, № 3. С. 24-31. [Mukhina A.A., Kuzmenko N.B., Rodina Yu.A., Kondratenko I.V., Bologov A.A., Latysheva T.V., Prodeus A.P., Pampura A.N., Ilyina N.I., Latysheva E.A., Balashov D.N., Kostinova A.M., Pashchenko O.E., Zinovieva N.V., Zimin S.B., Khoreva A.L., Moiseeva A.A., Kutlyantseva A.Yu., Filonenko D.A., Barycheva L.Yu., Allagullieva S.M., Khachirova L.S., Sibgatulina F.I., Tuzankina I.A., Bolkov M.A., Shakhova N.V., Kamaltynova E.M., Khairullina R.M., Prolygina D.D., Kalmetyeva L.R., 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., Pechkurova A.D., Barmina E.V., Parfenova A.N., Isakova S.N., Averina E.V., Sazonova I.V., Starikova S.Yu., Shilova T.Yu., Asekretova T.V., Suprun R.N., Kleshchenko E.I., Lebedev V.V., Demikhova E.V., Demikhov V.G., Kalinkina V.A., Timofeeva E.V., Pavlova T.B., Shinkareva V.M., Gurkina M.V., Shcherbina A.Yu., Novichkova G.A., Rummyantsev A.G. Characteristics of patients with primary immunodeficiency states in the Russian Federation: from birth to old age. *Pediatrics. Zhurnal im. G.N. Speranskogo = Pediatrics. G. Speransky Journal*, 2019, Vol. 98, no. 3, pp. 24-31. (In Russ.)]
30. Николс Дж.Г., Мартин А.Р., Валлас Б.Дж., Фукс П.А. От нейрона к мозгу. Пер. с англ. 4-е изд. М.: УРСС, 2003. С. 525-531. [Nichols J.G., Martin A.R., Wallas B.J., Fuchs P.A. From Neuron to Brain]. Moscow: URSS, 2003, pp. 525-531.
31. Острая респираторная вирусная инфекция (ОРВИ) у детей. Клинические рекомендации / Союз педиатров России. 2018. 33 с. [Acute Respiratory Viral Infection (ARVI) in children. Clinical guidelines]. The Union of Pediatricians of Russia, 2018. 33 p.

32. Пальцев М.А., Кветной И.М. Руководство по нейроиммуноэндокринологии. М.: Медицина, 2008. С. 512. [Paltsev M.A., Kvetnoy I.M. Guide to neuroimmunoendocrinology]. Moscow: Medicine, 2008. 512 p.
33. Пирс Г. Гистопатология тимуса // Токсикологическая патология, 2006. Т. 34, № 5. С. 515-547. [Pirs G. Thymus histopathology. *Toksikologicheskaya patologiya = Toxicological Pathology*, Vol. 34, no. 5, pp. 515-547. (In Russ.)]
34. Прилуцкая В.А. Функциональное состояние гипофизарно-тиреоидной системы у детей раннего возраста с синдромом тимомегалии. Минск, 2001. С. 256-260. [Priluckaya V.A. The functional state of the pituitary-thyroid system in young children with thymomegaly syndrome]. Minsk, 2001, pp. 256-260.
35. Протокол клинической апробации метода профилактики, диагностики, лечения и реабилитации «Использование современных методов и технологий для выявления осложнений и оценки эффективности персонализированной реабилитации детей с первичными иммунодефицитными состояниями» /ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России. [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://static-0.minzdrav.gov.ru/system/attachments/attaches/000/047/035/original/2019-55-7.pdf?1566834518> (дата обращения: 20.06.2022) [Protocol of clinical approbation of the method of prevention, diagnosis, treatment and rehabilitation “The use of modern methods and technologies to identify complications and evaluate the effectiveness of personalized rehabilitation of children with primary immunodeficiency conditions”. Dmitry Rogachev National Medical Research Center Of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology [Electronic resource]. Access mode: <https://static-0.minzdrav.gov.ru/system/attachments/attaches/000/047/035/original/2019-55-7.pdf?1566834518> (date of application June 20, 2022).
36. Румянцев А.Г. Перспективы развития клинической иммунологии // Вопросы гематологии/онкологии иммунопатологии в педиатрии, 2020. Т. 19, № 4 (прил.). С. 14-17. [Rumyantsev A.G. Prospects for the development of clinical immunology. *Voprosy gematologii/onkologii immunopatologii v pediatrii = Pediatric Hematology/Oncology and Immunopathology*, 2020, Vol. 19, no. 4 (suppl.), pp. 14-17. (In Russ.)]
37. Силантьева И.В., Ровда Ю.И., Бадьина О.С., Хасанова И.Г. Сонометрические параметры вилочковой железы у здоровых и больных детей первых двух лет жизни // Сибирский медицинский журнал (Томск), 2012. Т. 27, № 1. С. 103-106. [Silanteva I.V., Rovda Yu.I., Badyina O.S., Khasanova I.G. Sonometric parameters of the thymus gland in healthy children and in ill children of the first and second years of life. *Sibirskiy meditsinskiy zhurnal (Tomsk) = Siberian Medical Journal (Tomsk)*, 2012, Vol. 27, no. 1, pp. 103-106. (In Russ.)]
38. Толстова Е.М., Зайцева О.В. Физиология и патология тимуса в детском возрасте // Педиатрия. Журнал им. Г.Н. Сперанского, 2018. Т. 97, № 6. С. 166-172. [Tolstova E.M., Zaitseva O.V. Thymus physiology and pathology in childhood. *Pediatriya. Zhurnal im. G.N. Speranskogo = Pediatrics. G. Speransky Journal*, 2018, Vol. 97, no. 6, pp. 166-172. (In Russ.)]
39. Харченко В.П., Саркисов Д.С., Ветшев П.С., Галил-Оглы Г.А., Заратьянц О.В. Болезни вилочковой железы. М.: Триада-Х, 1998. 232 с. [Kharchenko V.P., Sarkisov D.S., Vetshev P.S., Galil-Ogly G.A., Zaratyants O.V. Diseases of the thymus gland]. Moscow: Triada-X, 1998. 232 p.
40. Хлыстова З.С., Калинина И.И., Шмелева С.П. Время появления эндокринной и лимфоцитопоэтической функции тимуса человека в эмбриогенезе // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины, 2000. Т. 130, № 10. С. 453-457. [Khlystova Z.S., Kalinina I.I., Shmeleva S.P. Time of appearance of endocrine and lymphocytopoietic function of the human thymus in embryogenesis. *Byulleten eksperimentalnoy biologii i meditsiny = Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 2000, Vol. 130, no. 10, pp. 453-457. (In Russ.)]
41. Эсмурзиева З.И., Кузьменко Л.Г., Осадчая О.А., Каск Л.Н. Морфометрия тимуса плодов различного гестационного возраста и доношенных новорожденных детей по данным ультразвукового исследования // Педиатрия. Журнал им. Г.Н. Сперанского, 2015. Т. 94, № 1. С. 68-72. [Esmurzieva Z.I., Kuzmenko L.G., Osadchaya O.A., Kask L.N. Morphometry of thymus in fetus of different gestational age and term newborns by ultrasound examination. *Pediatriya. Zhurnal im. G.N. Speranskogo = Pediatrics. G. Speransky Journal*, 2015, Vol. 94, no. 1, pp. 68-72. (In Russ.)]
42. Якубова З.Х., Олимова К.С., Абдуллаева Н.Ш. Роль тимомегалии в формировании состояния здоровья детей раннего возраста // Здравоохранение Таджикистана, 2015. № 1. С. 85-89. [Yakubova Z.Kh., Olimova K.S., Abdullaeva N.Sh. The role of thymomegaly in the health formation of early age children. *Zdravookhraneniye Tadjikistana = Healthcare of Tajikistan*, 2015, no. 1, pp. 85-89].
43. Amatuni G.S., Currier R.J., Church J.A., Bishop T., Grimbacher E., Nguyen A.A., Agarwal-Hashmi R., Aznar C.P., Butte M.J., Cowan M.J., Dorsey M.J., Dvorak C.C., Kapoor N., Kohn D.B., Markert M.L., Moore T.B., Naides S.J., Sciortino S., Feuchtbaum L., Koupaei R.A., Puck J.M. Newborn screening for severe combined immunodeficiency and T-cell lymphopenia in California, 2010-2017. *Pediatrics*, 2019, Vol. 143, no. 2, e20182300. doi: 10.1542/peds.2018-2300.
44. Ansari A.R., Liu H. Acute thymic involution and mechanisms for recovery. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz)*, 2017, Vol. 65, no. 5, pp. 401-420.
45. Birnbaum G. Studies on brain-thymus cross-reactive antigens. *Brain Res.*, 1975, Vol. 84, no. 1, pp. 111-121.
46. Cowan J.E., Takahama Y., Bhandoola A., Ohigashi I. Postnatal involution and counter-involution of the thymus. *Front. Immunol.*, 2020, no. 11, 897. doi: 10.3389/fimmu.2020.00897.
47. Elkarow M.H., Hamdy A.A. Suggested role of human growth hormone in control of the COVID-19 pandemic. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*, 2020, Vol. 11, 569633. doi:10.3389/fendo.2020.569633.

48. Hofmann W.J., Möller P., Otto H.F. Thymic hyperplasia. I. True thymic hyperplasia. Review of the literature. *Klin. Wochenschr.*, 1987, Vol. 65, no. 2, pp. 49-52.
49. Lemons D., McGinnis W. Genomic evolution of Hox gene clusters. *Science*, 2006, Vol. 313, no. 5795, pp. 1918-1922.
50. Li H., Wetchapinant C., Zhang L., Wu K. High-fat diet from weaning until early adulthood impairs T cell development in the thymus. *Lipids*, 2020, Vol. 55, no. 1, pp. 35-44.

Авторы:

Ровда Ю.И. — д.м.н., профессор кафедры педиатрии и неонатологии ФГБОУ «Кемеровский государственный медицинский университет», г. Кемерово, Россия

Минаялова Н.Н. — д.м.н., профессор кафедры педиатрии и неонатологии ФГБОУ «Кемеровский государственный медицинский университет», г. Кемерово, Россия

Ведерникова А.В. — ассистент кафедры педиатрии и неонатологии ФГБОУ «Кемеровский государственный медицинский университет», г. Кемерово, Россия

Шабалдин А.В. — д.м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории пороков сердца ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», г. Кемерово, Россия

Халивопуло И.К. — главный областной специалист сердечно-сосудистый хирург, и.о. заведующего отделением кардиохирургии (операционный блок), врач — сердечно-сосудистый хирург ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», г. Кемерово, Россия

Зинчук С.Ф. — к.м.н., заведующий кафедрой морфологии и судебной медицины ФГБОУ «Кемеровский государственный медицинский университет», г. Кемерово, Россия

Шмакова О.В. — к.м.н., заведующая кафедрой педиатрии и неонатологии ФГБОУ «Кемеровский государственный медицинский университет», г. Кемерово, Россия

Лобыкина А.А. — ординатор по специальности «педиатрия» ФГБОУ «Кемеровский государственный медицинский университет», г. Кемерово, Россия

Authors:

Rovda Yu.I., PhD, MD (Medicine), Professor, Department of Pediatrics and Neonatology, Kemerovo State Medical University, Kemerovo, Russian Federation

Minyailova N.N., PhD, MD (Medicine), Professor, Department of Pediatrics and Neonatology, Kemerovo State Medical University, Kemerovo, Russian Federation

Vedernikova A.V., Assistant Professor, Department of Pediatrics and Neonatology, Kemerovo State Medical University, Kemerovo, Russian Federation

Shabaldin A.V., PhD, MD (Medicine), Leading Research Associate, Laboratory of Heart Diseases, Research Institute of Complex Problems of Cardiovascular Diseases, Kemerovo, Russian Federation

Khalivopulo I.K., Chief Specialist in Cardiosurgery, Acting Head, Cardiosurgical Department (Surgical Unit), Research Institute of Complex Problems of Cardiovascular Diseases, Kemerovo, Russian Federation

Zinchuk S.F., PhD (Medicine), Head, Department of Morphology and Forensic Medicine, Kemerovo State Medical University, Kemerovo, Russian Federation

Shmakova O.V., PhD (Medicine), Head, Department of Pediatrics and Neonatology, Kemerovo State Medical University, Kemerovo, Russian Federation

Lobykina A.A., Resident (Pediatrics), Kemerovo State Medical University, Kemerovo, Russian Federation

АСПЕКТЫ ВИЛОЧКОВОЙ ЖЕЛЕЗЫ ДЕТСКОГО ВОЗРАСТА: МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ РЕЦИПРОКНЫЕ СВЯЗИ ТИМУСА И НЕРВНО-ЭНДОКРИННОЙ СИСТЕМЫ, И В ЧАСТНОСТИ С ГОРМОНАМИ СОМАТОТРОПНОЙ ОСИ

Миняйлова Н.Н.¹, Ровда Ю.И.¹, Ведерникова А.В.¹, Шабалдин А.В.²,
Зинчук С.Ф.¹, Шмакова О.В.¹, Голомидов А.В.³, Лобыкина А.А.¹,
Сохарев В.В.¹

¹ ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ», г. Кемерово, Россия

² ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», г. Кемерово, Россия

³ ГАУЗ «Кузбасская клиническая больница имени С.В. Беляева» г. Кемерово, Россия

Резюме. Огромной загадкой биологии, медицины (в первую очередь – иммунологии), и в том числе педиатрии, является вилочковая железа (тимус). Сложность изучения заключается в огромном количестве интегральных связей вилочковой железы с другими компонентами иммунной системы, нейроэндокринной, гемопоэтической системами, соединительной тканью, органами (и клетками) обеспечивающих барьерную функцию и т.д. Вычленить из этого континуума функции, непосредственно касающиеся тимуса, или определить конкретное ролевое участие факторов молекулярного уровня (нейропептидов, гормона роста и др.) на иммунную физиологию еще окончательно не решенная проблема. В данном обзоре, посвященном современному состоянию проблемы рассмотрены морфофункциональные взаимосвязи между тимусом, нейроэндокринной системой и, в частности, с гормонами соматотропной оси. Это взаимодействие может проявляться и клиническим полиморфизмом, которое может быть связано с нарушением формообразования (органогенеза) на очень ранней стадии эмбриогенеза; именно, с влиянием семейства генов, определяющих судьбу каждого сегмента эмбриона – Нох-генами (контролирующих экспрессию других функционально взаимосвязанных между собой генов. Ранее было доказано, что продуцируемые тимусом Т-лимфоциты и нейроны головного мозга экспрессируют один и тот же антиген (Thy-антиген), считавшийся до этого момента специфическим антигеном Т-лимфоцитов. Выявлен общий молекулярный «язык» (с помощью меди-

Адрес для переписки:

Ведерникова Алена Владимировна
ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ
650000, г. Кемерово, ул. Орджоникидзе, 5, кв. 45.
Тел.: 8 (929) 351-43-82, (913) 288-17-89.
E-mail: cmombilla@gmail.com, y.i.rovda@rambler.ru

Address for correspondence:

Alena V. Vedernikova
Kemerovo State Medical University
5 Ordzhonikidze St, Apt 45
Kemerovo
650000 Russian Federation
Phone: +7 (929) 351-43-82, (913) 288-17-89.
E-mail: cmombilla@gmail.com, y.i.rovda@rambler.ru

Образец цитирования:

Н.Н. Миняйлова, Ю.И. Ровда, А.В. Ведерникова, А.В. Шабалдин, С.Ф. Зинчук, О.В. Шмакова, А.В. Голомидов, А.А. Лобыкина, В.В. Сохарев «Аспекты вилочковой железы детского возраста: морфофункциональные реципрокные связи тимуса и нервно-эндокринной системы, и в частности с гормонами соматотропной оси» // Медицинская иммунология, 2023. Т. 25, № 1. С. 69–80.
doi: 10.15789/1563-0625-TGA-2500

© Миняйлова Н.Н. и соавт., 2023
Эта статья распространяется по лицензии Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

N.N. Minyailova, Yu.I. Rovda, A.V. Vedernikova, A.V. Shabaladin, S.F. Zinchuk, O.V. Shmakova, A.V. Golomidov, A.A. Lobykina, V.V. Sokharev “Thymic gland aspects in childhood: morpho-functional reciprocal relationships between thymus, nervous and endocrine system, in particular, with the somatotrophic axis hormones”, Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2023, Vol. 25, no. 1, pp. 69–80.
doi: 10.15789/1563-0625-TGA-2500

© Minyailova N.N. et al., 2023
The article can be used under the Creative Commons Attribution 4.0 License
DOI: 10.15789/1563-0625-TGA-2500

аторов межклеточного взаимодействия) для обмена сигнальной информацией между клетками, тканями и органами трех указанных систем — регуляторов (нервной, эндокринной, иммунной). Интерес педиатров к этой области знаний связан с определенным пониманием онтогенеза человека от рождения до старости, где тимус основную роль осуществляет в антенатальном периоде и раннем детстве. Основной ряд суждений по данному научному направлению имеет не только теоретический характер, но и важен с практической точки зрения. Поскольку любая критическая инволюция тимуса сопровождается потерей числа генерируемых и экспортируемых клеток, терапия на основе гормонов может стать альтернативной стратегией для восстановления органа, увеличения пролиферации тимоцитов и экспорта зрелых Т-клеток в периферические лимфоидные органы. Появились огромные возможности клинической иммунологии благодаря разработке эффективных гносеологических методов, таких как: генетический нокаут (knock-out), трансгенные модели на животных с переносом стволовых клеток человека, трансплантация гемопоэтических и иммунопоэтических клеток при первичных (ПИД) и вторичных иммунодефицитах, опухолях иммунной системы, аутовоспалительных заболеваниях и, наконец, инфекциях иммунной системы.

Ключевые слова: тимус, вилочковая железа, гормон роста, соматотропин, нейроэндокринная система, дети

THYMIC GLAND ASPECTS IN CHILDHOOD: MORPHO-FUNCTIONAL RECIPROCAL RELATIONSHIPS BETWEEN THYMUS, NERVOUS AND ENDOCRINE SYSTEM, IN PARTICULAR, WITH THE SOMATOTROPHIC AXIS HORMONES

Minyailova N.N.^a, Rovda Yu.I.^a, Vedernikova A.V.^a, Shabaldin A.V.^b, Zinchuk S.F.^a, Shmakova O.V.^a, Golomidov A.V.^c, Lobykina A.A.^a, Sokharev V.V.^a

^a Kemerovo State Medical University, Kemerovo, Russian Federation

^b Research Institute of Complex Problems of Cardiovascular Diseases, Kemerovo, Russian Federation

^c S. Belyaev Kuzbass Clinical Hospital, Kemerovo, Russian Federation

Abstract. Thymic gland (thymus) represents a huge mystery for biology, medicine (primarily immunology), including pediatric issues. Complexity of the study is determined by the multiplicity of integral connections of thymus with other components of immune system, neuroendocrine, hematopoietic systems, connective tissue, different organs and cells which provide appropriate barrier function. Discerning the direct thymic function from this continuum, or determining specific role of molecular factors (neuropeptides, growth hormone, etc.) upon the immune physiology represents a problem which is not yet resolved. In this review article dedicated to the current state of the problem, we consider the morphological and functional relationships between thymus, neuroendocrine system and, in particular, with hormones of the somatotrophic axis. These interactions may also manifest by clinical heterogeneity which may be associated with impaired morphogenesis (organogenesis) at a very early stage of embryogenesis; namely, under the influence of gene family that determine the fate of each segment of the embryo-Hox genes which control the expression of other, functionally interconnected genes. Previously, T lymphocytes produced by the thymus and brain neurons have been shown to express the same antigen (Thy antigen), which was considered a specific antigen of T lymphocytes. A common molecular language, mediated by the molecules of intercellular interaction, was revealed which is used for the signal exchange between the cells, tissues and organs regulating the three mentioned systems (nervous, endocrine and immune). The interest of pediatricians in this field is associated with definite concept of human ontogenesis, from birth to elderly age, with thymic gland playing the main role, since antenatal period to early childhood. The main line of reasoning in this research area is not only theoretical, but also important from practical point of view. Since any critical involution of the thymus is accompanied by reduced number of produced and exported cells, a hormone-based therapy may be an alternative strategy to restore the organ by increasing thymocyte proliferation, and exporting mature T cells to peripheral lymphoid organs. Great opportunities have been opened in clinical immunology due to development of effective epistemological methods, e.g., genetic knock-out, transgenic animal models with human stem cell transfer, transplantation of hematopoietic and immunopoietic cells in primary and secondary immunodeficiencies, immune cell malignancies, autoinflammatory diseases, and, finally, infections of the immune system.

Keywords: thymus, growth hormone, relationship, somatotropin, neuroendocrine system, children

Тимус и нейроэндокринная регуляция

В современных условиях и на волне новой инфекции COVID-19 в клинической практике вновь становятся приоритетными аспекты, связанные с иммуногенезом и управлением иммунитета, его взаимосвязями с другими системами.

В последние 2 десятилетия иммунную и нейроэндокринную системы представляют как единый структурно-функциональный блок, где тимус рассматривают как звено, участвующее в кооперации функции этих систем [5, 6, 7, 15, 30, 32, 42]. Показано, что в результате сложных внутренних структурно-функциональных взаимосвязей тимус играет важнейшую роль в гормональном равновесии, действуя синхронно с гипофизарно-надпочечниковым комплексом на иммуногенез и лимфопоэз [32]. Тимус как бы является обязательной точкой пересечения для взаимодействия этих основных систем через межклеточные сигнальные процессы [5, 6, 28, 32], а соматотропному гормону (СТГ) и другим гипофизарным гормонам отводят при этом роль регуляторных сигналов [2, 9]. Есть доказательства, что у тимэктомированных мышей ослабляется продукция пролактина (PRL), соматотропного, аденокортикотропного (АКТГ), фолликулостимулирующего и лютеинизирующего гормонов, гормонов щитовидной железы, нарушается репродуктивная функция. Например, Кузьменко Л.Г. (2012) отмечает, что детям с врожденной тимомегалией присущ дизрафический статус, проявляющийся пороками развития центральной нервной и эндокринной систем, либо нарушением функции этих органов (в той или иной степени), что также сопряжено с их определенным дисморфизмом. А тимомегалия (ТМ) в подобных случаях является одним из сочетанных симптомов поражения нервной, эндокринной и иммунной систем, которые рассматриваются в рамках нервно-эндокринно-иммунного синдрома с ТМ (НЭИСТМ), [16]. Этот синдром может быть как изолированным, так и сочетаться с другими признаками дизэмбриогенеза. Ссылаясь на работы Nicols J.G. и соавт. (2003) и Lemons D. и соавт. (2006), автор достаточно логично обосновывает и связывает появление такого клинического полиморфизма с нарушением формообразования (органогенеза) на очень ранней стадии эмбриогенеза, а именно с влиянием семейства генов, определяющих судьбу каждого сегмента эмбриона – Нох-генами (контролирующих экспрессию других функционально взаимосвязанных между собой генов) [10, 16, 33].

Предпосылками для изучения данного направления могут считаться исследование 30-х го-

дов XX века, когда была обнаружена инволюция тимуса крысы после гипофизэктомии [37, 47] и исследования Bearn J., Verinhet A., получившим обратный эффект (тимомегалию) после подобной операции на животных [17]. Аналогичные изменения наблюдали у анэнцефалов [18]. В 90-х годах, в работе Goffetal., (1987) появились первые данные о способности гормона роста подавлять инволюцию тимуса, а позже экспериментально было показано, что продолжительное введение СТГ человека гипофизэктомированным крысам стимулирует рост лимфоидной ткани [38, 40]. Благодаря контролируемому тимусом иммунным процессам его взаимодействие с нейроэндокринной системой является особенно важным в перинатальный период жизни у млекопитающих и существенно меняется при старении организма [6]. Предполагают, что перинатальный тимус находится под гипофизарным контролем, который осуществляется по следующей цепи или схеме: аденогипофиз → СТГ → тимус → Т-лимфоциты. Центральное место в этой системе отводится СТГ, рецепторы к которому были обнаружены на лимфоцитах, нейтрофилах, фибробластах и макрофагах [5]. В результате было выдвинуто предположение, что между тимусом и гипофизом имеет место функциональная связь, проявляющаяся взаимным усилением выработки ряда гормонов. Особенно существенную роль в этой цепочке со стороны гипофиза играют СТГ, пролактин, производные проопиомеланокортина, а со стороны тимуса – тимулин и тимопоэтин. Адекватное функционирование данных взаимодействий обеспечивает, в свою очередь, и нормальную функцию тимуса [4, 5].

Предполагают, что гормоны гипофиза, прежде всего СТГ и пролактин, действуют как модуляторы иммунной системы и, подобно глюкокортикоидам (ГК), считаются связанными со стрессом гормонами, оказывая противоположное действие на жизнеспособность и пролиферацию клеток тимуса [38].

В настоящее время известно, что тимоциты и первичные культуры эпителиальных клеток тимуса также могут производить и секретировать гормон роста (ГР) [37, 47, 48].

Среди нейроиммуноэндокринных сигнальных молекул тимуса различают собственно гормоны тимуса, биогенные амины и пептидные гормоны, синтезируемые в APUD-клетках, лимфоцитах и клетках микроокружения (ТЭК, ретикулоэндотелиальные, тучные и дендритные клетки, макрофаги, клетки APUD-серии). Это микроокружение секретирует такие регуляторные пептиды, как: тот же соматотропин, гонадо-

тропины, адренокортикотропный гормон, тиротропин, эндорфины и энкефалины, пролактин, нейропептиды (нейротензин, вещество Р, ВИП, холецистокинин, соматостатин, окситоцин, вазопрессин, нейротензины, метэнкефалин, АКТГ, предсердный натрийуретический пептид), что свидетельствует о том, что сама вилочковая железа выступает не только как иммунный орган, но и как эндокринный [26]. Цитокины и тимические гормоны осуществляют свое специфическое действие аутокринным или паракринным путем, влияя на дифференцировку Т-лимфоцитов и гемопоэтические клетки [16]. В свою очередь, гормоны, продуцируемые эндокринными железами, прежде всего гипофизом и надпочечниками (включая СТГ и ГК), также вовлечены в тимическое микроокружение [26].

В гомеостатической функции тимуса перечисленным гормонам и нейропептидам отводится ведущая роль. К истинным гормонам тимуса относят: а1-тимозин (являющийся продуктом процессинга протимозина-а), тимулин, тимопоэтины I и II, а также их активный пентопептидный фрагмент – тимопентин (ТР-5). Максимальный уровень выработки гормонов тимуса наблюдается в раннем возрасте – до начала полового созревания. С увеличением продолжительности жизни секреторная активность ТЭК и концентрация гормонов тимуса в сыворотке крови снижаются. Это снижение играет ключевую роль в возрастном влиянии тимуса на иммунную систему. Было показано, что использование гормонов тимуса в качестве лекарственных средств может корректировать возрастные нарушения в иммунной системе [16].

В последнее время существует тенденция относить гормоны тимуса к нейропептидам. Считается, что основные клетки-мишени этих гормонов находятся вне тимуса. Например, это Т-лимфоциты, недавно мигрировавшие из тимуса и не получившие полного набора функциональных качеств, свойственных периферическим наивным Т-клеткам, в частности способности интенсивно продуцировать ИЛ-2 при активации [16]. Показано, что под влиянием гормонов тимуса меняются поведенческие реакции, происходит ослабление чувства тревоги, повышение резистентности к стрессу [16].

Исторически тимулин (или тимусный гуморальный фактор) является первым тимусным гормоном, который был обнаружен в сыворотке крови, связанным с белком-носителем. В сыворотке крови присутствует и белок-ингибитор тимулина. В результате ряда экспериментов было доказано, что тимус является единственным ис-

точником тимулина, который полностью исчезает из крови при проведении тимэктомии [16]. При этом циркадные ритмы, свойственные тимулину, совпадают с циркадными ритмами гормонов гипофизарно-надпочечниковой оси [16]. Гонадотропин-рилизинг фактор, андрогены, эстрогены и гестагены усиливают продукцию тимулина и его высвобождение из ТЭК *in vitro*. Однако *in vivo* обычно проявляется противоположный эффект половых гормонов, состоящий в угнетении пролиферации ТЭК и индукции инволюции тимуса [16]. Среди цитокинов наиболее выраженным стимулирующим действием на выработку тимулина обладает ИЛ-1 [16].

Установлено, что *in vivo* тимопоэтин контролирует Т-зависимый иммунитет и участвует в подавлении индукции ранней дифференцировки В-лимфоцитов. Оказывает влияние на нервно-мышечную проводимость (свойственна в большей степени тимопоэтину I) и дифференцировку Т-клеток (сильнее проявляется у тимопоэтина II). Тимопоэтины усиливают экспрессию проопиомеланокортина, секрецию продуктов его процессинга – АКТГ, β-эндорфина и β-липотропина, а также СТГ и кортизола [16]. Тимулин стимулирует выработку как СТГ, так и пролактина [15]. В свою очередь пролактин способствует выживанию и пролиферации ранних предшественников Т-клеток. Так, клетки тимуса пожилых крыс-реципиентов (имеющие исходно признаки инволюции тимуса) при пересадке клеток аденомы гипофиза, секретирующих ГР и пролактин, оказались восстановленными [8, 10].

Имеются факты сопряженности между тимэктомией и стойким снижением уровня кортизола (в крови, моче), а также с увеличением массы надпочечников. Из тимуса выделен фактор, ингибирующий функцию коры надпочечников. При этом взаимодействие тимуса с надпочечниками осуществляется через нервную систему, гипофиз и гипоталамус, а следовательно, и через СТГ [5]. Согласно единичным опубликованным данным, низкие уровни тимулина также совпадают с дефицитом продукции СТГ у детей, тогда как лечение гормоном роста последовательно восстанавливает эту эндокринную функцию тимуса, и данный процесс отмечается уже через 24 часа после инъекции гормона. Напротив, у пациентов с акромегалией, где имеет место хроническая гиперпродукция гормона роста (соматотропина, СТГ), были обнаружены повышенные уровни тимулина в сыворотке крови [44, 45]. В литературе описан случай, когда пациент с акромегалией и высоким уровнем ГР и ИФР-1 (инсулиноподобный фактор роста-1) обладал гиперплазией

тимуса, что было диагностировано при рентгенографии и компьютерной томографии [44].

Тимус и гормоны соматотропной оси

Гормон роста (ГР), являясь одним из представителей семейства факторов роста, вырабатывается и депонируется в основном в передней доле гипофиза под контролем гипоталамических гормонов (ГР-рилизинг-гормон, ингибирующий высвобождение ГР-гипоталамический фактор, соматостатин), при этом он продуцируется и другими типами клеток, включая лейкоциты. В настоящее время доказано, что СТГ, помимо своих определяющих функций (продольный рост кости, скелетное созревание, накопление костной массы) принимает активное участие в развитии и функционировании иммунной системы организма [4, 36]. Его стимулирующее влияние сказывается на тимусе, селезенке, Т- и В-лимфоцитах, а экспрессия высокоаффинных рецепторов для ГР отмечена на клетках костного мозга, тимуса, спленocyтах, периферических лимфоцитах и макрофагах [26]. В последнее время появились данные, свидетельствующие о том, что ГР участвует в модуляции фагоцитарного звена иммунитета, которое является важным участком неспецифической резистентности и ранних процессов клеточного специфического иммунного ответа [26].

Получены данные о том, что СТГ не только усиливает пролиферацию ТЭК (тимические эпителиальные клетки) и тимоцитов, но и ускоряет миграцию последних через экстрацеллюлярный матрикс, повышает проникновение предшественников Т-клеток в тимус, усиливает поступление незрелых тимоцитов к клеткам-«нянькам» и выход из них (что обусловлено и действием ИФР-1), регулирует экспорт из тимуса зрелых тимоцитов [1, 14, 39, 41, 42, 44, 48]. Продемонстрировано положительное действие ГР на взаимодействие тимоцитов / эндотелия тимуса, включая трансэндотелиальную миграцию [34].

По данным Savino W. и соавт. (2015), при увеличении содержания в крови СТГ масса тимуса увеличивается, а при снижении уровня СТГ имеет место подавление клеточного и гуморального иммунитета. В то же время авторы указывают, что удаление тимуса в эксперименте способствует увеличению уровня соматотропного гормона [44]. В исследованиях Lins M.P. и соавт. (2016) было показано, что введение мышам антисыворотки против гормона роста вызывает атрофию тимуса, а имплантация секретирующих ГР клеток из аденомы гипофиза у старых крыс увеличивает размер тимуса [21, 36, 44]. В свою очередь, в эксперименте у карликовых мышей с дефицитом ГР его введение увеличивает клеточность тимуса и

пролиферацию Т-клеток [37]. При Т-клеточном иммунодефиците, СТГ стимулирует пролиферацию и дифференцировку Т-клеток путем усиления генерации цитотоксических Т-лимфоцитов, и секреция СТГ находится под прямым контролем гипоталамического дофамина, количество которого повышается при тимомегалии [44]. Данные тимотропные свойства ГР можно частично объяснить противодействием индуцированным стрессом иммуносупрессивным глюкокортикоидам [26]. Приводятся доказательства того, что трансгенные мыши со сверхэкспрессией ГР, а также мыши и взрослые люди, получавшие рекомбинантные формы гормона, имеют увеличенный тимус [44]. При этом тимотропный эффект ГР заключается в улучшении функционирования тимуса, повышении приживаемости костного мозга и стимуляции гемопоэза у старых животных или у животных с подавленным иммунитетом [29, 44].

СТГ регулирует тимическое микроокружение, повышая секрецию и высвобождение цитокинов (прежде всего интерлейкина-1 и интерлейкина-6 [37]), хемокинов и тимулина [7, 35, 38, 39, 43, 46], модулируя при этом адгезию и миграцию тимоцитов [32, 36, 37], а также выработку белков внеклеточного матрикса [36]; увеличивает отложение (депонирование) белков, способствующих миграции клеток, таких как ламинины и стромальный клеточный фактор-1 [44]. В эксперименте миграция тимоцитов, полученных от трансгенной по ГР мыши или от мыши, в тимус которой был инъецирован этот гормон, усиливается в сторону источников стромального клеточного фактора-1 и ламининов [44]. Полученные данные наводят на мысль о том, что ГР индуцирует изменения репертуара Т-клеток тимуса и периферических лимфоидных органов, но окончательных экспериментальных данных, подтверждающих данное суждение, пока не представлено [5, 26, 36, 44].

Получены новые результаты о том, что у взрослых людей в клетках иммунной системы содержатся разные изоформы СТГ: в цитоплазме Т- и В-лимфоцитов селезенки обнаруживается СТГ с молекулярным весом 100 кДа, а в ядрах клеток этот гормон имеет меньшую молекулярную массу – 48 и 65 кДа [37]. Предполагается, что образование изоформ СТГ является важным механизмом адаптации и/или защиты лимфоидных клеток от окислительного стресса [14].

По некоторым данным, ГР ослабляет воспаление и возрастное увеличение липотоксичности в тимусе [22].

Необходимо подчеркнуть, что многие эффекты (или реакции) ГР находятся под контролем ИФР-1, а также ИФР-2 [44]. В том числе и в тимусе значимый ряд эффектов ГР опосредуются через ИФР-1. Реализация тимотропного эффекта СТГ через ИФР-1 доказана экспериментально, где ИФР-1 вызывает быстрое увеличение количества лимфоидных клеток в органной культуре эмбрионального тимуса. Блокада ИФР-1 и ИФР-2, (а также их рецепторов) сопровождается повышением уровня CD4-CD8-клеток, вероятно вследствие подавления их дифференцировки. Введение ГР или ИФР-1 обращает вспять инволюцию тимуса, усиливает тимопоэз у старых грызунов и ускоряет восстановление иммунитета у животных с иммунодефицитом [29, 44]. В свою очередь, ГР продуцируют Т- и В-лимфоциты, а его синтез и продукция в эксперименте значительно усиливается после активации данных клеток Т-клеточным митогеном Кон А, а циклогексимид и актиномицин D (ингибиторы синтеза белков и РНК), напротив, блокируют синтез «эндоиммунного» гормона роста. Кроме того, СТГ повышает стимулированную фитогемагглютинином (ФГА – клеточный митоген) дозозависимую пролиферацию клеток в реакции бласттрансформации лимфоцитов и экспрессию HLA-DR-антигенов на поверхности моноцитов [5]. Сами клетки тимуса способны продуцировать и выделять ИФР-1, а также экспрессировать соответствующий рецептор. В частности предполагают, что влияние ГР на тимулин опосредовано через ИФР-1, так как ингибируется антителами к ИФР-1 или к ИФР1 – рецептору (IGF-R) [6, 24, 49]. Определено, что ось ГР / ИФР-1 может модулировать экспрессию цитокинов, хемокинов, молекул и рецепторов экстрацеллюлярного матрикса (ЕМС) в тимусе, свойства адгезии и миграции тимоцитов и способствует их выходу. Данные исследований Mendes-da-Cruz D.A. и соавт. (2018) также указывают, что эффекты ГР могут регулироваться ИФР-1 который, в свою очередь, может связывать ИФР-1 и рецептор инсулина [36].

В эксперименте линии мышинных ТЭК, обработанные ГР или ИФР-1, помимо экспрессии интегринов VLA-5 (интегрин α -5 и β -1, рецептор фибронектина) и VLA-6 (интегрин α -6 и β -1, рецептор ламинина) демонстрируют усиление продукции молекул ЕСМ, таких как коллаген IV типа, фибронектин и ламинин. Экспериментально показано, что усиление эффекта ГР-роста в результате продукции тимулина, экспрессия элементов экстраклеточного матрикса и адгезия развивающихся тимоцитов к ТЭК могут быть блокированы после обработки клеток антитела-

ми к гормону роста, к ИФР-1 или к рецептору ИФР-1 [41, 44]. Поскольку взаимодействия тимоцитов и ТЭК имеют решающее значение для физиологии тимуса и развития его клеток, можно предположить, что вместе ось ГР / ИФР-1, помимо ИФР-2 и инсулина, также может формировать репертуар Т-клеток.

Что касается ГР, продуцируемого клетками тимуса человека, то он способен стимулировать пролиферацию культивируемых тимоцитов [24]. Транскрипция ГР, а также ИФР-1, ИФР-2 и родственных им рецепторов преимущественно происходит в ТЭК, но в то же время низкий уровень транскрипции ГР и ИФР-1 рецептора наблюдался и в Т-клетках тимуса [31]. Также сообщалось, что экзогенный ГР способен стимулировать выработку тимулина и ИФР-1, а также пролиферацию ТЭК. Все эти результаты предполагают, что локально синтезированные ГР и ИФР-1 могут играть важную роль в качестве факторов роста тимоцитов и ТЭК [23, 40].

Выявлено, что тимоциты и ТЭК (корковые и мозговые) экспрессируют рецепторы для СТГ (обнаруженные и на макрофагах тимуса), а также для пролактина, ИФР-1 и ИФР-2, которые играют роль в функционировании тимуса и дифференцировке Т-клеток. По данным Savino W. и соавт. (2015), экспрессия рецепторов ГР особенно выражена в незрелых тимоцитах как в эксперименте у мышей, так и у взрослых людей [44]. Следует отметить, что медулярные и субкапсулярные ТЭК содержат больше рецепторов СТГ относительно кортикальных, а максимальную экспрессию данных рецепторов среди тимоцитов имеют CD4-CD8-клетки.

Большинство эффектов СТГ и ИФР-1 в отношении тимоцитов возможно воспроизвести при действии пролактина. Не исключено, что усиление пролактин-зависимой пролиферации тимоцитов опосредовано инерлейкином-1, выработка которого также контролируется (стимулируется) тимусом. Кроме того, СТГ и пролактин оказывают подавляющее действие на апоптоз тимоцитов, вызванный ГК [44].

Таким образом, результаты ряда исследований свидетельствуют о положительном влиянии оси соматотропов (прежде всего ГР и его проксимального медиатора ИФР-1) на тимопоэз.

Процессы, связанные с возрастной инволюцией тимуса

Рассмотрим аспект сопряженности с возрастом динамики соматотрофов и инволюции вилочковой железы. Возрастная или физиологическая инволюция тимуса происходит постепенно, начиная с первого года жизни и представляет

собой уменьшение массы и объема паренхимы органа с замещением ее жировой тканью [3, 11]. Возможно, этот процесс обусловлен, прежде всего, внутритимическими факторами и генетически запрограммирован. Есть мнение, что инволюция тимуса может увеличить продолжительность жизни благодаря низкой концентрации периферических аутореактивных Т-клеток или, напротив, сокращать продолжительность жизни за счет снижения периферического иммунного ответа. Например, показано на эксперименте, где карликовые мыши (линии Эймса и Снелла-Бэгга) с дефицитом ГР живут дольше, чем контрольные [19, 29]. А сверхэкспрессия гетерологичного или гомологичного ГР у трансгенных мышей сокращает продолжительность жизни. Так, эквадорцы невысокого роста и несущие мутации гена рецептора ГР демонстрируют низкую частоту злокачественных новообразований и отсутствие случаев диабета [36]. Эти данные указывают на то, что ГР необходим для развития иммунной системы, контролируемой (регулируемой) тимусом, но его дефицит способствует увеличению продолжительности жизни и снижает частоту возникновения таких иммунозависимых заболеваний как рак и сахарный диабет [26, 38]. В растущем организме, когда тимус еще не начал подвергаться возрастной инволюции, ГР способен вызывать гипертрофию и гиперплазию его лимфоидной ткани и стимулировать иммуногенез (тимотропный эффект).

Влияние ГР на иммунные процессы является в значительной степени опосредованным действием на тимус, в котором формируются Т-лимфоциты, а также гормоны тимозины и тимопоэтины, регулирующие дифференцировку Т-клеток и образование антител [12, 41]. В процессе старения в сыворотке крови падает концентрация гормона роста, ИФР-1 и тимулина, но в опыте *in vivo* инъекции СТГ стареющим животным значительно повышали уровень тимулина [45]. Напрашивается вывод о том, что ГР может являться потенциальным вспомогательным терапевтическим агентом для обращения возраст-зависимой инволюции тимуса. Предполагается, что физиологическое снижение высокого уровня ГР происходящее с возрастом, является причиной параллельного и необходимого снижения функций тимуса, целью или последствием которого служит увеличение продолжительности жизни. Данный процесс, вероятно, представляет собой своего рода компромисс между вилочковой железой/иммунной системой и ГР [29].

В данном обзоре следует остановиться и на гипотезе стресса, впервые предложенной Dorsh-

kind E., Horseman N.D. [25], суть которой состояла в том, что мыши с сочетанным дефицитом ГР/ИФР-1, PRL и ТТГ имеют нормальный гуморальный и клеточный ответ, что противоречит предыдущим, опубликованным в литературе утверждениям [28, 36, 37, 43, 44, 46, 48]. Подтверждением данной гипотезы являются результаты исследования Bodart G. и соавт. (2018), при котором изучению подвергалась лишь та модель мышей, которая раньше никогда не использовалась для иммунной характеристики; с уникальным специфическим дефицитом только соматотропной оси (РЕЦЕПТОР ГР/ГР/ИФР-1) и содержащаяся именно в нестрессовых условиях, и не имевшая дефектов тимопоэза. P rez A.R. и соавт. (2019) сообщают, что большинство ранее представленных данных получены из исследований, проведенных на модели карликовых мышей (Снелла и Эймса/Snell-Bagg и Ames) с сочетанной множественной недостаточностью гипофиза (т. е. с отсутствием ГР, PRL и тиреотропного гормона), что затрудняет выявление точной роли каждого из них и определение реального влияния ГР на гомеостаз Т-клеток. Данные мышинные модели характеризовались уменьшением количества клеток тимуса и резким снижением доли тимоцитов DP, у них наблюдалась лимфопения, снижение относительной массы тимуса, ранняя инволюция тимуса и снижение первичного иммунного ответа по сравнению с некарликовыми. Dorshkind E., Horseman N.D. подчеркивают, что это большинство исследований было проведено около 40 лет назад, когда недостаточно удовлетворительные условия содержания также могли быть источником физиологического и психологического стресса [43, 44]. Напротив, содержание экспериментальных животных в строго санитарных (антистрессовых) условиях (как в эксперименте Bodart G. и соавт.) демонстрировало у них наличие нормального тимуса и состоятельной иммунной системы. Это исследование на мышах Snell-Bagg (Bodart G и соавт.) с избирательным дефицитом только соматотропной оси показало, что их продолжительность жизни увеличилась на 40%, и при этом были улучшены некоторые параметры стареющей иммунной системы, например, по сравнению с молодыми животными прослеживались аналогичные доля клеток памяти и функции Т-клеток [19]. В данной работе представлен еще один противоречивый относительно более ранних результатов вывод, а, именно – неэффективность добавок ГР для восстановления иммунных параметров, несмотря на явные другие метаболические эффекты лечения [19, 29]. Авторы подчеркивают, что действительно, еже-

дневная инъекция ГР мышам с дефектом соматолиберина приводила к увеличению веса тела, селезенки и тимуса и стимуляции выработки ИФР-1 в печени, но окончательно формулируют вывод о том, что дефицит соматотропа не является отягчающим фактором для старения иммунной системы, т.к. атрофия тимуса, проявляющаяся в снижении веса и клеточности органа, а также количества ТREC, наблюдалась у стареющих как у мутантных, так и нормальных мышей. Они пояснили, что их экспериментальная модель мыши являлась генетическим дефектом соматолиберина, которая с рождения влияла на всю ось соматотропа [19]. Поэтому к сравнительным результатам по изучению моделей с приобретенным дефицитом ГР (как это постулируется при старении), следует относиться с осторожностью [19, 29]. Возможно именно гипотеза «стресса» может объяснить расхождение и противоречия между результатами Vodart G. и соавт. (2018) и других исследований [19, 37, 44, 48].

Таким образом, не вызывает сомнения в колоссальной значимости иммунной системы человека в происхождении не только инфекционных, но и онкологических, аутоиммунных заболеваний, склонности к аллергии, в проблеме тканевой несовместимости и т. д. Именно они определяют продолжительность жизни человека и поэтому понятен научный интерес к теме изучения функций иммунной системы и ее центрального органа – вилочковой железы. Сложность изучения заключается в огромном количестве интегральных связей вилочковой железы с другими компонентами иммунной системы, нейроэндокринной, гемопоэтической системами, соединительной тканью, органами (и клетками) обеспечивающих барьерную функцию и т. д. Вычленив из этого континуума функции, не-

посредственно касающиеся тимуса, это высокотехнологичная задача чрезвычайной сложности. Интерес педиатров к этой области знаний связан с определенным пониманием онтогенеза человека от рождения до старости, где тимус основную роль осуществляет в антенатальном периоде и раннем детстве. Несмотря на существенное количество литературных источников, отражающих экспериментальные данные о реципрокном взаимодействии иммунной, эндокринной и нервной системы, определить конкретное ролевое участие факторов молекулярного уровня (нейропептидов, гормона роста и др.) на иммунную физиологию до сих пор огромная проблема. Основным ряд суждений по данному научному направлению имеет не только теоретический характер, но и важен с практической точки зрения. Поскольку возрастная инволюция тимуса идет с потерей числа генерируемых и экспортируемых клеток, терапия на основе гормонов может стать альтернативной стратегией для восстановления органа, увеличения пролиферации тимоцитов и экспорта зрелых Т-клеток в периферические лимфоидные органы. Некоторые гормоны (такие как гормон роста и прогонадолиберин-1) уже используются как лекарственные средства для лечения иммунодефицитных расстройств, ассоциированных с атрофией тимуса (например, ВИЧ-инфекция). Имеются данные, что в настоящее время проходит клинические испытания терапия эндогенной регенерации тимуса, включающая KGF (фактор роста кератиноцитов), использование цитокинов IL-7 и IL-22 и гормональной модуляции через введение гормона роста и ингибирование половыми стероидами. В доклинических условиях появляются новые стратегии, включая использование Т-клеток-предшественников и биоинженерию тимуса [20].

Список литературы / References

1. Агафонкина Т.В., Меркулова Л.М., Стручко Г.Ю. Морфофункциональное состояние тимуса и показатели крови крыс при приеме цеолитсодержащего трепела // Вестник Чувашского университета, 2007. № 2. С. 46-52. [Agafonkina, T.V., Merkulova L.M., Struchko G.Yu. Morphofunctional state of the thymus and blood parameters of rats when taking zeolite-containing tripolite. *Vestnik Chuvashskogo universiteta = Bulletin of the Chuvash University*, 2007, no. 2, pp. 46-52. (In Russ.)]
2. Акмаев И.Г. Современные представления о взаимодействии нервной, эндокринной и иммунной систем // Морфология. СПб.: Эскулап, 1993. № 9. С. 36. [Akmaev I.G. Modern ideas about the interaction of the nervous, endocrine and immune systems. *Morfologiya = Morphology. St. Petersburg: Aesculapius*, 1993. no. 9, p. 36. (In Russ.)]
3. Анисимова В.П. Роль морфофункциональных перестроек тимуса в обменно-эндокринных нарушениях организма // Российский вестник перинатологии и педиатрии. 1994. Т. 39, № 1. С. 35. [Anisimova V.P. The role of morphofunctional rearrangements of the thymus in metabolic and endocrine disorders of the body. *Rossiyskiy vestnik perinatologii i pediatrii = Russian Bulletin of Perinatology and Pediatrics*, 1994, Vol. 39, no. 1, p. 35. (In Russ.)]

4. Бахметьев Б.А., Лихачева Н.С. Влияние соматотропного гормона на функцию фагоцитирующих клеток крови человека // Проблемы эндокринологии, 2000. Т. 46, № 3. С. 25-28. [Bakhmetyev B.A., Likhacheva N.S. The effect of somatotrophic hormone on the function of human blood phagocytic cells. *Problemy endokrinologii = Problems of Endocrinology*, 2000, Vol. 46, no. 3, pp. 25-28. (In Russ.)]
5. Григорьева В.Н. Структурно-функциональные взаимосвязи иммунной и эндокринной систем у детей раннего возраста // Математическая морфология, 2007. Т. 6, № 1. С. 40-50. [Grigoryeva V.N. Structural and functional interconnections of immunological systems in infants. *Matematicheskaya morfologiya = Mathematical Morphology*, 2007, Vol. 6, no. 1, pp. 40-50. (In Russ.)]
6. Зимина И.В., Белова О.В., Торховская Т.И., Арион В.Я., Новоселецкая А.В., Киселева Н.М., Крючкова А.В., Иноземцев А.Н., Сергиенко В.И. Взаимосвязь тимуса и тимических пептидов с нервной и эндокринной системами // Иммунопатология, аллергология, инфектология, 2015. № 1. С. 18-29. [Zimina I.V., Belova O.V., Torhovskaya T.I., Arion V.Ya., Novoseletskaya A.V., Kiseleva N.M., Kryuchkova A.V., Inozemtsev A.N., Sergienko V.I. Interaction between thymus and thymic peptides with nervous and endocrine systems. *Immunopatologiya, allergologiya, infektologiya = Immunopathology, Allergology, Infectology*, 2015, no. 1, pp. 18-29. (In Russ.)]
7. Кубарко А.И., Семенович А.А., Переверзев В.А. Нормальная физиология: учебник. В 2 ч. Ч. 1. Под ред. А.И. Кубарко. Минск: Высшая школа, 2013. С. 324. [Kubarko A.I., Semenovich A.A., Pereverzev V.A. Normal physiology]. Minsk: Higher School, 2013. p. 324.
8. Кузьменко Л.Г. Концептуальный взгляд на генез врожденной тимомегалии // Педиатрия. Журнал им. Г.Н. Сперанского, 2012. Т. 91, № 3. С. 38-43. [Kuzmenko L.G. Conceptual view on the genesis of congenital thymomegaly. *Pediatriya. Zhurnal im. G.N. Speranskogo = Pediatrics. G. Speransky Journal*, 2012, Vol. 91, no. 3, pp. 38-43. (In Russ.)]
9. Миняйлова Н.Н., Ровда Ю.И., Зинчук С.Ф., Климанова А.Е., Строева В.П., Черных Н.С. Аспекты вилочковой железы (тимуса) детского возраста (часть V). Гормональные и морфологические взаимосвязи тимуса с нейроэндокринной системой и в частности с соматотропным гормоном и инсулиноподобным фактором роста // Мать и Дитя в Кузбассе, 2022. № 1 (88). С. 11-20. [Minyailova N.N., Rovda Yu.I., Zinchuk S.F., Klimanova A.E., Stroeve V.P., Chernykh N.S. Aspects of the thymus gland (thymus) of childhood (part V). Hormonal and morphological relationships of the thymus with the neuroendocrine system and, in particular, with somatotrophic hormone and insulin-like growth factor. *Mat i Ditya v Kuzbasse = Mother and Baby in Kuzbass*, 2022, no. 1 (88), pp. 11-20. (In Russ.)]
10. Николс Дж.Г., Мартин А.Р., Валлас Б.Дж., Фукс П.А. От нейрона к мозгу. Пер. с англ. 4-е изд. М.: УРСС, 2003. С. 525-531. [Nichols J.G., Martin A.R., Wallas B.J., Fuchs P.A. From Neuron to Brain]. Moscow: URSS, 2003, pp. 525-531.
11. Полякова В.О., Чернышова Е.В., Чебракова А.Ю., Зезюлин П.Н., Федорова Е.С. Возрастные изменения экспрессии вазоактивных гормонов и факторов апоптоза в тимусе человека // Медицинская иммунология, 2006. Т. 8, № 2-3. С. 380-381. [Polyakova V.O., Chernyshova E.V., Chebrakova A.Yu., Zezyulin P.N., Fedorova E.S. Age-related changes in the expression of vasoactive hormones and apoptosis factors in the human thymus. *Meditsinskaya immunologia = Medical Immunology (Russia)*, 2006, Vol. 8, no. 2-3, pp. 380-381. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2006-2-3-361-381.
12. Розен В.В. Основы эндокринологии: учебник. 3-е изд., перераб. и доп. М.: Издательство Московского государственного университета, 1994. 384 с. [Rosen V.V. Fundamentals of endocrinology]. Moscow: Moscow State University Press, 1994. 384 p.
13. Стручко Г.Ю., Драндрова Е.Г., Меркулова Л.М. Морфологическая картина и иммуногистохимический фенотип тимуса при канцерогенезе в условиях врожденного иммунодефицита // Морфология, 2018, Т. 154, № 4. С. 34-39. [Struchko G.Yu., Drandrova E.G., Merkulova L.M. Morphological picture and immunohistochemical phenotype of the thymus during carcinogenesis in conditions of congenital immunodeficiency. *Morfologiya = Morphology*, 2018, Vol. 154, no. 4, pp. 34-39. (In Russ.)]
14. Тишевская Н.В., Геворкян Н.М., Козлова Н.И. Роль Т-лимфоцитов в гормональной регуляции морфогенетических процессов // Успехи современной биологии, 2015. Т. 135, № 2. С. 189-202. [Tishevskaya N.V., Gevorkyan N.M., Kozlova N.I. The role of t-lymphocytes in hormonal regulation of morphogenetic processes. *Uspekhi sovremennoy biologii = Biology Bulletin Reviews*, 2015, Vol. 135, no. 2, pp. 189-202. (In Russ.)]
15. Толстова Е.М., Зайцева О.В. Физиология и патология тимуса в детском возрасте // Педиатрия. Журнал им. Г.Н. Сперанского, 2018. Т. 97, № 6. С. 166-172. [Tolstova E.M., Zaitseva O.V. Thymus physiology and pathology in childhood. *Pediatriya. Zhurnal im. G.N. Speranskogo = Pediatrics. G. Speransky Journal*, 2018, Vol. 97, no. 6, pp. 166-172. (In Russ.)]
16. Чеботарев В.Ф. Эндокринная регуляция иммуногенеза. Киев: Здоровье, 1979. 160 с. [Chebotarev V.F. Endocrine regulation of immunogenesis]. Kyiv: Health, 1979. 160 p.
17. Bearn J.G. Effect of foetal hypophysectomy on the foetal liver fat in the rabbit. *Nature*, 1960, Vol. 185, no. 4716, pp. 849-850.

18. Bearn J.G. The thymus and the pituitary-adrenal axis in anencephaly. A correlation between experimental foetal endocrinology and human pathological observations. *Br. J. Exp. Pathol.*, 1968, Vol. 49, no. 2, pp. 136-144.
19. Bodart G., Farhat K., Renard-Charlet C., Becker G., Plenevaux A., Salvatori R., Geenen V., Martens H. The severe deficiency of the somatotrope GH-releasing hormone/growth hormone/insulin-like growth factor 1 axis of ghrh-/- mice is associated with an important splenic atrophy and relative B lymphopenia. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*, 2018, Vol. 9, 296. doi: 10.3389/fendo.2018.00296.
20. Chaudhry M.S., Velardi E., Dudakov J.A., van den Brink M.R. Thymus: the next (re) generation. *Immunol. Rev.*, 2016, Vol. 271, no. 1, pp. 56-71.
21. D'Attilio L., Santucci N., Bongiovanni B., Bay M.L., Bottasso O. Tuberculosis, the disrupted immune-endocrine response and the potential thymic repercussion as a contributing factor to disease pathophysiology. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*, Vol. 9, 214. doi: 10.3389/fendo.2018.00214.
22. de Mello-Coelho V., Cutler R.G., Bunbury A., Tammara A., Mattson M.P., Taub D.D. Age-associated alterations in the levels of cytotoxic lipid molecular species and oxidative stress in the murine thymus are reduced by growth hormone treatment. *Mech. Ageing Dev.*, 2017, Vol. 167, pp. 46-55.
23. de Mello-Coelho V., Gagnerault M.C., Souberbielle J.C., Strasburger C.J., Savino W., Dardenne M., Postel-Vinay M.C. Growth hormone and its receptor are expressed in human thymic cells. *Endocrinology*, 1998, Vol. 139, no. 9, pp. 3837-3842.
24. de Mello-Coelho V., Savino W., Postel-Vinay M.C., Dardenne M. Role of prolactin and growth hormone on thymus physiology. *Dev. Immunol.*, 1998, Vol. 6, no. 3-4, pp. 317-323.
25. Dorshkind K., Horseman N.D. The roles of prolactin, growth hormone, insulin-like growth factor-I, and thyroid hormones in lymphocyte development and function: insights from genetic models of hormone and hormone receptor deficiency. *Endocr. Rev.*, 2000, Vol. 21, no. 3, pp. 292-312.
26. Elkarow M.H., Hamdy A.A. Suggested role of human growth hormone in control of the COVID-19 pandemic. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*, 2020, Vol. 11, 569633. doi: 10.3389/fendo.2020.569633.
27. Fahy G.M., Brooke R.T., Watson J.P., Good Z., Vasanaawala S.S., Maecker H., Leipold M.D., Lin D.T.S., Kobor M.S., Horvath S. Reversal of epigenetic aging and immunosenescent trends in humans. *Aging Cell*, 2019, Vol. 18, no. 6, e13028. doi: 10.1111/ace1.13028.
28. Geenen V. Presentation of neuroendocrine self in the thymus: a necessity for integrated evolution of the immune and neuroendocrine systems. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 2012, Vol. 1261, no. 1, pp. 42-48.
29. Hirokawa K., Utsuyama M., Kikuchi Y. Trade off situation between thymus and growth hormone: age-related decline of growth hormone is a cause of thymic involution but favorable for elongation of lifespan. *Biogerontology*, 2016, Vol. 17, no. 1, pp. 55-59.
30. Hollander J.A., Wang B., Nichogiannopoulou A., Platenburg P.P., Ewijk van W., Burakoff S.J., Gutierrez-Ramos J.C., Terhorst C. Developmental control point in induction of thymic cortex regulated by a subpopulation of prothymocytes. *Nature*, 1995, Vol. 373, no. 6512, pp. 350-353.
31. Kermani H., Goffinet L., Mottet M., Bodart G., Morrhaye G., Dardenne O., Renard C., Overbergh L., Baron F., Beguin Y., Geenen V., Martens H.J. Expression of the growth hormone/insulin-like growth factor axis during Balb/c thymus ontogeny and effects of growth hormone upon ex vivo T cell differentiation. *Neuroimmunomodulation*, 2012, Vol. 19, no. 3, pp. 137-147.
32. Leiden J.M., Thompson C.B. Transcriptional regulation of T-cell genes during T-cell development. *Curr. Opin. Immunol.*, 1994, Vol. 6, no. 2, pp. 231-237.
33. Lemons D., McGinnis W. Genomic evolution of Hox gene clusters. *Science*, 2006, Vol. 313, no. 5795, pp. 1918-1922.
34. Lins M.P., Viana I.M., Smaniotto S., Reis M.D. dos S. Interactions between thymic endothelial cells and thymocytes are influenced by growth hormone. *Growth Factors (Chur, Switzerland)*, 2021, Vol. 38, no. 3-4, pp. 1-12.
35. Lins M.P., Vieira L.F. de A., Rosa A.A., Smaniotto S. Growth hormone in the presence of laminin modulates interaction of human thymic epithelial cells and thymocytes *in vitro*. *Biol. Res.*, 2016, Vol. 49, no. 1, 37. doi: 10.1186/s40659-016-0097-0.
36. Mendes-da-Cruz D.A., Lemos J.P., Passos G.A., Savino W. Abnormal T-Cell development in the thymus of non-obese diabetic mice: possible relationship with the pathogenesis of type 1 autoimmune diabetes. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*, 2018, Vol. 9, 381. doi: 10.3389/fendo.2018.00381.
37. Morrhaye G., Kermani H., Legros J., Baron F., Beguin Y., Moutschen M., Cheynier R., Martens H., Geenen V. Impact of growth hormone (GH) deficiency and GH replacement upon thymus function in adult patients. *PLoS One*, 2009, Vol. 4, no. 5, e5668. doi: 10.1371/journal.pone.0005668.
38. Pérez A.R., Morrot A., Carvalho V.F., de Meis J., Savino W. Role of hormonal circuitry upon T cell development in chagas disease: possible implications on T cell dysfunctions. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*, 2018, Vol. 9, 334. doi: 10.3389/fendo.2018.00334.
39. Redelman D., Welniak L.A., Taub D., Murphy W.J. Neuroendocrine hormones such as growth hormone and prolactin are integral members of the immunological cytokine network. *Cell. Immunol.*, 2008, Vol. 252, no. 1-2, pp. 111-121.

40. Sabharwal P, Varma S. Growth hormone synthesized and secreted by human thymocytes acts via insulin-like growth factor I as an autocrine and paracrine growth factor. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 1996, Vol. 81, no. 7, pp. 2663-2669.
41. Savino W. Neuroendocrine control of T cell development in mammals: role of growth hormone in modulating thymocyte migration. *Exp. Physiol.*, 2007, Vol. 92, no. 5, pp. 813-817.
42. Savino W, Dardenne M. Pleiotropic modulation of thymic functions by growth hormone: from physiology to therapy. *Curr. Opin. Pharmacol.*, 2010, Vol. 10, no. 4, pp. 434-442.
43. Savino W, de Mello-Coelho V, Dardenne M. Control of the thymic microenvironment by growth hormone/insulin-like growth factor-I-mediated circuits. *Neuroimmunomodulation*, 1995, Vol. 2, no. 6, pp. 313-318.
44. Savino W, Mendes-da-Cruz D.A., Lepletier A., Dardenne M. Hormonal control of T-cell development in health and disease. *Nat. Rev. Endocrinol.*, 2016, Vol. 12, no. 2, pp. 77-89.
45. Savino W, Postel-Vinay M.C., Smaniotto S., Dardenne M. The thymus gland: a target organ for growth hormone. *Scand. J. Immunol.*, 2002, Vol. 55, no. 5, pp. 442-452.
46. Savino W, Smaniotto S., Binart N., Postel-Vinay M.C., Dardenne M. *In vivo* effects of growth hormone on thymic cells. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 2003, Vol. 992, no. 1, pp. 179-185.
47. Smith P.E. Effects of hypophysectomy upon involution of the thymus in the rat. *Anat. Rec.*, 1930, Vol. 47, no. 1, pp. 119-129.
48. Weigent D.A. High molecular weight isoform of growth hormone in cells of the immune system. *Cell. Immunol.*, 2011, Vol. 271, no. 1, pp. 44-52.
49. Yamada M., Hato F, Kinoshita Y., Tominaga K., Tsuji Y. The indirect participation of growth hormone in the thymocyte proliferation system. *Cell. Mol. Biol. (Noisy-le-grand)*, 1994, Vol. 40, no. 2, pp. 111-121.

Авторы:

Миняйлова Н.Н. — д.м.н., профессор кафедры педиатрии и неонатологии ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ», г. Кемерово, Россия

Ровда Ю.И. — д.м.н., профессор кафедры педиатрии и неонатологии ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ», г. Кемерово, Россия

Ведерникова А.В. — ассистент кафедры педиатрии и неонатологии ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ», г. Кемерово, Россия

Шабалдин А.В. — д.м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории пороков сердца ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», г. Кемерово, Россия

Authors:

Minyailova N.N., PhD, MD (Medicine), Professor, Department of Pediatrics and Neonatology, Kemerovo State Medical University, Kemerovo, Russian Federation

Rovda Yu.I., PhD, MD (Medicine), Professor, Department of Pediatrics and Neonatology, Kemerovo State Medical University, Kemerovo, Russian Federation

Vedernikova A.V., Assistant Professor, Department of Pediatrics and Neonatology, Kemerovo State Medical University, Kemerovo, Russian Federation

Shabaldin A.V., PhD, MD (Medicine), Leading Research Associate, Laboratory of Heart Diseases, Research Institute for Complex Problems of Cardiovascular Diseases, Kemerovo, Russian Federation

Зинчук С.Ф. — к.м.н., заведующий кафедрой морфологии и судебной медицины ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ», г. Кемерово, Россия

Zinchuk S.F., PhD (Medicine), Head, Department of Morphology and Forensic Medicine, Kemerovo State Medical University, Kemerovo, Russian Federation

Шмакова О.В. — к.м.н., заведующая кафедрой педиатрии и неонатологии ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ», г. Кемерово, Россия

Shmakova O.V., PhD (Medicine), Head, Department of Pediatrics and Neonatology, Kemerovo State Medical University, Kemerovo, Russian Federation

Голомидов А.В. — к.м.н., заместитель главного врача по педиатрии ГАУЗ «Кузбасская клиническая больница имени С.В. Беляева» г. Кемерово, Россия

Golomidov A.V., PhD (Medicine), Deputy Chief Physician for Pediatrics, S. Belyaev Kuzbass Clinical Hospital, Kemerovo, Russian Federation

Лобыкина А.А. — ординатор по специальности «педиатрия» ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ», г. Кемерово, Россия

Lobykina A.A., Resident (Pediatrics), Kemerovo State Medical University, Kemerovo, Russian Federation

Сохарев В.В. — студент педиатрического факультета ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ», г. Кемерово, Россия

Sokharev V.V., Student, Pediatric Faculty, Kemerovo State Medical University, Kemerovo, Russian Federation

Поступила 10.04.2021
Принята к печати 22.05.2022

Received 10.04.2021
Accepted 22.05.2022

ВЛИЯНИЕ ЭКСТРАКТОВ МИКРОВОДОРОСЛЕЙ НА УРОВНИ ЦИТОКИНОВ У МЫШЕЙ-САМОК C57Bl6

Лыков А.П.¹, Уваров П.И.², Геворгиз Р.Г.³, Железнова С.Н.³

¹ Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной лимфологии – филиал ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр “Институт цитологии и генетики” Сибирского отделения Российской академии наук», г. Новосибирск, Россия

² ГБУ Новосибирской области «Управление ветеринарии города Новосибирска», г. Новосибирск, Россия

³ ФИЦ «Институт биологии южных морей имени А.О. Ковалевского Российской академии наук», г. Севастополь, Россия

Резюме. Микроводоросли пресноводных водоемов и морей представляют собой ценный источник широкого спектра биологически активных веществ, способных влиять на клетки иммунной системы и их функциональный статус. Цитокины вовлечены во все циклы жизни клеток организма (пролиферация, созревание, дифференцировка, апоптоз/некроз). Проведено исследование влияния приема в пищу стандартного корма для лабораторных животных, обогащенного масляным экстрактом микроводорослей различных систематических групп на уровни цитокинов в сыворотке крови, кондиционных средах иммуноцитов и ткани почек и печени. Стандартный корм пропитывали масляными экстрактами микроводорослей (*C. vulgaris*, *Coelastrella* sp., *A. platensis*, *C. closterium* и *P. purpureum*), в контроле корм пропитывали чистым растительным маслом, животные принимали корм в течение 12 дней. Забирали кровь, селезенку и тимус для выделения иммуноцитов, почки и печень для получения экстракта в диметилсульфоксиде. Кондиционные среды спленоцитов и тимоцитов получали добавлением конканавалина А (0 и 10 мкг/мл). В сыворотке, кондиционных средах, экстрактах исследовали уровень NO, IL-1 β , IL-10, TNF α и NO. В сыворотке выявлено влияние микроводорослей на уровень IL-1 β и TNF α . Активация иммуноцитов в опытных группах вела к изменению уровня продукции IL-1 β , TNF α и IL-10. Отмечено изменение уровня цитокинов, NO в экстрактах печени и почек в опытных группах.

Таким образом, экстракты микроводорослей различных систематических групп оказывают влияние на уровни цитокинов в сыворотке крови, кондиционных средах спленоцитов и тимоцитов, тканях почек и печени.

Ключевые слова: микроводоросли, цитокины, оксид азота, спленоциты, тимоциты

Адрес для переписки:

Лыков Александр Петрович
Научно-исследовательский институт клинической и
экспериментальной лимфологии
630060, Россия, г. Новосибирск, ул. Тимакова, 2.
Тел.: 8 (383) 335-93-32.
E-mail: aplykov2@mail.ru

Address for correspondence:

Alexander P. Lykov
Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology
2 Timakov St
Novosibirsk
630060 Russian Federation
Phone: +7 (383) 335-93-32.
E-mail: aplykov2@mail.ru

Образец цитирования:

А.П. Лыков, П.И. Уваров, Р.Г. Геворгиз, С.Н. Железнова
«Влияние экстрактов микроводорослей на уровни
цитокинов у мышей-самок C57Bl6» // Медицинская
иммунология, 2023. Т. 25, № 1. С. 81-90.
doi: 10.15789/1563-0625-EOE-2379

© Лыков А.П. и соавт., 2023
Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

A.P. Lykov, I.P. Uvarov, R.G. Gevorgiz, S.N. Zheleznova
“Effect of extracts from microalgae on cytokine levels in female
C57Bl6 mice”, *Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya
Immunologiya*, 2023, Vol. 25, no. 1, pp. 81-90.
doi: 10.15789/1563-0625-EOE-2379

© Lykov A.P. et al., 2023
The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License
DOI: 10.15789/1563-0625-EOE-2379

EFFECT OF EXTRACTS FROM MICROALGAE ON CYTOKINE LEVELS IN FEMALE C57BI6 MICE

Lykov A.P.^a, Uvarov I.P.^b, Gevorgiz R.G.^c, Zheleznova S.N.^c

^a Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology, Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russian Federation

^b Department of Veterinary Medicine of the city of Novosibirsk, Novosibirsk, Russian Federation

^c A. Kovalevsky Institute of Biology of the Southern Seas, Russian Academy of Sciences, Sevastopol, Russian Federation

Abstract. Microalgae from the freshwater basins and seas are a valuable source of broad-spectrum biologically active substances that can affect the cells of immune system and their functional state. Cytokines are involved in all vital processes proceeding in the living cells (proliferation, maturation, differentiation, apoptosis/necrosis). A study was performed in order to assess the effects of standard food formula for experimental animals supplemented with oil extract of microalgae from various systematic groups upon the levels of cytokines in blood serum, culture media conditioned by immunocytes, as well as kidney and liver tissues. The standard food was impregnated in oil extracts of microalgae (*C. vulgaris*, *Coelastrella* sp., *A. platensis*, *C. closterium*, and *P. purpureum*). In control series, the food was impregnated with pure vegetable oil. The animals were fed these foods for 12 days. Blood, spleen and thymus were taken to isolate immunocytes, kidneys and liver, and dimethyl sulfoxide extracts of the cells were produced. The conditioned media of splenocytes and thymocytes were obtained by adding concanavalin A (0 and 10 µg/ml) to the cultured cells. The levels of NO, IL-1β, IL-10, TNFα, and NO were determined in serum, conditioned media, and tissue extracts. In serum, the influence of microalgae on the levels of IL-1β and TNFα was revealed. Activation of immunocytes in experimental groups was followed by changes in IL-1β, TNFα and IL-10 production. Changes of cytokine and NO levels were revealed in liver and kidney extracts in experimental groups. Thus, microalgae extracts of various systematic groups affect the levels of cytokines in blood serum, cultural media conditioned by splenocytes and thymocytes, kidney and liver tissues.

Keywords: microalgae, cytokines, nitric oxide, splenocytes, thymocytes

Введение

Цитокины – пептиды, вовлеченные в межклеточные и межсистемные взаимодействия, в фазы роста и дифференцировки клеток, влияют на функциональный статус и апоптоз клеток и координируют работу иммунной системы с другими системами организма, в патогенез заболеваний. Синтез цитокинов запускается через активацию сигнальных путей врожденного иммунитета [8]. Микроводоросли и цианобактерии – источник широкого спектра биологически активных молекул, которые могут быть использованы для разработки перспективных биологически активных добавок и лекарственных средств с противовоспалительным действием [1, 18]. Показано, что экстракт *Chlorella vulgaris* (*C. vulgaris*) и *Spirulina platensis* (*A. platensis*) улучшал гистологическое строение ткани яичников, уровней половых гормонов и ферментативной активности антиоксидантов в яичниках у мышей, получавших в пищу глутамат натрия [1]. Употребление в пищу *A. platensis* цыплятами способствовало приросту массы тела, титра антител против вакцины ND,

длины ворсинок, количества бокаловидных клеток в кишечнике [7]. Ранее нами было показано, что фукоксантин, выделенный из *Cylindrotheca closterium* (Ehrenb.) Reimann et Lewin (*C. closterium*) и иммобилизованный на кремнийорганическом носителе, увеличивал выживаемость и пролиферацию спленоцитов и тимоцитов *in vitro*, а *in vivo* не вызывал повреждений энтероцитов [10]. Микроводоросли – источник экзополисахаридов, способных стимулировать пролиферацию иммуноцитов [14]. Наличие антиоксидантов в микроводорослях способствует снижению продукции в коже провоспалительных цитокинов, что может быть использовано при разработке лекарственных препаратов для лечения патологии кожи [4]. На модели возрастного стеатоза печени у крыс, индуцированным D-галактозой, введение биомассы микроводоросли *Dunaliella salina*, полярной фракции, каротиноидной фракции или изолированного генейкозилата зеаксантина *per os* способствовало улучшению функций печени, опосредованно через регуляцию окислительно-восстановительного статуса, маркеров воспаления и апоптоза [6]. Показано, что фукокс-

сантин, выделенный из *Phaeodactylum tricornutum*, подавляет активацию сигнальных путей NF- κ B и NLRP3 в иммунocyтaх костного мозга и астроцитах, вовлеченных в синтез и секрецию провоспалительных цитокинов IL-1 β , IL-6 и TNF α , инициированную сочетанием липополисахарида и АТФ, активируя подавление экспрессии каспазы-1 компонента инфламасомы NLRP3 [8].

Целью настоящего исследования явилось сравнительное изучение влияния масляных экстрактов микроводорослей различных систематических групп на цитокины в сыворотке крови, в кондиционных средах спленоцитов и тимоцитов, в экстракте тканей почек и печени.

Материалы и методы

Исследование проведено в соответствии с Хельсинкской декларацией ВМА 2000 г. Материалом для исследования служили сыворотка крови, кондиционные среды иммунocyтaх (спленоциты и тимоциты), экстракт тканей почек и печени мышей-самок C57Bl6. В исследовании включены микроводоросли зеленые (*C. vulgaris* Beijerinck и *Coelastrella* sp.), цианобактерии (*Arthrospira (Spirulina) platensis* (Nordstedt) Gomont – *A. platensis*), диатомовые (*Cylindrotheca closterium* (Ehrenb.) Reimann et Lewin – *C. closterium*) и красные (*Porphyridium purpureum* (Bory) Drewet Ross – *P. purpureum*) из коллекции культур ФИЦ ИнБЮМ (г. Севастополь). Масляный экстракт из микроводорослей (5 г на 100 мл подсолнечного масла) получали пассивной диффузией биологически активных веществ в термостате (ТС-80, Россия) в течение 72 часов при 37 °С, далее ими пропитывали стандартную гранулированную пищу для грызунов (300 г). Опытные группы были сформированы в соответствии с исследуемыми экстрактами микроводорослей: *C. vulgaris*, *Coelastrella* sp., *A. platensis*, *C. closterium*, *P. purpureum* и контроль (пропитка пища чистым подсолнечным маслом). Объем выборки в опытных группах составил 5 особей и 6 особей в контрольной группе. Животные получали пищу, обработанную масляными экстрактами микроводорослей или же только подсолнечным маслом в течение 12 суток. Животных выводили из эксперимента дислокацией цервикального отдела позвоночника, забирали периферическую кровь для приготовления сыворотки крови, извлекали селезенку, тимус, почки и печень. Ткань селезенки и тимуса измельчали глазными ножницами на мелкие кусочки, далее разбивали с использованием шприцов и игл от большого до малого диаметра, фильтровали через ситечки с диаметром пор 80 мкм. Спленоциты и тимоциты (10⁶/мл) культивировали в течение 72 часов в питательной среде RPMI 1640 («Биолот», Россия) с добавле-

нием 10% эмбриональной телячьей сыворотки (HyClone, США), 2 мМ L-глутамин (Merck, США), 5 мМ Непес-буфера (Sigma, США) и 80 мкг/мл гентамицина сульфата (Дальхимфарм, Россия) в 24-луночных плоскодонных культуральных планшетах (TPP, Швейцария) при 37 °С и атмосфере 5% CO₂/95% воздух в присутствии 0 и 10 мкг/мл Конканавалина А (Кон А; Sigma, США). Далее клетки осаждали центрифугированием при 1500 оборотов в минуту в течение 5 минут, удаляли надосадочную жидкость, фасовали по аликвотам и хранили при -70 °С. Почки и печень заливали 1 мл диметилсульфоксидом и разрушали в гомогенизаторе, далее полученную массу осаждали при 3000 оборотов в минуту в течение 10 минут на центрифуге, собирали надосадочную среду в аликвоты и хранили при -70 °С. В сыворотке крови, кондиционных средах и экстрактах тканей почек и печени определяли уровни IL-1 β , IL-10, TNF α с использованием коммерческих наборов «Интерлейкин-1 бета-ИФА-БЕСТ», «Интерлейкин-10-ИФА-БЕСТ», «альфа ФНО-ИФА-БЕСТ» (АО «Вектор-Бест», Россия), согласно инструкции производителя. Уровни стойких метаболитов оксида азота в сыворотке крови, кондиционных средах и экстрактах тканей почек и печени исследовали с использованием реактива Грисса. Статистическую обработку данных проводили с использованием программы Statistica 10.0 for Windows. Нормальность распределения полученных данных оценивали с использованием w-критерия Шапиро–Уилка, в таблицах данные представлены в виде среднего и стандартного отклонения (M \pm SD), статистическую значимость различий между образцами оценивали однофакторным дисперсионным анализом (ANOVA) с поправкой по Бонферрони (Bonferroni post hoc test) и принимали при p < 0,05.

Результаты

Экстракт микроводорослей увеличивает уровни провоспалительных цитокинов в сыворотке крови

Показано, что полисахариды из микроводоросли *Porphyridium cruentum* индуцируют продукцию клеточной линией макрофагов мыши RAW 264,7) IL-6, TNF α [2]. С учетом роли цитокинов в жизненном цикле многих клеток организма человека и животных, в данном исследовании мы сосредоточили внимание на влиянии приёма пищи, обогащенной масляным экстрактом микроводорослей различных систематических групп, на уровни провоспалительных и противовоспалительных цитокинов в сыворотке крови животных (табл. 1).

Установлено, что экстракт *C. vulgaris* инициировал значимое повышение в сыворотке крови

уровней IL-1 β , а в группе мышей, принимавших в пищу экстракт *A. platensis* и *C. closterium*, отмечена тенденция к увеличению в сыворотке крови уровней IL-1 β по сравнению с контрольной группой животных.

Экстракт *C. closterium* и *P. purpureum* значительно снижали уровни TNF α в сыворотке крови, а экстракт *Coelastrella* sp. значительно увеличивали уровни TNF α в сыворотке крови по сравнению с контролем.

В то же время существенных различий по уровням IL-10 в сыворотке крови в опытных группах по сравнению с контролем не выявлено ($p > 0,05$).

Экстракт микроводорослей влияет на уровни базальной и митоген-стимулированной продукции цитокинов иммунными клетками

Экзополисахариды микроводорослей способны проявлять антипролиферативную и иммуномодулирующую активность. Экзополисахарид из микроводоросли *Thraustochytriidae* sp. способен стимулировать пролиферацию В-лимфоцитов, снижать уровни продукции IL-6 и IFN γ , но не влиял на продукцию TNF α Т-лимфоцитами [13]. Экзополисахарид р-KG03, продуцируемый штаммом красной микроводоросли *Gyrodiniumimpudicum* KG03, увеличивал продукцию макрофагами мышей IL-1 β , IL-6 и TNF α [21]. Исходя из этого, нами исследован эффект приема экстрактов микроводорослей в пищу на цитокин-продуцирующую активность иммунных клеток.

Нами не выявлено существенных изменений в уровнях базальной продукции спленоцитами IL-1 β по сравнению с контролем ($p > 0,05$). В то же время экстракт *C. vulgaris*, *A. platensis* и *P. purpureum* значительно снижали митоген-стимулированную продукцию IL-1 β , а экстракт *C. closterium* увеличивал митоген-стимулированную продукцию IL-1 β по сравнению с контролем (табл. 2). Также не выявлено существенного влияния на уровни базальной продукции спленоцитами TNF α и только экстракт *A. platensis* значительно снижал продукцию TNF α по сравнению с контролем. Необходимо отметить тот факт, что экстракты микроводорослей, за исключением экстракта *C. closterium*, стимулировали базальную продукцию спленоцитами IL-10, но при стимуляции митогеном спленоцитов все экстракты существенно снижают уровни продукции IL-10 по сравнению с контролем.

Иная картина выявлена в отношении влияния микроводорослей на продукцию цитокинов тимоцитами (табл. 3). Установлено, что экстракты микроводорослей стимулируют базальную и митоген-стимулированную продукцию IL-1 β тимоцитами, за исключением *C. closterium* по срав-

нению с контролем. Только экстракт *C. closterium* значительно стимулировал, а экстракт *A. platensis* значительно снижал уровни базальной продукции TNF α тимоцитами и не выявлено существенного влияния экстрактов микроводорослей на митоген-стимулированную продукцию тимоцитами TNF α по сравнению с контролем. Отмечено усиление базальной продукции тимоцитами в ответ на прием пищи с экстрактами микроводорослей IL-10, а экстракт *Coelastrella* sp., *C. closterium* и *P. purpureum* значительно снижают митоген-стимулированную продукцию IL-10 тимоцитами мышей по сравнению с контролем.

Экстракт микроводорослей влияет на уровни цитокинов в тканях почек и печени

Добавление в рацион нильской тапии (*Oreochromis niloticus*) с хронической интоксикацией хлорпирифосом *C. vulgaris* способствовало снижению экспрессии в печени белка теплового шока 70, глутатионпероксидазы и глутатионредуктазы, уровней мРНК IL-1 β , TNF α , TGF- β 1 и IL-8 в селезенке и головной почке [22]. Астаксантин из микроводоросли *Haematococcus pluvialis*, применявшийся у крыс при индуцированной D-галактозой патологии печени, способствовал нормализации уровней каталазы, глутатионтрансферазы, миелопероксидазы, экспрессии ядерного фактора Nrf2, уровней IL-6 и NF- κ B в печени [5]. Эти факты побудили нас к исследованию уровней цитокинов в экстракте тканей почек и печени.

Установлено, что прием в пищу экстракта *A. platensis* и *C. closterium* способствовал снижению уровней в ткани печени IL-1 β по сравнению с контролем (табл. 4). В группе *C. vulgaris* и *A. platensis* выявлено снижение уровней TNF α по сравнению с контролем. Экстракт *C. vulgaris*, *A. platensis* инициировали снижение, а экстракт *P. purpureum* – увеличение количества IL-10 в тканях печени по сравнению с контролем.

В группах *C. vulgaris*, *Coelastrella* sp. и *P. purpureum* вызывали снижение уровней IL-1 β в ткани почек по сравнению с контролем (табл. 5). Экстракты микроводорослей существенно не влияли на уровни TNF α и IL-10 в ткани почек по сравнению с контролем ($p > 0,05$).

Экстракт микроводорослей влияет на уровни оксида азота

Показано, что водный экстракт *A. platensis* в сегментах аорты крыс SHR со спонтанной гипертензией способствовал выработке оксида азота, увеличению сосудорасширяющей реакции в ответ на воздействие ацетилхолином, нитропруссидом натрия и пинацидилом, а также увеличению экспрессии белков р-Акт и HO-1 [19]. В связи с этим нами исследованы эффекты экстрактов ми-

ТАБЛИЦА 1. ВЛИЯНИЕ ЭКСТРАКТОВ МИКРОВОДОРОСЛЕЙ НА УРОВНИ ЦИТОКИНОВ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ (пг/мл, M±SD)

TABLE 1. EFFECT OF MICROALGAE EXTRACTS ON SERUM CYTOKINE LEVELS (pg/mL, M±SD)

Группы Groups	Уровни цитокинов в сыворотке крови Serum cytokine levels		
	IL-1β	TNFα	IL-10
<i>C. vulgaris</i>	86,86±1,45*	149,05±4,68*	21,48±0,19
<i>Coelastrella sp.</i>	80,57±2,98†	201,26±25,38*	21,59±0,38
<i>A. platensis</i>	120,70±48,62	173,62±30,48	20,95±0,31
<i>C. closterium</i>	95,82±20,76	153,46±6,73‡	20,41±0,21°
<i>P. purpureum</i>	82,99±7,22	146,77±2,84*‡	20,73±0,15
Контроль Control	80,26±2,75	160,16±2,34	20,90±0,55

Примечание. p < 0,05 * – с контролем, † – с *C. vulgaris*, ‡ – с *Coelastrella sp.*, ° – с *A. platensis*.

Note. p < 0.05 *, with control; †, with *C. vulgaris*; ‡, with *Coelastrella sp.*; °, with *A. platensis*.

ТАБЛИЦА 2. ВЛИЯНИЕ ЭКСТРАКТОВ МИКРОВОДОРОСЛЕЙ НА УРОВНИ СПОНТАННОЙ И МИТОГЕН-ИНДУЦИРОВАННОЙ ПРОДУКЦИИ ЦИТОКИНОВ СПЛЕНОЦИТАМИ (пг/мл, M±SD)

TABLE 2. EFFECT OF MICROALGAE EXTRACTS ON THE LEVELS OF SPONTANEOUS AND MITOGEN-INDUCED CYTOKINE PRODUCTION BY SPLENOCYTES (pg/mL, M±SD)

Группы Groups	Уровни цитокинов в кондиционных средах спленоцитов Cytokine levels in conditioned media of splenocytes		
	IL-1β	TNFα	IL-10
Базальная продукция Basal production			
<i>C. vulgaris</i>	75,21±0,90	147,48±2,51	21,47±1,07*
<i>Coelastrella sp.</i>	78,68±4,16†	146,94±4,67	20,93±0,19*
<i>A. platensis</i>	79,43±5,77	142,83±3,80	21,27±0,83*
<i>C. closterium</i>	82,46±4,04†	138,58±1,37†‡	20,83±0,46
<i>P. purpureum</i>	101,19±24,71†	137,48±2,23†‡	22,34±1,67*
Контроль Control	77,80±3,56	143,62±10,20	20,32±0,15
Конканавалин А-стимулированная Concanavalin A-stimulated			
<i>C. vulgaris</i>	74,07±2,43*	151,18±0,50	20,26±0,54*
<i>Coelastrella sp.</i>	79,21±0,63†	149,84±9,28	20,61±0,19*
<i>A. platensis</i>	71,74±1,23*‡	146,06±3,18*†	19,98±0,27*
<i>C. closterium</i>	102,15±1,39*†‡°	172,05±30,64	20,22±0,22*
<i>P. purpureum</i>	73,23±0,77*‡°	144,65±10,73	20,32±0,38*
Контроль Control	82,55±4,03	151,89±3,91	21,30±0,19

Примечание. p < 0,05 * – с контролем, † – с *C. vulgaris*, ‡ – с *Coelastrella sp.*, ° – с *A. platensis*, * – с *C. closterium*.

Note. p < 0.05 *, with control; †, with *C. vulgaris*; ‡, with *Coelastrella sp.*; °, with *A. platensis*; *, with *C. closterium*.

ТАБЛИЦА 3. ВЛИЯНИЕ ЭКСТРАКТОВ МИКРОВОДОРОСЛЕЙ НА УРОВНИ СПОНТАННОЙ И МИТОГЕН-ИНДУЦИРОВАННОЙ ПРОДУКЦИИ ЦИТОКИНОВ ТИМОЦИТАМИ (пг/мл, M±SD)

TABLE 3. EFFECT OF MICROALGAE EXTRACTS ON THE LEVELS OF SPONTANEOUS AND MITOGEN-INDUCED CYTOKINE PRODUCTION BY THYMOCYTES (pg/mL, M±SD)

Группы Groups	Уровни цитокинов в кондиционных средах тимоцитов Cytokine levels in thymocyte conditioned media		
	IL-1β	TNFα	IL-10
Базальная продукция Basal production			
<i>C. vulgaris</i>	88,48±2,36*	152,05±10,63	21,68±0,28*
<i>Coelastrella sp.</i>	84,62±0,44*†	154,41±5,36	21,02±0,13*
<i>A. platensis</i>	92,53±15,21*	136,85±3,32*†‡	21,65±0,30*‡
<i>C. closterium</i>	82,99±2,93*†	161,65±14,16*◊	21,39±0,87*
<i>P. purpureum</i>	83,47±0,26*†‡	142,75±5,34‡	21,68±0,22*
Контроль Control	77,45±1,95	141,81±1,50	20,35±0,19
Конканавалин А-стимулированная Concanavalin A-stimulated			
<i>C. vulgaris</i>	84,18±2,93*	145,91±1,69	22,17±0,61
<i>Coelastrella sp.</i>	79,03±1,54†	145,12±1,50	20,93±0,57*
<i>A. platensis</i>	90,42±2,15*†‡	143,46±6,74	24,18±3,55
<i>C. closterium</i>	74,68±1,63†◊	160,24±14,51‡	20,41±0,52*†
<i>P. purpureum</i>	79,74±1,93*†◊*	144,33±3,14	21,46±0,30*†◊
Контроль Control	76,44±1,86	150,16±7,76	21,84±0,19

Примечание. См. примечание к таблице 2.

Note. As for Table 2.

ТАБЛИЦА 4. ВЛИЯНИЕ ЭКСТРАКТОВ МИКРОВОДОРОСЛЕЙ НА УРОВНИ ЦИТОКИНОВ В ТКАНЯХ ПЕЧЕНИ (пг/мл, M±SD)

TABLE 4. EFFECT OF MICROALGAE EXTRACTS ON CYTOKINE LEVELS IN LIVER TISSUES (pg/mL, M±SD)

Группы Groups	Уровни цитокинов в экстракте печени Cytokine levels in liver extract		
	IL-1β	TNFα	IL-10
<i>C. vulgaris</i>	80,22±4,18	143,46±3,22*	20,55±0,39*
<i>Coelastrella sp.</i>	84,75±8,97	169,68±17,88†	21,03±0,70
<i>A. platensis</i>	75,69±3,51*	135,98±5,78*‡	20,44±0,38*
<i>C. closterium</i>	73,27±1,63*†‡	164,72±18,88◊	20,35±0,72
<i>P. purpureum</i>	83,74±1,03◊*	171,10±20,95†◊	21,35±0,27*†◊*
Контроль Control	80,70±3,02	152,44±4,53	21,55±0,19

Примечание. См. примечание к таблице 2.

Note. As for Table 2.

ТАБЛИЦА 5. ВЛИЯНИЕ ЭКСТРАКТОВ МИКРОВОДОРОСЛЕЙ НА УРОВНИ ЦИТОКИНОВ В ТКАНЯХ ПОЧЕК (пг/мл, M±SD)

TABLE 5. EFFECT OF MICROALGAE EXTRACTS ON CYTOKINE LEVELS IN KIDNEY TISSUES (pg/mL, M±SD)

Группы Groups	Уровни цитокинов в экстракте почек Cytokine levels in kidney extract		
	IL-1β	TNFα	IL-10
<i>C. vulgaris</i>	78,95±3,95*	151,89±12,84	20,55±0,46
<i>Coelastrella</i> sp.	78,37±0,70*	135,91±2,54†	20,41±0,16
<i>A. platensis</i>	94,81±13,92†‡	149,37±3,24‡	21,65±0,58†‡
<i>C. closterium</i>	93,10±13,84‡	147,48±8,39‡	21,69±0,61†‡
<i>P. purpureum</i>	77,67±1,48*◊*	146,69±15,56	20,76±0,49◊*
Контроль Control	92,66±9,79	148,19±10,50	20,55±0,37

Примечание. См. примечание к таблице 2.

Note. As for Table 2.

ТАБЛИЦА 6. ВЛИЯНИЕ ЭКСТРАКТОВ МИКРОВОДОРОСЛЕЙ НА УРОВНИ СТОЙКИХ МЕТАБОЛИТОВ ОКСИДА АЗОТА (мкМ/мл, M±SD)

TABLE 6. EFFECT OF MICROALGAE EXTRACTS ON THE LEVELS OF PERSISTENT NITRIC OXIDE METABOLITES (micromole/mL, M±SD)

Группы Groups	Сыворотка крови Blood serum	Кондиционные среды Conditioned environments				Экстракт печени Liver extract	Экстракт почек Kidney extract
		спленоциты splenocytes		timoциты thymocytes			
		Базальная Basal	Кон А Con A	Базальная Basal	Кон А Con A		
<i>C. vulgaris</i>	55,12±5,25	40,7±0,56	39,53±0,46	40,67±0,29	40,38±0,31	54,55±0,36	45,15±0,68*
<i>Coelastrella</i> sp.	50,76±0,71*	40,04±0,25	39,82±0,12	41,18±0,43†	29,85±0,52	45,85±4,37†	53,00±0,98*
<i>A. platensis</i>	47,27±0,20*†‡	40,04±0,35	39,05±0,34‡	39,90±0,46†‡	39,93±0,55	49,20±0,42*†‡	49,34±0,22*†
<i>C. closterium</i>	48,32±0,39*†‡◊	40,41±0,41	39,22±0,69	40,89±0,15◊	39,02±0,15*†‡◊	48,21±1,77*†‡	50,08±0,80*†
<i>P. purpureum</i>	96,16±2,43*†‡◊*	40,44±0,37	39,28±0,06‡	42,42±2,69	39,79±0,74◊	111,32±17,42*†‡◊*	49,85±0,62*†
Контроль Control	52,40±0,11	42,79±3,11	39,99±1,29	43,64±3,25	40,16±0,59	53,93±0,63	47,70±0,36

Примечание. См. примечание к таблице 2.

Note. As for Table 2.

кроводорослей на продукцию стойких метаболитов оксида азота (табл. 6).

Установлено, что экстракты микроводорослей способствуют снижению уровней оксида азота в сыворотке крови за исключением *P. purpureum*

по сравнению с контролем. Нами не выявлено существенного влияния на уровни базальной и митоген-стимулированной продукции оксида азота спленоцитами по сравнению с контролем. В отношении тимоцитов также не выявлено зна-

чимого влияния экстрактов микроводорослей на уровни продукции оксида азота за исключением митоген-стимулированной продукции оксида азота в группе *C. closterium* по сравнению с контролем. В группе *A. platensis* и *C. closterium* отмечено значимое снижение оксида азота в ткани печени, а в группе *P. purpureum* существенное увеличение уровней оксида азота в ткани печени по сравнению с контролем. Экстракт *C. vulgaris* снижал уровни оксида азота в ткани почек, а экстракт *Coelastrella* sp., *A. platensis*, *C. closterium* и *P. purpureum* увеличивал уровни оксида азота в ткани почек по сравнению с контролем.

Взаимосвязи между уровнями цитокинов в сыворотке, кондиционных средах и экстрактах тканей

Корреляционный анализ полученных данных уровней цитокинов в сыворотке крови в контрольной группе выявил наличие сопряженности IL-1 β с уровнями TNF α и IL-10 ($r = 0,97$ и $r = -0,97$, $p < 0,05$ соответственно), а также IL-10 с TNF α ($r = -0,94$, $p < 0,05$), что указывает на сбалансированность провоспалительных и противовоспалительных цитокинов. Только в группе *A. platensis* выявлена взаимосвязь провоспалительных цитокинов в сыворотке крови между собой ($r = 0,9$, $p < 0,05$), что указывает на сохранность кооперации баланса данной группы цитокинов.

Кроме этого, в контрольной группе животных показана сопряженность уровней IL-1 β в сыворотке крови с уровнями IL-1 β в экстракте тканей почек ($r = 0,9$, $p < 0,05$), а также между уровнями IL-1 β в экстракте ткани почек с уровнями IL-1 β в экстракте тканей печени ($r = -0,9$, $p < 0,05$). Также показана взаимосвязь уровней TNF α в сыворотке крови с уровнями TNF α в экстракте ткани почек ($r = 0,94$, $p < 0,05$) и между уровнями цитокина в экстракте ткани почек с уровнями в экстракте ткани печени ($r = 0,97$, $p < 0,05$).

В группе *C. vulgaris* уровни IL-1 β в сыворотке крови сопряжены с уровнями IL-1 β в экстракте ткани печени ($r = -0,9$, $p < 0,05$). Уровни IL-10 в сыворотке крови взаимосвязаны с уровнями цитокина в экстракте ткани почек и печени ($r = -0,97$, $p < 0,05$). В то же время уровни TNF α в сыворотке крови находились в прямой и сильной взаимосвязи с уровнями TNF α в экстракте ткани почек ($r = 0,97$, $p < 0,05$).

В группе *Coelastrella* sp. установлена взаимосвязь оксида азота в сыворотке крови с уровнями оксида азота в экстракте ткани почек и печени ($r = -0,9$, $p < 0,05$). Уровни TNF α в экстракте ткани печени сопряжены с уровнями TNF α в сыворотке крови и в экстракте ткани почек ($r = 0,9$, $p < 0,05$).

В группе *A. platensis* уровни оксида азота в экстракте ткани почек взаимосвязаны с уровнями оксида азота в экстракте ткани печени ($r = 0,92$, $p < 0,05$). Уровни IL-1 β в сыворотке крови сопряжены с уровнями IL-1 β в экстракте ткани печени ($r = 0,97$, $p < 0,05$). Уровни IL-10 в экстракте ткани почек взаимосвязаны с уровнями его в экстракте ткани печени. Уровни TNF α в экстракте ткани печени сопряжены с уровнями TNF α в сыворотке крови и экстракте ткани почек ($r = -0,9$, $p < 0,05$).

В группе *C. closterium* уровни оксида азота в сыворотке крови взаимосвязаны с уровнем оксида азота в экстракте ткани почек и печени ($r = 0,97$, $p < 0,05$). Уровни IL-1 β , IL-10 в сыворотке крови взаимосвязаны с уровнями IL-1 β в экстракте ткани почек ($r = 0,97$, $p < 0,05$). Уровни TNF α в экстракте ткани печени сопряжены с уровнями TNF α в сыворотке крови и экстракте ткани почек ($r = 0,9$, $p < 0,05$ и $r = -0,9$, $p < 0,05$ соответственно).

В группе *P. purpureum* уровни IL-1 β в экстракте ткани почек сопряжены с уровнями IL-1 β в сыворотке крови и экстракте ткани печени ($r = 0,9$, $p < 0,05$ и $r = -0,9$, $p < 0,05$ соответственно). Уровни TNF α в экстракте ткани печени взаимосвязаны с уровнями TNF α в сыворотке крови и экстракте ткани почек ($r = 0,94$, $p < 0,05$ и $r = 0,97$, $p < 0,05$ соответственно).

Обсуждение

Микроводоросли пресноводных водоемов и морей рассматриваются как источник питательных веществ (белки, жиры, полисахариды), а также как источник минеральных веществ, провитаминов и других биологически активных веществ, что делает их перспективными для разработки нутрицевтических веществ [1]. Авторы показали, что прием диетической добавки *C. vulgaris* мышам с иммуносупрессией, индуцированной циклофосфаном, стимулирует пролиферативный потенциал лимфоцитов и фагоцитарную активность макрофагов, повышает уровни продукции IL-2, IL-12, TNF α и IFN γ [3]. У мышей BALB/c, инфицированных *Helicobacter pylori* прием экстракта микроводоросли *Chlorococum* sp., накапливающей вторичные каротиноиды, способствовал снижению уровней провоспалительных цитокинов и нарастанию уровней противовоспалительных цитокинов [9]. Показано, что *C. vulgaris* восстанавливает способность стромальными клетками костного мозга от мышей с аденокарциномой Эрлиха продуцировать IL-6 и IL-1 α [16]. Кроме этого, выявлено увеличение колониестимулирующей активности сыворотки

крови, пролиферации спленоцитов, активности естественных киллерных клеток и уровней продукции IL-6 и IL-1 α , снижение уровней IL-6 и IL-1 α . Прием мышами *C. vulgaris* при кратковременном и длительном стрессе восстанавливал уровни IL-1 α и IL-6 [15]. Водный экстракт *Parachlorella kessleri* HY1 (*Chlorellaceae*) увеличивал уровни продукции мышами с меланомой уровней TNF α [17]. Экзополисахарид из *Chlorella* sp. индуцировал продукцию оксида азота, TNF α и IL-6 макрофагами RAW264.7 [20].

Заключение

Таким образом, употребление стандартной пищи для лабораторных животных, обогащенной масляным экстрактом микроводорослей различных систематических групп, влияет на баланс провоспалительных и противовоспалительных цитокинов в сыворотке крови, кондиционных средах иммунцитов (зрелых и наивных), а также в тканях почек и печени.

Список литературы / References

1. Abdel-Aziem S.H., Abd El-Kader H.A.M., Ibrahim F.M., Sharaf H.A., El Makawy A.I. Evaluation of the alleviative role of *Chlorella vulgaris* and *Spirulina platensis* extract against ovarian dysfunctions induced by monosodium glutamate in mice. *J. Genet. Eng. Biotechnol.*, 2018. Vol. 16, no. 2, pp. 653-660.
2. Casas-Arrojo V., Decara J., de Los Angeles Arrojo-Agudo M., Pérez-Manríquez C., Abdala-Díaz R.T. Immunomodulatory, antioxidant activity and cytotoxic effect of sulfated polysaccharides from *Porphyridium cruentum*. (S.F.Gray) Nägeli. *Biomolecules*, 2021, Vol. 11, no. 4, 488. doi: 10.3390/biom11040488.
3. Cheng D., Wan Z., Zhang X., Li J., Li H., Wang C. Dietary *Chlorella vulgaris* ameliorates altered immunomodulatory functions in Cyclophosphamide-induced immunosuppressive mice. *Nutrients*, 2017, Vol. 9, no. 7, 708. doi: 10.3390/nu9070708.
4. Choo W.T., Teoh M.L., Phang S.M., Convey P., Yap W.H., Goh B.H., Beardall J. Microalgae as potential anti-inflammatory natural product against human inflammatory skin diseases. *Front. Pharmacol.*, 2020, Vol. 11, 1086. doi: 10.3389/fphar.2020.01086.
5. El-Baz F.K., Hussein R.A., Abdel Jaleel G.A.R., Saleh D.O. Astaxanthin-Rich *Haematococcus pluvialis* algal hepatic modulation in D-galactose-induced aging in rats: role of Nrf2. *Adv. Pharm. Bull.*, 2018, Vol. 8, no. 3, pp. 523-528.
6. El-Baz F.K., Saleh D.O., Abdel Jaleel G.A., Hussein R.A. Attenuation of age-related hepatic steatosis by *Dunaliella salina* microalgae in senescence rats through the regulation of redox status, inflammatory indices, and apoptotic biomarkers. *Adv. Pharmacol. Pharm. Sci.*, 2020, 3797218. doi: 10.1155/2020/3797218.
7. Khan S., Mobashar M., Mahsood F.K., Javaid S., Abdel-Wareth A.A., Ammanullah H., Mahmood A. *Spirulina* inclusion levels in a broiler ration: evaluation of growth performance, gut integrity, and immunity. *Trop. Anim. Health Prod.*, 2020, Vol. 52, no. 6, pp. 3233-3240.
8. Lee A.H., Shin H.Y., Park J.H., Koo S.Y., Kim S.M., Yang S.H. Fucoxanthin from microalgae *Phaeodactylum tricornerum* inhibits pro-inflammatory cytokines by regulating both NF- κ B and NLRP3 inflammasome activation. *Sci. Rep.*, 2021, Vol. 11, no. 1, 543. doi: 10.1038/s41598-020-80748-6.
9. Liu B.H., Lee Y.K. Effect of total secondary carotenoids extracts from *Chlorococcum* sp. on *Helicobacter pylori*-infected BALB/c mice. *Int. Immunopharmacol.*, 2003, Vol. 3, no. 7, pp. 979-986.
10. Lykov A., Rachkovskaya L., Surovtseva M., Kim I., Rachkovsky E., Korolev M., Kotlyarova A., Letyagin A., Poveshchenko O., Gevorgiz R., Zheleznova S. In vitro and in vivo effect of the composition of fucoxanthin with porous aluminum-silicon carrier on cells. *Biointerface Res. Appl. Chem.*, 2021, Vol. 11, no. 2, pp. 9467-9476.
11. Mayer C., Richard L., Côme M., Ulmann L., Nazih H., Chénais B., Ouguerram K., Mimouni V. The marine microalga, *Tisochrysis lutea*, protects against metabolic disorders associated with metabolic syndrome and obesity. *Nutrients*, 2021, Vol. 13, no. 2, 430. doi: 10.3390/nu13020430.
12. Nasirian F., Dadkhah M., Moradi-Kor N., Obeidavi Z. Effects of *Spirulina platensis* microalgae on antioxidant and anti-inflammatory factors in diabetic rats. *Diabetes Metab. Syndr. Obes.*, 2018, Vol. 11, pp. 375-380.
13. Park G.T., Go R.E., Lee H.M., Lee G.A., Kim C.W., Seo J.W., Hong W.K., Choi K.C., Hwang K.A. Potential anti-proliferative and immunomodulatory effects of marine microalgal exopolysaccharide on various human cancer cells and lymphocytes *in vitro*. *Mar. Biotechnol. (NY)*, 2017, Vol. 19, no. 2, pp. 136-146.
14. Patwal T., Baranwal M. *Scenedesmus acutus* extracellular polysaccharides produced under increased concentration of sulphur and phosphorus exhibited enhanced proliferation of peripheral blood mononuclear cells. *3 Biotech*, 2021, Vol. 11, no. 4, 171. doi: 10.1007/s13205-021-02720-z.
15. Queiroz J.S., Barbosa C.M.V., da Rocha M.C., Bincoletto C., Paredes-Gamero E.J., de Souza Queiroz M.L., Palermo Neto J. *Chlorella vulgaris* treatment ameliorates the suppressive effects of single and repeated stressors on hematopoiesis. *Brain Behav. Immun.*, 2013, Vol. 29, pp. 39-50.
16. Ramos A.L., Torello C.O., Queiroz M.L. *Chlorella vulgaris* modulates immunomyelopoietic activity and enhances the resistance of tumor-bearing mice. *Nutr. Cancer*, 2010. Vol. 62, no. 8, pp. 1170-1180.

17. Sushytskyi L., Lukáč P., Synytsya A., Bleha R., Rajsiglová L., Capek P., Pohl R., Vannucci L., Čopíková J., Kašťánek P. Immunoactive polysaccharides produced by heterotrophic mutant of green microalga *Parachlorella kessleri* HY1 (Chlorellaceae). *Carbohydr. Polym.*, 2020, Vol. 246, 116588. doi: 10.1016/j.carbpol.2020.116588.
18. Tabarzad M., Atabaki V., Hosseinabadi T. Anti-inflammatory activity of bioactive compounds from microalgae and Cyanobacteria by focusing on the mechanisms of action. *Mol. Biol. Rep.*, 2020, Vol. 47, no. 8, pp. 6193-6205.
19. Villalpando D.M., Verdascó-Martín C.M., Plaza I., Gómez-Rivas J., de Bethencourt F.R., Villarroel M., García J.L., Otero C., Ferrer M. Beneficial Effects of Spirulina aqueous extract on vasodilator function of arteries from hypertensive rats. *Int. J. Vasc. Med.*, 2020, 6657077. doi: 10.1155/2020/6657077.
20. Wu S., Liu H., Li S., Sun H., He X., Huang Y., Long H. Transcriptome analysis reveals possible immunomodulatory activity mechanism of *Chlorella* sp. exopolysaccharides on RAW264.7 macrophages. *Mar. Drugs*, 2021, Vol. 19, no. 4, 217. doi: 10.3390/md19040217.
21. Yim J.H., Son E., Pyo S., Lee H.K. Novel sulfated polysaccharide derived from red-tide microalga *Gyrodinium impudicum* strain KG03 with immunostimulating activity *in vivo*. *Mar. Biotechnol. (NY)*, 2005, Vol. 7, no. 4, pp. 331-338.
22. Zahran E., Elbahnaswy S., Risha E., El-Matbouli M. Antioxidative and immunoprotective potential of *Chlorella vulgaris* dietary supplementation against chlorpyrifos-induced toxicity in Nile tilapia. *Fish Physiol. Biochem.*, 2020, Vol. 46, no. 4, pp. 1549-1560.

Авторы:

Лыков А.П. — к.м.н., ведущий научный сотрудник, Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной лимфологии — филиал ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр «Институт цитологии и генетики» Сибирского отделения Российской академии наук», г. Новосибирск, Россия

Уваров И.П. — руководитель ГБУ Новосибирской области «Управление ветеринарии города Новосибирска», г. Новосибирск, Россия

Геворгиз Р.Г. — к.б.н., старший научный сотрудник отдела аквакультур и морской фармакологии ФИЦ «Институт биологии южных морей имени А.О. Ковалевского Российской академии наук», г. Севастополь, Россия

Железнова С.Н. — младший научный сотрудник отдела аквакультур и морской фармакологии ФИЦ «Институт биологии южных морей имени А.О. Ковалевского Российской академии наук», г. Севастополь, Россия

Authors:

Lykov A.P., PhD (Medicine), Leading Research Associate, Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology, Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russian Federation

Uvarov I.P., Novosibirsk Regional Department of Veterinary Medicine, Novosibirsk, Russian Federation

Gevorgiz R.G., PhD (Biology), Senior Research Associate, Department of the Aquaculture and Sea Pharmacology, A. Kovalevsky Institute of Biology of the Southern Seas, Russian Academy of Sciences, Sevastopol, Russian Federation

Zheleznova S.N., Junior Research Associate, Department of the Aquaculture and Sea Pharmacology, A. Kovalevsky Institute of Biology of the Southern Seas, Russian Academy of Sciences, Sevastopol, Russian Federation

Поступила 25.06.2021
Отправлена на доработку 28.06.2021
Принята к печати 04.01.2022

Received 25.06.2021
Revision received 28.06.2021
Accepted 04.01.2022

ЦИТОКИНОВЫЙ БАЛАНС КАК ДИАГНОСТИЧЕСКИЙ МАРКЕР ВОСПАЛЕНИЯ ИСКУССТВЕННЫХ ГНОЙНО-ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ МЯГКИХ ТКАНЕЙ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

Соловьева А.С.¹, Мелконян Г.Г.^{1,2}, Коваль А.Н.^{1,2}, Ташкинов Н.В.¹,
Рукина Н.Ю.^{1,2}, Шокур О.А.³, Сапожников Ю.А.¹

¹ ФГБОУ ВО «Дальневосточный государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Хабаровск, Россия

² ФГКУ «301 военный клинический госпиталь», г. Хабаровск, Россия

³ ФГАОУ ВО «Дальневосточный федеральный университет», г. Владивосток, Россия

Резюме. В основе искусственных (искусственных) гнойно-воспалительных заболеваний мягких тканей (АГВЗМТ) лежит воспалительный процесс, который в трехдневный срок приводит к развитию флегмон и абсцессов в месте инвазии. Исследование цитокинового статуса крыс с АГВЗМТ позволяет оценить динамику маркеров воспаления и выявить особенность течения искусственного воспаления. Эксперимент проводили на 126 белых крысах серии «Вистар», разделенных на 3 группы: основную (n = 57), где использовалась лабораторная модель АГВЗМТ; группу сравнения (n = 58), в которой крысам проводилась инъекция из смеси штаммов условно-патогенных микроорганизмов, полученных в чистой культуре из ротовой жидкости человека: *S. epidermidis*, *S. mitis*, *S. salivarius* в титре 9lg (КОЕ) в 1 мл – вместе со смесью 2,5%-ной эмульсии гидрокортизона ацетата из расчета 20 мг на 100 г массы тела животного и раствора дексаметазона в количестве 0,5 мг; и контрольную группу (n = 11), в которой крысам проводилась инъекция 0,9%-ного раствора натрия хлорида в объеме 0,3 мл вместе со смесью 2,5%-ной эмульсии гидрокортизона ацетата из расчета 20 мг на 100 г массы тела животного и раствора дексаметазона в количестве 0,5 мг. С помощью автоматизированной системы анализа крови крыс Mindray DC-2800 Vet Auto Hematology Analyzer исследованы форменные элементы крови. Методом иммуноферментного анализа проведена оценка динамики провоспалительных цитокинов: фактора некроза опухолей (TNF), интерлейкина-1 β (IL-1 β), интерлейкина-6 (IL-6), противовоспалительных цитокинов: интерлейкина-4 (IL-4), интерлейкина-10 (IL-10). Для прогноза течения воспаления в сторону осложнений или разрешения воспалительного процесса использовали соотношение провоспалительных к противовоспалительным цитокинам, нормальным отношением которого считали расчетную среднюю величину цитокинового отношения для группы контроля. В ре-

Адрес для переписки:

Соловьева Анна Степановна
ФГБОУ ВО «Дальневосточный государственный
медицинский университет» Министерства
здравоохранения РФ
680000, Россия, г. Хабаровск,
ул. Муравьева-Амурского, 35.
Тел.: 8 (914) 206-58-68.
E-mail: a.s.solovyeva@mail.ru

Address for correspondence:

Anna S. Solovyeva
Far Eastern State Medical University
35 Muravyov-Amursky St
Khabarovsk
680000 Russian Federation
Phone: +7 (914) 206-58-68.
E-mail: a.s.solovyeva@mail.ru

Образец цитирования:

А.С. Соловьева, Г.Г. Мелконян, А.Н. Коваль,
Н.В. Ташкинов, Н.Ю. Рукина, О.А. Шокур,
Ю.А. Сапожников «Цитокиновый баланс как
диагностический маркер воспаления искусственных
гнойно-воспалительных заболеваний мягких тканей
в эксперименте» // Медицинская иммунология, 2023.
Т. 25, № 1. С. 91-100.
doi: 10.15789/1563-0625-CBA-2304

© Соловьева А.С. и соавт., 2023

Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

A.S. Solovyeva, G.G. Melkonyan, A.N. Koval, N.V. Tashkinov,
N.Yu. Rukina, O.A. Shokur, Yu.A. Sapozhnikov "Cytokine
balance as a diagnostic marker of inflammation in experimental
purulent lesions of soft tissues", *Medical Immunology
(Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2023, Vol. 25, no. 1,
pp. 91-100.
doi: 10.15789/1563-0625-CBA-2304

© Solovyeva A.S. et al., 2023

The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License

DOI: 10.15789/1563-0625-CBA-2304

зультате эксперимента проведена оценка характера клеточной воспалительной реакции в динамике, определение ее взаимосвязи с маркерами воспаления. У всех животных основной группы развилась флегмона мягких тканей в интервале от 3 до 7 дней от начала эксперимента, а летальность составила 100%. В группе сравнения абсцессы развились в 82,8% случаев на 12-15-й день от начала эксперимента, летальных исходов не наблюдалось. Соотношение про- и противовоспалительных цитокинов в основной группе 8-кратно повышалось уже к исходу 1-х суток, группа сравнения характеризовалась отсутствием существенных отличий от группы контроля. Наиболее высокие показатели провоспалительных цитокинов зафиксированы в основной группе на 12-15 сутки.

Ключевые слова: флегмона, абсцессы, искусственные заболевания мягких тканей, воспалительные цитокины.

CYTOKINE BALANCE AS A DIAGNOSTIC MARKER OF INFLAMMATION IN EXPERIMENTAL PURULENT LESIONS OF SOFT TISSUES

Solovyeva A.S.^a, Melkonyan G.G.^{a,b}, Koval A.N.^{a,b}, Tashkinov N.V.^a, Rukina N.Yu.^{a,b}, Shokur O.A.^c, Sapozhnikov Yu.A.^a

^a Far Eastern State Medical University, Khabarovsk, Russian Federation

^b 301st Military Clinical Hospital, Khabarovsk, Russian Federation

^c Far Eastern Federal University, Vladivostok, Russian Federation

Abstract. Inflammatory process is at the heart of artificial (artificial) purulent-inflammatory diseases of soft tissues (APDST), which may lead to the development of phlegmon and abscesses at the site of invasion within a three-day period. The study of the cytokine status of rats with APDST allows us to evaluate the dynamics of inflammation markers and assess the peculiarities of the pathological course in artificial model of inflammation. The experiment was carried out on 126 white Wistar rats divided into 3 groups: (1) the main group (n = 57), where the laboratory model of APDST was used; (2) a comparison group (n = 58), in which the rats were injected with a mixture of opportunistic bacterial strains isolated from pure cultures of human oral fluid, i.e., *S. epidermidis*, *S. mitis*, *S. salivarius* at the titer of 9lg (CFU) per 1 ml injected together with a mixture of 2.5% hydrocortisone acetate emulsion (20 mg per 100 g of animal body weight), and dexamethasone solution at the dose of 0.5 mg; (3) control group (n = 11), where the animals were injected with 0.9% sodium chloride solution in a volume of 0.3 ml, together with a mixture of 2.5% hydrocortisone acetate emulsion at the rate of 20 mg per 100 g of body weight, and dexamethasone solution at the dose of 0.5 mg. Blood cells were studied using the Mindray DC-2800 Vet Auto Hematology Analyzer automated rat blood test system. The dynamics of pro-inflammatory cytokines: tumor necrosis factor (TNF), interleukin-1 β (IL-1 β), interleukin-6 (IL-6), anti-inflammatory cytokines: interleukin-4 (IL-4), interleukin-10 (IL-10) was assessed by enzyme immunoassay. To predict the course of inflammation towards complications, or resolution of the inflammatory process, the ratio of pro-inflammatory to anti-inflammatory cytokines was used, with normal ratio considered an estimated average of the cytokine ratio for the control group. When analyzing results of this experimental study, the nature of cellular inflammatory response was assessed in dynamics, and its relationship with inflammation markers was determined. All animals of the main group developed soft tissue phlegmon within 3 to 7 days from the beginning of the experiment, and their mortality rate was 100%. In comparison group, the abscesses developed in 82.8% of cases on the day 12 to 15 from the start of the experiment, without any deaths observed. The ratio of pro- and anti-inflammatory cytokines in the main group increased 8-fold already by the end of the 1st day, the comparison group was characterized by the absence of significant differences from the control group. The highest levels of pro-inflammatory cytokines were recorded in the main experimental group on the days 12 to 15.

Keywords: purulent infection, inflammation, experimental, soft tissues, cytokines

Введение

В основе искусственного гнойно-воспалительного заболевания мягких тканей лежит воспалительный процесс, который в трехдневный срок приводит к развитию флегмон и абсцессов в местах инвазии. Известно, что гнойно-воспалительные процессы, протекающие в мягких тканях в ответ на внедрение патогенных бактерий, активируют неспецифические факторы защиты организма и запускают каскад иммунологических процессов [10, 11]. Помимо многочисленных клеточных и гуморальных реакций, способствующих заживлению раны, в воспалительном процессе принимают участие и факторы иммунной системы, в том числе цитокины, количественное определение которых имеет огромную практическую значимость для оценки патологических процессов [1, 12, 13, 14].

Целью данного исследования явилось изучение показателей цитокинового статуса и характера клеточной воспалительной реакции в мягких тканях у крыс, что позволит в клинических условиях определить диагностическую и прогностическую значимость этих показателей и выбрать оптимальную тактику хирургического лечения, иммунотерапии и реабилитации.

Материалы и методы

Исследование проводилось на базе центральной научно-исследовательской лаборатории ДВГМУ. Использовались 3-месячные белые лабораторные крысы-самцы «Вистар» с массой тела 220–250 г. Все оперативные вмешательства проводились под наркозом в асептических условиях.

Все крысы были разделены на 3 группы: основную, группу сравнения и контрольную. В основной группе ($n = 57$) использовали запатентованную нами лабораторную модель АГВЗМТ у крыс [2]. Для этого в мышечный массив тазовой конечности крысы через предварительно эпилированный и обработанный антисептиком участок кожи в одном шприце однократно вводили смесь 2,5%-ной эмульсии гидрокортизона ацетата из расчета 20 мг на 100 г массы тела животного, раствор дексаметазона в количестве 0,5 мг и ротовую жидкость человека в объеме 0,3 мл. В группе сравнения ($n = 58$) крысам проводилась инъекция из смеси штаммов факультативно-анаэробных микроорганизмов, полученных в чистой культуре из ротовой жидкости человека: *S. epidermidis*, *S. mitis*, *S. salivarius* в титре 9lg (КОЕ) в 1 мл – вместе со смесью 2,5%-ной эмульсии гидрокортизона ацетата из расчета 20 мг на 100 г массы тела животного и 0,5 мг раствора дексаметазона. В контрольной группе ($n = 11$) крысам проводилась инъекция 0,9%-ного раствора

натрия хлорида в объеме 0,3 мл вместе со смесью 2,5%-ной эмульсии гидрокортизона ацетата из расчета 20 мг на 100 г массы тела животного и 0,5 мг раствора дексаметазона.

Изучались летальность крыс в период до 12 суток после инъекции и корреляция этих показателей с данными анализа крови. Забор крови проводили под легким эфирным наркозом из сердца, выводя в последующем животных из эксперимента по 7 крыс на каждом этапе забора через 12 ч, 1, 2, 3, 5, 7, 9 и 12 суток от начала воспаления.

В цельной крови с помощью автоматического анализатора крови животных Vet Auto Hematology Analyzer BC 2800 Mindary измеряли показатели общего анализа крови, оценивали основные показатели для анализа уровня лейкоцитов, эритроцитов, гемоглобина и тромбоцитов.

Уровень интерлейкинов (IL) (TNF α , IL-1 β , IL-4, IL-6 и IL-10) определяли в сыворотке крови методом ИФА с помощью специфических наборов АО «Вектор-Бест». Оценку выраженности воспалительной реакции при гнойном воспалении в мягких тканях в динамике определяли с помощью интерлейкинового баланса (ИБ) путем подсчета соотношения про- и противовоспалительных IL: (TNF α + IL-1 β + IL-6) / (IL-4 + IL-10).

При статистической обработке определяли среднее арифметическое, среднее квадратичное отклонение. Для исследования силы взаимосвязей показателей изучались межгрупповые различия при помощи непараметрических критериев Манна–Уитни, Вальда–Вольфовица и Колмогорова–Смирнова при $p \leq 0,05$. Обработка цифровых данных проведена методом вариационной статистики с использованием пакета программ Statistica 6 [5].

Результаты

По полученным нами данным выявлено, что гнойно-воспалительный процесс в мягких тканях по-разному протекает на модели АГВЗМТ и модели с использованием выделенной из слюны условно-патогенной флоры.

В результате исследования межгрупповых различий по тестам Манна–Уитни, Вальда–Вольфовица, Колмогорова–Смирнова выявлены следующие закономерности. Так, между основной группой и контрольной установлены достоверные различия в динамике веса, наличии инфильтрата, боли (при пальпации), абсцесса, отека, Lymph (%), Mon (%), Gran (%), PDW, IL-6, в то время как между группой сравнения и контрольной группой достоверные различия выявлены по значительно меньшему количеству показателей: наличие отека, Lymph (%), Gran (%). Обнаружен-

ные межгрупповые различия основной группы и группы сравнения касались многих показателей воспаления: динамика веса, инфильтрат, боль, хромота, абсцесс, флегмона с начальными проявлениями, флегмона с выраженными проявлениями, асимметрия конечностей, альтерация, Lymph ($\times 10^9/\text{л}$), Mon ($\times 10^9/\text{л}$), Gran ($\times 10^9/\text{л}$), Lymph (%), Mon (%), Gran (%), IL-10 (нг/мл) (табл. 1, 2, 3).

Для оценки воспалительной реакции среди показателей общего анализа крови наиболее информативным служит уровень лейкоцитов. В ходе эксперимента, на фоне искусственно вызванной иммуносупрессии, выявлено, что в первые 12 часов подавлена реактивность организма крыс и после ввода триггера воспаления лейкоцитоз отсутствовал (табл. 4). На 3-и сутки имеющиеся лабораторные показатели, коррелирующие с воспалением в основной группе, в динамике снизились, что можно объяснить феноменом потребления пула лейкоцитов. К тому же вызванная нами искусственная иммуносупрессия оказывает действие в течение первых 3 суток, подавляя пролиферацию лимфоцитов в ответ на внедрение антигена [3, 5, 7]. В группе сравнения уровень лейкоцитов в первые 3 суток близок к основной группе и сохранялся на протяжении всего эксперимента в пределах $7,3 \times 10^9/\text{л} - 11,6 \times 10^9/\text{л}$.

Из таблицы 4 видно, что переломный момент в течение воспаления приходится на 5-е сутки: в основной группе отмечался резкий подъем уровня лейкоцитов ($13,817 \pm 1,518 \times 10^9/\text{л}$), незначительно превышая аналогичный показатель в группе сравнения ($11,643 \pm 0,713 \times 10^9/\text{л}$). Нарастание этого показателя в группе с АГВЗМТ, где была введена ротовая жидкость, в динамике (12-е сутки: $14,733 \pm 3,042 \times 10^9/\text{л}$) соответствовало клиническим изменениям. Так, на фоне лейкоцитоза отмечалось подавление двигательной активности, снижение аппетита вплоть до его отсутствия на 12-е сутки, отрицательная динамика массы тела с 250 ± 19 г до 161 ± 15 г, время образования инфильтрата, абсцесса или флегмоны мягких тканей, характер тканей при вскрытии гнойника. Необходимо отметить, что это нашло отражение и на показателях летальности крыс в период до 12 дня эксперимента (летальный исход у 100% животных), в то время как в группе сравнения ни одна крыса не погибла. В группе сравнения местная воспалительная реакция после 5-х суток не выражена, количество лейкоцитов начинает снижаться, вплоть до 12-х суток ($7,317 \pm 1,098 \times 10^9/\text{л}$).

Динамика уровней про- и противовоспалительных ИЛ в динамике воспаления в разных группах животных представлена в таблицах 5 и 6.

Провоспалительные ИЛ, такие как TNF α и IL-1 β , продуцирующиеся в ответ на внедрение

патогенов и повреждение тканей, стимулируют развитие местной воспалительной реакции, направленной на элиминацию патогена и заживление тканей [1, 4]. Результаты исследования показали, что в группе с АГВЗМТ TNF α усиленно вырабатывается в начале эксперимента ($0,813 \pm 0,181$ нг/мл) и такой уровень держится до 2-х суток ($0,787 \pm 0,219$ нг/мл). После некоторого снижения на 3-и сутки его уровень вновь повышается, и такая тенденция сохраняется до конца эксперимента ($1,533 \pm 1,533$ нг/мл). В группе сравнения исходно сниженный уровень TNF α , образует два пика повышения: на 3-е и 12-е сутки эксперимента ($0,629 \pm 0,519$ нг/мл и $0,629 \pm 0,519$ нг/мл соответственно), наглядно показывая роль этого цитокина в развитии воспалительного процесса.

Выявлены два волнообразных подъема IL-1 β в основной группе: пики подъема приходятся на 2-е ($0,104 \pm 0,021$ нг/мл) и 7-е ($0,321 \pm 0,157$ нг/мл) сутки. В группе сравнения изначально невысокие уровни этого цитокина приобретают динамический характер роста, проявляющийся двумя пиками подъема на 5-е и 12-е сутки ($0,143 \pm 0,039$ нг/мл и $0,172 \pm 0,020$ нг/мл соответственно). Из таблиц 5 и 6 видно, что с 5-х суток IL-1 β в основной группе в 12 раз выше, чем в группе сравнения и, несмотря на снижение на 9-е сутки, имел тенденцию роста к концу эксперимента ($0,107 \pm 0,080$ нг/мл).

Изначально повышенный уровень IL-6 в основной группе продолжал увеличиваться до 2-х суток, превышая таковые показатели в группе сравнения и подчеркивая его причастность, совместно с TNF α и IL-1 β , к индукции острофазного ответа, а в дальнейшем развитии проявление его иммуносупрессорных свойств. На 3-е сутки этот показатель в группе с АГВЗМТ снижался до нормальных величин ($0,257 \pm 0,170$ нг/мл). В группе сравнения к 3 суткам выявлен пикообразный подъем этого показателя до $3,729 \pm 2,137$ нг/мл. В основной группе, начиная с 3-х суток, уровень IL-6 увеличивался и превышал таковой в группе сравнения лишь к 12-м суткам, достигнув максимального значения ($5,255 \pm 2,470$ нг/мл), что может расцениваться как генерализация гнойного воспаления. В группе сравнения повышенный уровень этого цитокина практически не изменялся в период с 3-х и до 7-х суток, затем отмечался спад продукции IL-6 на 7-е сутки и к 12-м суткам достигал нормальных величин ($0,167 \pm 0,167$ нг/мл).

Обсуждение

Провоспалительные ИЛ, принимающие участие в индукции и дальнейшем прогрессировании воспаления, приводят сами к повреждениям тканей, и поэтому существует антагонистиче-

ТАБЛИЦА 1. МЕЖГРУППОВЫЕ РАЗЛИЧИЯ МЕЖДУ ОСНОВНОЙ ГРУППОЙ И КОНТРОЛЬНОЙ НА ОСНОВАНИИ РАСЧЕТА НЕПАРАМЕТРИЧЕСКИХ КРИТЕРИЕВ ($p \leq 0,05$)

TABLE 1. INTERGROUP DIFFERENCES BETWEEN THE MAIN GROUP AND THE CONTROL GROUP BASED ON THE CALCULATION OF NONPARAMETRIC CRITERIA ($p \leq 0.05$)

Показатель Indicator	Тест Манна–Уитни Mann–Whitney test	Тест Вальда–Вольфовица Wald–Wolfowitz test	Тест Колмогорова–Смирнова Kolmogorov–Smirnov test
Вес, г Weight, g	0,000142	0,013014	$p < 0,005$
Инфильтрат Infiltrate	0,004637	0,042663	$p < 0,01$
Боль (при пальпации) Pain (on palpation)	0,004637	0,042663	$p < 0,01$
Потеря веса Weight loss	0,004637	0,042663	$p < 0,01$
Абсцесс Abscess	0,004637	0,042663	$p < 0,01$
Отек Edema	0,000000	0,000000	$p < 0,001$
Lymph, %	0,000005	0,000000	$p < 0,001$
Mon, %	0,000151	0,001144	$p < 0,005$
Gran, %	0,000024	0,000025	$p < 0,001$
PDW	0,000565	0,024097	$p < 0,025$
IL-6, нг/мл IL-6, ng/mL	0,005301	0,021381	$p < 0,025$

ТАБЛИЦА 2. МЕЖГРУППОВЫЕ РАЗЛИЧИЯ МЕЖДУ ГРУППОЙ СРАВНЕНИЯ И КОНТРОЛЬНОЙ ГРУППОЙ НА ОСНОВАНИИ РАСЧЕТА НЕПАРАМЕТРИЧЕСКИХ КРИТЕРИЕВ ($p \leq 0,05$)

TABLE 2. INTERGROUP DIFFERENCES BETWEEN THE COMPARISON GROUP AND THE CONTROL GROUP BASED ON THE CALCULATION OF NONPARAMETRIC CRITERIA ($p \leq 0.05$)

Показатель Indicator	Тест Манна–Уитни Mann–Whitney test	Тест Вальда–Вольфовица Wald–Wolfowitz test	Тест Колмогорова–Смирнова Kolmogorov–Smirnov test
Отек Edema	0,000023	0,000013	$p < 0,001$
Lymph, %	0,000405	0,013585	$p < 0,001$
Gran, %	0,000314	0,000011	$p < 0,001$

ТАБЛИЦА 3. МЕЖГРУППОВЫЕ РАЗЛИЧИЯ МЕЖДУ ОСНОВНОЙ ГРУППОЙ И ГРУППОЙ СРАВНЕНИЯ НА ОСНОВАНИИ РАСЧЕТА НЕПАРАМЕТРИЧЕСКИХ КРИТЕРИЕВ ($p \leq 0,05$)

TABLE 3. INTERGROUP DIFFERENCES BETWEEN THE MAIN GROUP AND THE COMPARISON GROUP BASED ON THE CALCULATION OF NONPARAMETRIC CRITERIA ($p \leq 0.05$)

Показатель Indicator	Тест Манна–Уитни Mann–Whitney test	Тест Вальда–Вольфовица Wald–Wolfowitz test	Тест Колмогорова–Смирнова Kolmogorov–Smirnov test
Вес, г Weight, g	0,000000	0,000000	$p < 0,001$
Инфильтрат Infiltrate	0,000035	0,000530	$p < 0,001$
Боль (при пальпации) Pain (on palpation)	0,000035	0,000530	$p < 0,001$
Хромота Lameness	0,000000	0,000000	$p < 0,001$
Потеря веса Weight loss	0,000000	0,000530	$p < 0,001$
Абсцесс Abscess	0,000000	0,000000	$p < 0,001$
Флегмона (начальные явления) Phlegmon (initial phenomena)	0,000000	0,000000	$p < 0,001$
Флегмона (выраженные явления) Phlegmon (pronounced phenomena)	0,000007	0,000057	$p < 0,025$
Асимметрия конечностей Limb asymmetry	0,000002	0,000000	$p < 0,005$
Альтерация Alteration	0,000000	0,000000	$p < 0,001$
Лymph, $\times 10^9/\text{л}$ Lymph, $\times 10^9/\text{L}$	0,000000	0,000000	$p < 0,001$
Mon, $\times 10^9/\text{л}$ Mon, $\times 10^9/\text{L}$	0,002339	0,000391	$p < 0,025$
Gran, $\times 10^9/\text{л}$ Gran, $\times 10^9/\text{L}$	0,000000	0,000084	$p < 0,001$
Lymph, %	0,000000	0,000000	$p < 0,001$
Mon, %	0,000002	0,000084	$p < 0,001$
Gran, %	0,000000	0,000000	$p < 0,001$
IL-10, нг/мл IL-10, ng/mL	0,001823	0,036068	$p < 0,01$

ТАБЛИЦА 4. ДИНАМИКА ИЗМЕНЕНИЯ УРОВНЯ ЛЕЙКОЦИТОВ ($\times 10^9/\text{л}$) КРОВИ КРЫС В РАЗНЫХ ГРУППАХ, $M \pm m$

TABLE 4. DYNAMICS OF CHANGES IN THE LEVEL OF LEUKOCITES ($\times 10^9/\text{L}$) IN THE BLOOD OF RATS IN DIFFERENT GROUPS, $M \pm m$

Группы эксперимента Experiment groups	Время от начала введения триггера воспаления Time from start of inflammatory trigger administration							
	12 ч 12 h	1-е сутки 1 st day	2-е сутки 2 nd day	3-е сутки 3 rd day	5-е сутки 5 th day	7-е сутки 7 th day	9-е сутки 9 th day	12-е сутки 12 th day
Основная Main n = 57	6,567 $\pm 0,600$	10,487 $\pm 1,744$	9,038 $\pm 1,050$	7,871 $\pm 1,548$	13,817** $\pm 1,518$	9,417 $\pm 1,382$	7,875 $\pm 1,349$	14,733* $\pm 3,042$
Сравнения Comparison n = 58	9,900* $\pm 1,014$	10,975 $\pm 0,429$	7,213 $\pm 1,022$	10,357 $\pm 2,147$	11,643 $\pm 0,713$	8,943 $\pm 0,964$	7,875 $\pm 1,349$	7,317 $\pm 1,098$
Контроль Control n = 11	6,910 $\pm 0,694$							

Примечание. * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,001$, достоверное отличие от контроля.

Note. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.001$, significant difference from control.

ТАБЛИЦА 5. СОДЕРЖАНИЕ ЦИТОКИНОВ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ КРЫС (n = 58) С МОДЕЛЬЮ АРТИФИЦИАЛЬНОГО ВОСПАЛЕНИЯ В ДИНАМИКЕ, $M \pm m$

TABLE 5. CONTENT OF CYTOKINES IN THE BLOOD SERUM OF RATS (n = 58) WITH A MODEL OF ARTIFICIAL INFLAMMATION IN DYNAMICS, $M \pm m$

Срок воспаления Term of inflammation	TNF α , нг/мл TNF α , ng/mL	IL-1 β , нг/мл IL-1 β , ng/mL	IL-6, нг/мл IL-6, ng/mL	IL-4, нг/мл IL-4, ng/mL	IL-10, нг/мл IL-10, ng/mL	Интерлейкиновый баланс Interleukin balance (TNF α + IL-1 β + IL-6) / (IL-4 + IL-10)
12 ч 12 h	0,813 $\pm 0,181$	0,041 $\pm 0,013$	0,650 $\pm 0,364$	1,987 $\pm 0,146$	0,235 $\pm 0,023$	0,686** $\pm 0,219$
1-е сутки 1 st day	0,656 $\pm 0,219$	0,103 $\pm 0,015$	1,137* $\pm 0,218$	2,087 $\pm 0,248$	0,177 $\pm 0,014$	0,891** $\pm 0,142$
2-е сутки 2 nd day	0,787 $\pm 0,219$	0,104 $\pm 0,021$	1,606** $\pm 0,205$	1,950 $\pm 0,011$	0,269* $\pm 0,017$	0,166 $\pm 0,210$
3-е сутки 3 rd day	0,080 $\pm 0,060$	0,034 $\pm 0,001$	0,257 $\pm 0,173$	4,986 $\pm 3,001$	0,162 $\pm 0,027$	0,105 $\pm 0,049$
5-е сутки 5 th day	0,250 $\pm 0,196$	0,043 $\pm 0,016$	0,073 $\pm 0,284$	2,017 $\pm 0,160$	0,163 $\pm 0,015$	0,494 $\pm 0,139$
7-е сутки 7 th day	1,275 $\pm 0,748$	0,321** $\pm 0,157$	2,433 $\pm 1,035$	2,350 $\pm 0,106$	0,298** $\pm 0,083$	1,559** $\pm 0,345$
9-е сутки 9 th day	0,243 $\pm 0,204$	0,076 $\pm 0,030$	1,207 $\pm 0,506$	2,514 $\pm 0,120$	0,231 $\pm 0,057$	0,573** $\pm 0,188$
12-е сутки 12 th day	1,533 $\pm 1,533$	0,107 $\pm 0,087$	5,255** $\pm 2,475$	2,700 $\pm 0,321$	0,220 $\pm 0,119$	2,363** $\pm 0,230$
Контроль Control	0,350 $\pm 0,115$	0,0200 $\pm 0,007$	0,200 $\pm 0,107$	1,870 $\pm 0,147$	0,192 $\pm 0,029$	0,230 $\pm 0,007$

Примечание. См. примечание к таблице 4.

Note. As for Table 4.

ТАБЛИЦА 6. СОДЕРЖАНИЕ ЦИТОКИНОВ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ КРЫС (n = 58) В ГРУППЕ СРАВНЕНИЯ, M±m

TABLE 6. CONTENT OF CYTOKINES IN THE BLOOD SERUM OF RATS (n = 58) IN THE COMPARISON GROUP, M±m

Срок воспаления Term of inflammation	TNF α , нг/мл TNF α , ng/mL	IL-1 β , нг/мл IL-1 β , ng/mL	IL-6, нг/мл IL-6, ng/mL	IL-4, нг/мл IL-4, ng/mL	IL-10, нг/мл IL-10, ng/mL	Интерлейкиновый баланс Interleukin balance (TNF α + IL-1 β + IL-6) / (IL-4 + IL-10)
12 ч 12 h	0,169 ±0,093	0,014 ±0,009	0,050 ±0,033	1,875 ±0,106	0,249 ±0,074	0,111* ±0,051
1-е сутки 1 st day	0,031 ±0,031	0,036 ±0,021	0,144 ±0,070	1,800 ±0,122	0,098 ±0,018	0,127 ±0,048
2-е сутки 2 nd day	0,188 ±0,083	0,053 ±0,011	0,319 ±0,199	2,025 ±0,070	0,183 ±0,054	0,257 ±0,097
3-е сутки 3 rd day	0,629 ±0,519	0,083 ±0,025	3,729 ±2,137	1,943 ±0,129	0,203 ±0,034	1,722 ±0,909
5-е сутки 5 th day	0,083 ±0,054	0,143** ±0,039	3,675 ±3,295	1,787 ±0,301	0,201 ±0,055	4,084 ±3,841
7-е сутки 7 th day	0,00 ±0,000	0,026 ±0,021	1,207 ±1,013	2,186 ±0,108	0,167 ±0,026	0,481 ±0,389
9-е сутки 9 th day	0,057 ±0,057	0,081* ±0,021	0,757 ±0,450	2,600* ±0,239	0,173 ±0,068	0,322 ±0,16
12-е сутки 12 th day	0,958 ±0,381	0,172** ±0,020	0,167± 0,167	2,333* ±0,080	0,105 ±0,044	0,549 ±0,164
Контроль Control	0,350 ±0,115	0,020 ±0,007	0,200 ±0,107	1,870 ±0,147	0,192 ±0,029	0,230 ±0,007

Примечание. См. примечание к таблице 4.

Note. As for Table 4.

ская система, которая вырабатывает противовоспалительные цитокины [6, 7, 9, 13]. Интерлейкиновый профиль противовоспалительных цитокинов характеризовался следующими особенностями. Уровень IL-4 на 3-и сутки эксперимента в основной группе был в 2,5 раза выше, чем в группе сравнения (4,986±3,001 нг/мл и 1,943±0,129 нг/мл соответственно). Лишь на 2-е и 9-е сутки эксперимента показатели IL-4 в обеих группах были сопоставимы. Динамика уровня IL-10 в обеих группах не отмечалась существенным отличием от контрольных значений.

Проводя сравнительную характеристику интерлейкинового баланса в динамике видно, что через 12 часов от начала эксперимента этот показатель составил в основной группе и в группе сравнения 0,686±0,219 и 0,111±0,051, а в 1-й день числа были равны 0,891±0,142 и 0,257±0,097 (табл. 5, 6). На 2-е сутки этот показатель в основной группе (0,166±,210) превышал не только контрольные значения, но и аналогичные данные в группе сравнения. Подъем значений в группе с моделью АГВЗМТ отмечен на 7-е сутки

(1,55±0,34) и 12-е сутки (2,363±0,230), превышая норму в 10 раз. Такая картина отражает процесс генерализации гнойной инфекции и служит прогностическим критерием летального исхода. В группе сравнения в течение первых 2 суток отмечается сниженный показатель (0,25±0,09) по отношению к группе контроля, а затем резкий подъем лишь к 5-м суткам (4,08±3,84), значительно превышающий показатели основной группы. К 7-м суткам происходило резкое снижение ИБ и такая тенденция сохранялась до 12-х суток (0,54±0,16).

Таким образом, неблагоприятный исход хирургической инфекции происходил в результате цитокинового дисбаланса и проявлялся в изменении уровней ИЛ, ответственных за развитие гуморального типа иммунного ответа, нарушении функции антителопродукторов. Это могло инициировать дальнейшую прогрессию воспаления, клинически создавая фон многократного превышения нормы с нарушением витальных функций и неблагоприятного исхода, как это наблюдалось у крыс с моделью АГВЗМТ.

Выводы

1. Течение искусственного воспаления, вызванного введением в мягкие ткани ротовой жидкости (модель АГВЗМТ), уже на 3-и сутки приводит к развитию выраженного воспаления, подтверждающееся выраженной экспрессией цитокинов, достоверно превышающей аналогичные показатели в группе сравнения, где в мягкие ткани вводился микст условно-патогенных микробов.

2. Интерлейкиновый баланс является наиболее информативным цитокиновым параметром, показатель которого в основной группе в первые сутки в 7 раз, а к 12-м суткам в 5 раз превышал таковой в группе сравнения, что под-

тверждалось развитием гнойно-септических осложнений и высокой степенью летальности в группе АГВЗМТ.

3. Показатели интерлейкинового баланса в комплексе с другими лабораторными маркерами воспаления позволяют использовать их в качестве раннего диагностического критерия прогноза развития тяжелых послеоперационных осложнений в результате гнойно-воспалительных заболеваний мягких тканей не только в рамках эксперимента, но и экстраполировать эти данные в клинические условия. Это позволит на более ранних сроках принять необходимые меры по выбору оптимальной тактики хирургического лечения, иммунотерапии и реабилитации.

Список литературы / References

1. Кетлинский С.А., Симбирцев А.С. Цитокины. СПб.: Фолиант. 2008. 552 с. [Ketlinskii S.A., Simbirtsev A.S. Cytokines]. St. Petersburg: Foliant, 2008. 552 p.
2. Коваль А.Н., Мелконян Г.Г., Ташкинов Н.В., Стрельникова Н.В. Способ получения лабораторной модели артифициального флегмонозного гнойного воспаления мягких тканей у крыс на фоне искусственной иммуносупрессии. Патент на изобретение RUS № 2581255, 23.03.2016. [Koval A.N., Melkonyan G.G., Tashkinov N.V., Strelnikova N.V. A method for obtaining a laboratory model of artificial phlegmonous purulent inflammation of soft tissues in rats against the background of artificial immunosuppression. Patent 2581255 RUS, 23.03.2016.
3. Кузин М.И., Костюченко Б.М. Раны и раневая инфекция: руководство для врачей. 2-е изд., перераб. и доп. М.: Медицина, 1990. 592 с. [Kuzin M.I., Kostyuchenok B.M. Wounds and wound infection: Guide for doctors. 2nd ed., reprint. and add.]. Moscow: Meditsina, 1990. 592 p.
4. Лазарев С.М., Гамзатов Х.А. Роль цитокинов в развитии и лечении перитонита // Вестник хирургии им. И.И. Грекова, 2008. Т. 167, № 5. С. 109-113. [Lazarev S.M., Gamzatov Kh.A. The role of cytokines in the development and treatment of peritonitis. *Vestnik khirurgii im. I.I. Grekova = Grekov's Bulletin of Surgery*, 2008, Vol. 167, no. 5, pp. 109-113. (In Russ.)]
5. Лучкевич В.С., Самодова И.Л. Основы медицинской статистики. Учебно-методическое пособие / Под ред. В.С. Лучкевича. СПб.: СЗГМУ им. И.И. Мечникова, 2014. 32 с. [Luchkevich V.S., Samodova I.L. Fundamentals of medical statistics: educational and methodical manual. Teaching aid / Ed. V.S. Luchkevich]. St. Petersburg: I. Mechnikov Northwestern State Medical University, 2014, 32 p.
6. Определение цитокинового баланса при оценке состояния здоровья у работников промышленных предприятий: Методические рекомендации. М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2012. 15 с. [Determination of cytokine balance in assessing the health status of industrial workers: Methodological recommendations]. Moscow: Federal Center for Hygiene and Epidemiology of Rosпотребнадзор, 2012. 15 p.
7. Останин А.А., Леплина О.Ю., Тихонова М.А., Шевела Е.Я., Курганова Е.В., Стрельцова Е.И., Черных Е.Р. Цитокин-опосредованные механизмы развития системной иммуносупрессии у больных с гнойно-хирургической патологией // Цитокины и воспаление, 2002. № 1. С. 38-45. [Ostanin A.A., Leplina O.Yu., Tikhonova M.A., Shevela E.Ya., Kurganova E.V., Streltsova E.I., Chernykh E.R. Cytokine-mediated mechanisms of development of systemic immunosuppression in patients with surgical infections. *Tsitokiny i vospalenie = Cytokines and Inflammation*, 2002, no. 1, pp. 38-45. (In Russ.)]
8. Романова Ю.М., Щегловитова О.Н., Бошнаков Р.Х. Стимуляция бактериального роста цитокином ФНО α в системе *in vitro* // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология, 2005. № 2. С. 37-39. [Romanova Yu.M., Shcheglovitova O.N., Boshnakov R.H. Stimulation of bacterial growth by cytokine TNF α in the system *in vitro*. *Molekulyarnaya genetika, mikrobiologiya i virusologiya = Molecular Genetics, Microbiology and Virology*, 2005, no. 2, pp. 37-39. (In Russ.)]
9. Черных Е.Р., Леплина О.Ю., Тихонова М.А., Пальцев А.В., Останин А.А. Цитокиновый баланс в патогенезе системного воспалительного ответа: новая мишень иммунотерапевтических воздействий при лечении сепсиса // Медицинская иммунология, 2001. Т. 3, № 3. С. 415-429. [Chernykh E.R., Leplina O.Yu., Tikhonova M.A., Paltsev A.V., Ostanin A.A. Cytokine balance in the pathogenesis of systemic inflammatory response:

a new target of immunotherapeutic effects in the treatment of sepsis. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2001, Vol. 3, no. 3. pp. 415-429. (In Russ.)]

10. Axelsson J., Ferreira M., Adolfsson L., McCrea K., Ward R., Larm O. Cytokines in blood from septic patients interact with surface-immobilized heparin. *ASAIO J.*, 2010, Vol. 56, no. 1, pp. 48-51.

11. Casey L.C. Immunologic response to infection and its role in septic shock. *Crit. Care Clin.*, 2000, Vol. 16, pp. 193-213.

12. Cinel I., Steven M. O., Molecular Biology of Inflammation and Sepsis. *Crit. Care Med.*, 2009, Vol. 37. no. 1, pp. 291-304.

13. Dinarello C.A. Proinflammatory cytokines. *Chest.*, 2000, Vol. 118, pp. 503-508.

14. Kishimoto T. Interleukin-6: discovery of pleiotropic cytokine. *Arthritis Res. Ther.*, 2006, Vol. 8, no. 2, pp. 2-14.

Авторы:

Соловьева А.С. — д.м.н., профессор кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии ФГБОУ ВО «Дальневосточный государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Хабаровск, Россия

Мелконян Г.Г. — заочный аспирант кафедры общей и клинической хирургии ФГБОУ ВО «Дальневосточный государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ; старший ординатор хирургического отделения ФГКУ «301 военный клинический госпиталь», г. Хабаровск, Россия

Коваль А.Н. — доцент кафедры общей и клинической хирургии ФГБОУ ВО «Дальневосточный государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ; врач-хирург отделения гнойной хирургии ФГКУ «301 военный клинический госпиталь», г. Хабаровск, Россия

Ташкинов Н.В. — д.м.н., профессор, заслуженный врач РФ, заведующий кафедрой общей и клинической хирургии ФГБОУ ВО «Дальневосточный государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Хабаровск, Россия

Рукина Н.Ю. — ассистент кафедры биологической химии и клинической лабораторной диагностики ФГБОУ ВО «Дальневосточный государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ; заведующая лабораторным отделением ФГКУ «301 военный клинический госпиталь», г. Хабаровск, Россия

Шокур О.А. — доцент кафедры школы биомедицины департамента фармации и фармакологии ФГАУ ВО «Дальневосточный федеральный университет», г. Владивосток, Россия

Сапожников Ю.А. — ассистент кафедры общей и клинической хирургии ФГБОУ ВО «Дальневосточный государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Хабаровск, Россия

Authors:

Solovyeva A.S., PhD, MD (Medicine), Professor, Department of Microbiology, Virology and Immunology Far Eastern State Medical University, Khabarovsk, Russian Federation

Melkonyan G.G., Postgraduate Student, Department of General and Clinical Surgery, Far Eastern State Medical University; Senior Resident, Surgical Department, 301st Military Clinical Hospital, Khabarovsk, Russian Federation

Koval A.N., Associate Professor, Department of General and Clinical Surgery, Far Eastern State Medical University; Surgeon, Department of Purulent Surgery, 301st Military Clinical Hospital, Khabarovsk, Russian Federation

Tashkinov N.V., PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Department of General and Clinical Surgery, Far Eastern State Medical University, Khabarovsk, Russian Federation

Rukina N.Yu., Assistant Professor, Department of Biological Chemistry and Clinical Laboratory Diagnostics, Far Eastern State Medical University; Head, Laboratory Department, 301st Military Clinical Hospital, Khabarovsk, Russian Federation

Shokur O.A., Associate Professor, School of Biomedicine, Department of Pharmacy and Pharmacology, Far Eastern Federal University, Vladivostok, Russian Federation

Sapozhnikov Yu.A., Assistant Professor, Department of General and Clinical Surgery, Far Eastern State Medical University, Khabarovsk, Russian Federation

Поступила 19.03.2021

Отправлена на доработку 17.12.2021

Принята к печати 24.02.2022

Received 19.03.2021

Revision received 17.12.2021

Accepted 24.02.2022

ОСОБЕННОСТИ ЦИТОКИНОВОГО ПРОФИЛЯ У ПОДРОСТКОВ С МИКРОСОСУДИСТЫМИ ОСЛОЖНЕНИЯМИ САХАРНОГО ДИАБЕТА 1-го ТИПА

**Левкович М.А., Галкина Г.А., Воропай А.А., Комкова М.В.,
Морозова Н.В., Кравченко Л.В., Крукиер И.И., Андреева В.О.,
Погорелова Т.Н.**

Научно-исследовательский институт акушерства и педиатрии ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Ростов-на-Дону, Россия

Резюме. Несмотря на достижения современной науки, серьезной проблемой в управлении сахарным диабетом 1-го типа (СД1) у детей и подростков является преодоление последствий, связанных с осложнениями данного заболевания. Быстрое развитие микрососудистых диабетических осложнений (ретинопатии, нейропатии, нефропатии) остается существенным препятствием в поддержании высокого качества жизни и социальной адаптации молодых пациентов, что позволяет обратиться к изучению иммунных механизмов, участвующих в процессах повреждения микроциркуляторного русла в условиях дисметаболических отклонений, сопутствующих СД1.

Цель работы – оценить роль нарушений цитокинового баланса в сыворотке крови в формировании микроангиопатий у подростков с СД1.

Обследовано 140 подростков с СД1 возраста 14-18 лет, которые были распределены на 2 группы: I группа – пациенты с уровнем гликированного гемоглобина (HbA1c) более 9% (n = 65), и II группа – подростки с уровнем HbA1C ≤ 9,0% (n = 75). Каждая группа была подразделена на подгруппы: Ia (n = 50), IIa (n = 38) – подростки с диабетической ретинопатией, нефропатией или нейропатией; Ib (n = 15), IIb (n = 37) – с неосложненным течением заболевания. Группу контроля составили 36 подростков с нормальной массой тела, без нарушений углеводного обмена и отягощенной по сахарному диабету наследственности. Определение уровней TNFα, IL-1β, VCAM-1, фракталкина в сыворотке крови проводили методом иммуноферментного анализа с использованием тест-систем RayBiotech (США), BIOSCIENCE (США).

Формирование микроангиопатий у подростков с различным уровнем гликемического контроля ассоциировано с повышением сывороточной концентрации медиаторов, вовлеченных в неоангиогенез и процессы ремоделирования сосудистой стенки: TNFα, IL-1β, VCAM-1, при сравнении с группой контроля (p < 0,05) и статистически значимым снижением фракталкина у всех подростков с осложненным и неосложненным течением СД1. Проведенное исследование позволило установить,

Адрес для переписки:

*Левкович Марина Аркадьевна
Научно-исследовательский институт акушерства
и педиатрии ФГБОУ ВО РостГМУ
344012, Россия, г. Ростов-на-Дону, ул. Мечникова, 43.
Тел.: 8 (918) 570-64-36.
E-mail: xlma@mail.ru*

Address for correspondence:

*Marina A. Levkovich
Research Institute of Obstetrics and Pediatrics Rostov
State Medical University
43 Mechnikov St
Rostov-on-Don
344012 Russian Federation
Phone: +7 (918) 570-64-36.
E-mail: xlma@mail.ru*

Образец цитирования:

*М.А. Левкович, Г.А. Галкина, А.А. Воропай,
М.В. Комкова, Н.В. Морозова, Л.В. Кравченко,
И.И. Крукиер, В.О. Андреева, Т.Н. Погорелова
«Особенности цитокинового профиля у подростков
с микрососудистыми осложнениями сахарного диабета
1 типа» // Медицинская иммунология, 2023. Т. 25, № 1.
С. 101-110. doi: 10.15789/1563-0625-FOT-2584*

© Левкович М.А. и соавт., 2023

Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

*M.A. Levkovich, G.A. Galkina, A.A. Voropai, M.V. Komkova,
N.V. Morozova, L.V. Kravchenko, I.I. Krukier,
V.O. Andreeva, T.N. Pogorelova "Features of the cytokine
profile in adolescents with microvascular complications of
type 1 diabetes mellitus", Medical Immunology (Russia)/
Meditsinskaya Immunologiya, 2023, Vol. 25, no. 1,
pp. 101-110. doi: 10.15789/1563-0625-FOT-2584*

© Levkovich M.A. et al., 2023

The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License

DOI: 10.15789/1563-0625-FOT-2584

что развитие микрососудистых осложнений у подростков с СД1 сопряжено с нарушением иммунного реагирования с тенденцией направленности цитокинового баланса по Th1-типу, усилением процессов межклеточного взаимодействия, дисбалансом биорегуляторных молекул и способствует формированию воспалительного режима иммунорегуляции.

Выявленные закономерности наряду с оценкой показателей метаболического контроля, позволят персонализировать подходы к ранней диагностике микрососудистых осложнений у подростков с СД1 и предотвратить их дальнейшую прогрессию.

Ключевые слова: цитокины, иммунные нарушения, микрососудистые осложнения, ранняя диагностика, сахарный диабет, подростки

FEATURES OF THE CYTOKINE PROFILE IN ADOLESCENTS WITH MICROVASCULAR COMPLICATIONS OF TYPE 1 DIABETES MELLITUS

Levkovich M.A., Galkina G.A., Voropai A.A., Komkova M.V., Morozova N.V., Kravchenko L.V., Krukier I.I., Andreeva V.O., Pogorelova T.N.

Research Institute of Obstetrics and Pediatrics Rostov State Medical University, Rostov-on-Don, Russian Federation

Abstract. Despite advances of modern medical science, the consequences associated with management of complications in type 1 diabetes mellitus (DM1) in children and adolescents represent a serious problem. Common development of microvascular diabetic complications (retinopathy, neuropathy, kidney damage) still remains a sufficient obstacle for achieving high quality of life and social adaptation in the young patients, thus promoting studies of immune mechanisms involved in genesis of microvasculature damage under the conditions of dysmetabolic abnormalities associated with DM1. Our goal was to assess the role of altered cytokine balance in blood serum in development of microangiopathies in adolescents with DM1.

140 adolescent patients with type 1 diabetes aged 14-18 years were examined being divided in 2 groups: group I included the patients with glycated hemoglobin (HbA1c) level of > 9.0% (n = 65), and group II which included adolescents with HbA1C level of ≤ 9.0% (n = 75). Each group was divided into subgroups: Ia (n = 50) and IIa (n = 38) included adolescents with diabetic retinopathy, nephropathy or neuropathy, whereas groups Ib (n = 15) and IIb (n = 37) were without microvascular complications. The control group consisted of 36 adolescents with normal body weight, without carbohydrate metabolic disorders, and family history of diabetes mellitus. Determination of TNF α , IL-1 β , VCAM-1, fractalkine levels in blood serum was performed by enzyme immunoassay using test systems "RayBiotech" (USA), "BIOSCIENCE" (USA).

Development of microangiopathies in adolescents with different glycemic control is associated with increased serum concentration of the factors involved in neoangiogenesis and vascular wall remodeling, i.e., TNF α , IL-1 β , VCAM-1, compared with control group (p < 0.05), and a statistically significant decrease in fractalkine level in adolescent patients with either complicated, or uncomplicated DM1. The study allowed us to suggest that occurrence of microvascular complications in adolescents with DM1 is associated with impaired immune response tending for altered cytokine balance towards Th1 type, enhanced intercellular interactions, imbalance of bioregulatory molecules, contributing to development of inflammatory immunoregulatory state.

The revealed patterns of laboratory markers, along with assessment of metabolic indices, will enable personalized approaches to early diagnostics of microvascular complications in adolescents with DM1 and prevent their further progression.

Keywords: cytokines, immune disorders, microvascular complications, early diagnosis, diabetes mellitus, adolescents

Введение

Несмотря на достижения современной педиатрии, инновационные методы контроля и лечения заболевания, быстрое развитие микрососудистых диабетических осложнений (ретинопатии, нейропатии, нефропатии), начало

которых приходится на подростковый возраст, остается серьезной проблемой в управлении СД1 [1]. Общие механизмы повреждения микроциркуляторного русла различных органов и тканей, полиэтиологичность, системный характер указанных нарушений позволяют рассматривать

микрососудистые осложнения, как звенья одного патологического процесса, в котором значимая роль отводится не только комплексу метаболических отклонений, основным из которых является высокая вариабельность глюкозы и хроническая гипергликемия, а также нарушениям иммунного реагирования и генетическим аспектам [23].

Длительное малосимптомное течение указанных нарушений у детей, непостоянный характер выявленных отклонений позволяют обратиться к изучению иммунных механизмов, участвующих как в инициации инсулинозависимого сахарного диабета, так и в процессах повреждения микроциркуляторного русла, которые, по современным представлениям, имеют системный иммуновоспалительный характер.

Ассоциированное с СД1 избыточное образование продуктов дисметаболизма, таких как конечные продукты гликирования белков, окисленные липопротеиды, не только нарушают функционирование органелл, но и сопровождаются активацией паттерн-распознающих рецепторов врожденного звена иммунитета [26], запускают каскад внутриядерных реакций транскрипции генов, с последующей индукцией синтеза цитокинов – фактора некроза опухоли- α (TNF α) и интерлейкина-1 β (IL-1 β), что приводит к формированию иммунного ответа по Th1-типу [3, 8]. Цитокины, являясь медиаторами межклеточного и межсистемного взаимодействия, отвечают за направленность и силу иммунного ответа, осуществляют связь с другими системами организма [11]. Обладая плейотропными эффектами, цитокины также контролируют процессы дифференцировки, функциональной активности и апоптоза клеток-мишеней, оказывают прямое цитотоксическое действие на эндотелиоциты. С этих позиций, исследования, направленные на разработку методов ранней диагностики микрососудистых осложнений с использованием инноваций в области иммунологии, имеют приоритетное значение для повышения эффективности мониторинга молодых пациентов с СД1 и снижения медико-социального ущерба вследствие их развития.

Цель исследования – оценить роль нарушений цитокинового баланса в сыворотке крови в формировании микроангиопатий у подростков с СД1.

Материалы и методы

Для реализации поставленной цели было обследовано 140 подростков с СД1 возраста 14-18 лет (59 юношей и 81 девушка) и 36 подростков

с нормальной массой тела, без нарушений углеводного обмена и отягощенной по сахарному диабету (СД) наследственности, которые составили группу контроля. Критериями включения в исследования явились: установленный диагноз «СД1», длительность заболевания и продолжительность инсулинотерапии более 6 месяцев, наличие информированного согласия на участие в протоколе исследования. К критериям исключения были отнесены: сахарный диабет не 1-го типа (СД 2 типа, моногенные формы СД, вторичный, СД в составе генетических синдромов), обострение хронических очагов инфекции или острые воспалительные заболевания, наличие тяжелых кетоацидотических и/или гипогликемических состояний на момент исследования, беременность, психические расстройства. Протокол исследования одобрен локальным независимым этическим комитетом ФГБОУ ВО РостГМУ Минздрава России.

Пациенты с сахарным диабетом получали инсулинотерапию в двух возможных режимах: множественные инъекции инсулина и постоянная подкожная инфузия инсулина с помощью инсулиновых дозаторов фирм Medtronic (США) и Roche Diagnostics Rus (Германия). В терапии СД1 использовались генно-инженерные аналоги инсулина ультракороткого (Аспарт (Новорапид), NovoNordisk, Дания), Лизпро (Хумалог), Eli Lilly, США) и пролонгированного (Детемир (Левемир), Novo Nordisk, Дания, Гларгин (Лантус), Aventis, Франция) действия.

Согласно дизайну исследования в зависимости от уровня гликемического контроля подростки с СД1 были распределены на II группы: I группа – пациенты с уровнем гликированного гемоглобина (HbA1c) более 9% (декомпенсация заболевания) (n = 65), и II группа – подростки с уровнем HbA1C менее или равным 9,0% (n = 75). В свою очередь, группы были подразделены на подгруппы: Ia (n = 50), IIa (n = 38) – подростки с верифицированными микрососудистыми нарушениями: диабетической ретинопатией, нефропатией и нейропатией; Ib (n = 15), IIb (n = 37) – с неосложненным течением заболевания.

Помимо общеклинических анализов для оценки метаболического контроля СД1, уровня компенсации заболевания по критерию HbA1c с учетом измерений глюкозы крови в течение дня (9 раз) и расчетом индексов вариабельности глюкозы, всем подросткам с СД1 проводился комплекс исследований, направленных на верификацию начальных стадий диабетической ретинопатии, нейропатии и нефропатии. Скрининг

микрососудистых осложнений осуществлялся в соответствии с критериями, представленными в клинических рекомендациях «Сахарный диабет 1-го типа у детей», 2019.

Иммунологическое исследование включало определение уровней фактора некроза опухоли- α TNF α , интерлейкина-1 β (IL-1 β), молекулы адгезии сосудистого эндотелия-1 (VCAM-1), фракталикина в сыворотке крови методом иммуноферментного анализа с использованием тест-систем RayBiotech (США), BIOSCIENCE (США). Учет реакции проводили на многофункциональном программируемом счетчике для иммунологических исследований с компьютером и программным обеспечением 1420 MultilabelCounterVictor (Финляндия) (фотометр SUNRISE TECAN (Австрия)).

Для расчета статистической обоснованности различий исследуемых групп по содержанию цитокинов в сыворотке крови применялся критерий Манна–Уитни для независимых групп, при максимально допустимом уровне ошибки первого рода $p = 0,05$. Показатели описательной статистики представлены в виде медианы и интерквартильного размаха – Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$). Для анализа различия частот в двух независимых группах применялся точный критерий Фишера–Ирвина, с учетом поправки Йетса для парных сравнений. Теснота связи отдельных показателей оценивалась с использованием коэффициент корреляции по Спирмену.

Результаты

Проведенное исследование позволило выявить высокую частоту начальных признаков микроангиопатий у подростков как с декомпен-

сацией заболевания (76,9%), так и с уровнем HbA1c $\leq 9,0\%$ (50,7%). Диабетическая нейропатия регистрировалась в I группе в 43,1% случаев, во II – в 33,4%, начальная стадия непролиферативной диабетической ретинопатии, согласно классификации ETDRS, 1991 г. отмечена у 43,1% подростков в I группе и у 30,7% – во II группе. Диабетическая нефропатия в стадии микроальбуминурии установлена у 20,0% пациентов в I и у 9,3% обследованных во II группе.

Формирование микроангиопатий у подростков с различным уровнем HbA1c ассоциировано с изменением сывороточной концентрации практически всех изучаемых медиаторов, вовлеченных в неоангиогенез и процессы ремоделирования сосудистой стенки при различной кардиоваскулярной патологии.

TNF α , универсальный воспалительный медиатор, запускает последовательность биологических событий, кульминацией которых является апоптоз эндотелиальных клеток сосудов [14], лежащий в основе гистопатологических изменений при диабетической ретинопатии, нефропатии, нейропатии.

У пациентов с декомпенсацией СД1 и здоровых подростков отмечались статистически значимые различия сывороточного содержания TNF α . В Ia подгруппе содержание TNF α составило 67,7 (6,8-358,7) пг/мл, что в 8,6 раза превышало показатели группы сравнения ($p < 0,05$) и в 8,2 раза значения у подростков I группы без осложнений ($p > 0,05$). У пациентов Ib, IIa, IIb подгрупп и контрольной группы выявлены сопоставимые уровни TNF α (табл. 1).

Модулирующее влияние IL-1 β на врожденный и адаптивный иммунитет рассматривает-

ТАБЛИЦА 1. СОДЕРЖАНИЕ ЦИТОКИНОВ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ У ПАЦИЕНТОВ ИЗУЧАЕМЫХ ГРУПП

TABLE 1. CONTENT OF CYTOKINES IN BLOOD SERUM IN PATIENTS OF THE GROUPS

Показатели, пг/мл Parameters pg/mL	Клинические группы Clinical groups				Контроль Control (n = 36)
	I (n = 65)		II (n = 75)		
	Ia (n = 50)	Ib / Ib (n = 15)	IIa (n = 38)	IIb / IIb (n = 37)	
TNF α	67,7 (6,8-358,7)*	8,3 (3,5-177,8)	9,1 (6,2-180,3)	7,2 (5,9-18,6)	7,9 (4,8-35,6)
IL-1 β	1,7 (0,8-11,4)*	0,7 (0,6-2,2)	2,7 (0,9-13,2)* Δ	1,3 (0,9-2,0)	0,9 (0,7-2,0)

Примечание. * – статистически значимые различия по сравнению с контрольной группой ($p < 0,05$). Δ – статистически значимые различия при сравнении IIa и IIb подгрупп ($p < 0,05$).

Note. *, statistically significant differences compared to the control group ($p < 0.05$). Δ , statistically significant differences compared to the control group ($p < 0.05$).

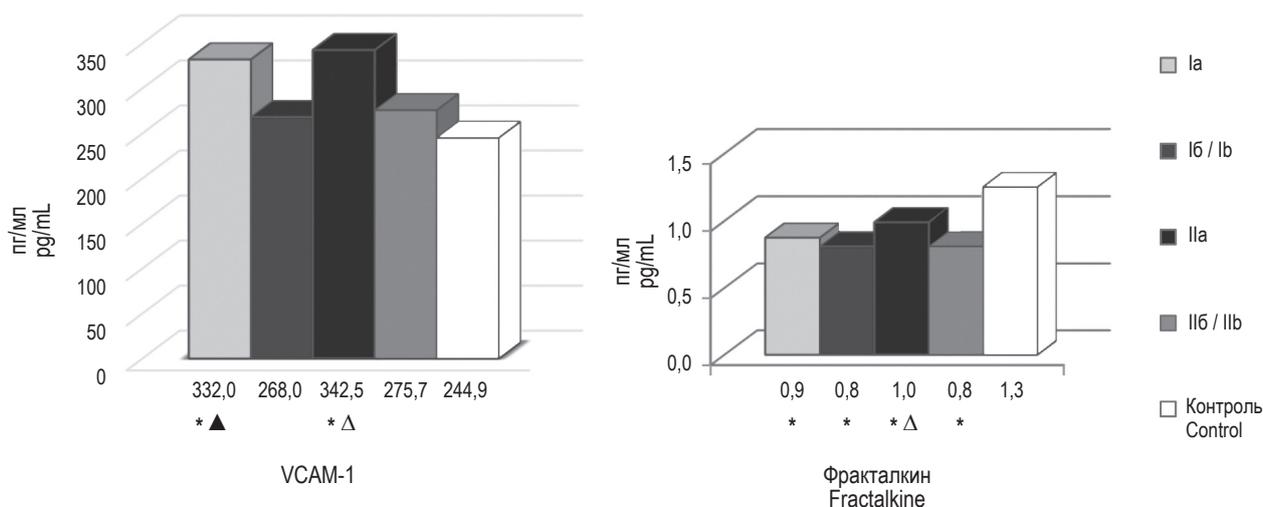


Рисунок 1. Содержание VCAM-1 и фракталкина у пациентов изучаемых групп

* – статистически значимые различия по сравнению с контрольной группой ($p < 0,05$). ▲ – статистически значимые различия при сравнении Ia и Ib подгрупп ($p < 0,05$). Δ – статистически значимые различия при сравнении IIa и IIб подгрупп ($p < 0,05$).

Figure 1. Content of VCAM-1 and fractalkine in patients of the groups

Note. *, statistically significant differences compared to the control group ($p < 0.05$). ▲, statistically significant differences when comparing Ia and Ib subgroups ($p < 0.05$). Δ, statistically significant differences compared when comparing IIa and IIb subgroups ($p < 0.05$).

ся в качестве потенциальной интервенционной мишени при аутоиммунном сахарном диабете у пациентов с недавней манифестацией СД1 и не-продолжительным стажем заболевания [7].

Вместе с тем в литературе имеются сообщения о зависимости содержания ИЛ-1β в сыворотке крови от степени компенсации углеводного, липидного обмена и наличия сосудистых осложнений, что указывает на возможность его использования в качестве маркера диабетической микроангиопатии у пациентов с СД1 [2, 24]. Анализ содержания ИЛ-1β продемонстрировал более высокие его показатели у подростков обеих групп с осложненным течением заболевания, по сравнению со сверстниками группы контроля. Наибольшее значение ИЛ-1β зафиксировано у обследуемых во IIa подгруппе, при этом статистически значимые различия обнаружены, как при сопоставлении со здоровыми лицами, так и у подростков с осложненным и неосложненным течением СД1 во II группе ($p < 0,05$).

Информативным маркером активации эндотелия при различной васкулярной патологии служит молекула сосудистой адгезии VCAM-1, которая в условиях гомеостатического равновесия у здорового человека не обнаруживается, в то время как экспрессия VCAM-1 резко увеличивается при повреждении эндотелиальной выстилки [10]. Обращает на себя внимание градиентное этапное увеличение экспрессии VCAM-1 в сы-

воротке крови у подростков с СД1 обеих групп без осложнений при сравнении с их здоровыми сверстниками, и дальнейшее возрастание у пациентов I и II групп с осложненным течением заболевания уровня молекулы адгезии, статистически значимо превышающего показатели как группы контроля, так Ib и IIб подгрупп (пациенты с СД1 без микроангиопатий) (рис. 1).

Особого внимания заслуживают полученные в ходе исследования данные о вариационных колебаниях уровня фракталкина у подростков с СД1. В нашей работе у пациентов 14-18 лет с СД1 вне зависимости от уровня HbA1c и наличия осложнений была отмечена статистически значимо более низкая концентрация фракталкина в сыворотке крови, чем у обследуемых группы контроля ($p < 0,01$). Вместе с тем в обеих группах подростки с СД1, имеющие микрососудистые осложнения, при сравнении со сверстниками с неосложненным течением продемонстрировали умеренный рост сывороточного содержания фракталкина, при этом значимые статистические различия были достигнуты только во II группе.

Обсуждение

Представленная в работе клинико-иммунологическая характеристика подростков изучаемых групп позволила подтвердить гипотезу о наличии дополнительных факторов, помимо метабо-

лических, оказывающих существенное влияние на сроки формирования и особенности течения микроваскулярных осложнений, ассоциированных с СД1.

Рассматриваемые в нашей работе цитокины, согласно литературным данным, играют ключевую роль в альтерации сосудистой стенки при различных патологиях, ассоциированных с кардиоваскулярными событиями, однако их комплексное изучение у подростков с СД1 ранее не проводилось [20]. В то же время изолированное действие иммунных медиаторов имеет ограниченные эффекты, с точки зрения регуляции гемодинамических показателей, сосудистого тонуса, процессов адгезии, пролиферации эндотелиоцитов, что делает необходимым одномоментное исследование цитокинов, факторов роста, биорегуляторных молекул, проявляющих синергизм в аспекте прогрессирования заболевания и их осложнений.

Задолго до появления явных осложнений в условиях гипергликемии и дислипидемии инфильтрация капилляров воспалительными клетками инициируется стимулирующим действием TNF α на экспрессию адгезивных молекул, а также ангиогенных и фиброгенных факторов, способствующих разрушению эндотелиальных клеточных соединений, потере гистогематических барьеров, что создает иммунологическую базу для формирования эндотелиальной дисфункции [9, 15, 19]. Наблюдаемое в данной работе резкое увеличение сывороточного уровня TNF α у подростков I группы с микрососудистыми осложнениями относительно пациентов с неосложненным течением и здоровых сверстников, а также наличие положительной корреляции TNF α с уровнем HbA1c ($r = 0,76$, $p = 0,028$) отражает выраженность метаболических сдвигов [11] и повышает риски развития микрососудистых осложнений у пациентов с неудовлетворительным гликемическим контролем СД1 [5, 18].

Действуя совместно с TNF α , IL-1 β определяет направленность иммунного ответа по Th1-типу, обуславливая провоспалительный режим иммунного реагирования. Согласно сообщениям в актуальной литературе возрастание сывороточного содержания IL-1 β у больных с СД1 ассоциировано с ремоделированием сосудистой стенки, аккумуляцией конечных продуктов гликирования в тканях и на базальной мембране [6], усилением перекисного окисления липидов эндотелиальной дисфункцией. Установленное значимое увеличение уровня IL-1 β в сыровотке крови у пациентов с микроангиопатиями до 1,7 (0,8-11,4) пг/мл в

I группе и до 2,7 (0,9-13,2) пг/мл во II группе против 0,9 (0,7-2,0) пг/мл у пациентов группы контроля позволяет рассматривать данный медиатор в качестве пускового фактора развития микрососудистых нарушений при СД1.

Эндотелиальные клетки чрезвычайно чувствительны к гиперцитокинемии, особенно к IL-1 β и TNF α , которые, в свою очередь, индуцируют образование локальных регуляторных субстанций и молекул адгезии, таких как VCAM-1.

Известно, что функциональная роль VCAM-1 заключается в обеспечении надежного взаимодействия циркулирующих в кровотоке лейкоцитов, макрофагов и эндотелиоцитов, что приводит к окклюзии просвета микрососудов сетчатки, почек [21]. Локальное скопление моноцитов и гранулоцитов ответственно за капиллярный лейкостаз, который механически блокирует кровоток и увеличивает ишемию прилежащих тканей. В условиях гипоксии чрезмерная продукция ростовых факторов с последующим неадекватным ангиогенезом, образованием патологических хрупких сосудов не способствует восстановлению перфузии в области очага, а, напротив, ассоциирована с нарушением сосудистой архитектоники, утолщением базальной мембраны, увеличение капиллярной проницаемости, формированием микроаневризм, геморрагий и, как следствие, повреждением органов-мишеней.

Принимая во внимание однонаправленные изменения содержания VCAM-1 у подростков с различной компенсацией СД1, его связь с апоптозом [13], исследование сывороточной концентрации VCAM-1 может быть полезным для верификации пациентов высокого риска раннего формирования микрососудистых осложнений у подростков с СД1. Установленные сильные корреляционные связи между маркером сосудистой активации VCAM-1 и TNF α ($r = 0,88$, $p = 0,004$) подтверждают существование многоуровневой кооперации компонентов иммунной системы – завершающейся повреждением микроциркуляторного русла еще до возникновения устойчивых морфологических aberrаций.

Изучение фракталкина у пациентов с формирующимися микроангиопатиями при СД имеет ключевое значение ввиду его способности поддерживать иммуновоспалительные реакции в сосудистой стенке путем влияния на адгезию и направленное движение моноцитов в зону поражения, сосудистый тонус и патологическую трансформацию архитектоники капилляров [17]. Тем не менее анализ фракталкина в когорте детей и подростков с СД1 ранее не проводил-

ся. В нашем исследовании у всех подростков с СД1 отмечено стойкое снижение концентрации этого хемокина ($p < 0,01$) относительно здоровых сверстников при незначительном его повышении у пациентов с осложненным течением СД1 во II группе. Анализ актуальной литературы позволил говорить о реверсивном характере функционирования данного хемокина, обусловленного с одной стороны существованием двух различных форм данной молекулы: растворимой и мембрансвязанной, с другой – зависимостью характера взаимодействия от локального микроокружения с другими цитокинами [4, 27]. Обнаруживаясь в здоровой поджелудочной железе, фракталкин предотвращает $TNF\alpha$ опосредованный апоптоз β -клеток [25], что подтверждается в нашей работе установленной обратной корреляционной зависимостью между данными цитокинами ($r = -0,423$, $p = 0,028$). Более того, фракталкин нашел применение в клинических испытаниях как средство, улучшающее функционирование β -клеток и чувствительность к инсулину периферических тканей [16, 22]. С другой стороны, экспрессия хемокина на активированных эндотелиальных, гладкомышечных клетках и макрофагах в ответ на стимуляцию $TNF\alpha$ и

$IL-1\beta$ определяет его адгезивные свойства, облегчает перемещение моноцитов, лейкоцитов в ткани и его провоспалительные эффекты [12]. Таким образом, выявленные особенности фракталкина у молодых пациентов с СД1 требуют его дальнейшего изучения с целью разработки таргетной терапии как самого заболевания, так и ассоциированных с ним осложнений.

Заключение

Проведенное исследование позволило установить, что формирование микрососудистых осложнений у подростков с сахарным диабетом, определяет соответствующий характер иммунного реагирования с тенденцией направленности цитокинового баланса по Th1-типу, усилением процессов межклеточного взаимодействия, дисбалансом биорегуляторных молекул и способствует формированию воспалительного режима иммунорегуляции. Выявленные закономерности наряду с оценкой показателей метаболического контроля, позволят персонифицировать подходы к ранней диагностике микрососудистых осложнений у подростков с СД1 и предотвратить их дальнейшую прогрессию.

Список литературы / References

1. Безлепкина О.Б. Детская эндокринологическая служба в Российской Федерации: современное состояние и перспективы развития // Проблемы эндокринологии, 2020. Т. 66, № 5. С. 4-6 [Bezlepikina O.B. Children's endocrinological service in the Russian Federation: current state and development prospects. *Problemy endokrinologii = Problems of Endocrinology*, 2020, Vol. 66, no. 5, pp. 4-6. (In Russ.)]
2. Воропай А.А., Левкович М.А., Галкина Г.А. Предикторы раннего развития микрососудистых осложнений у подростков с сахарным диабетом 1 типа // Аллергология и иммунология, 2017. Т. 18, № 1. С. 59-60. [Voropay A.A., Levkovich M.A., Galkina G.A. Predictors of early development of microvascular complications in adolescents with type 1 diabetes mellitus. *Allergologiya i immunologiya = Allergology and Immunology*, 2017, Vol. 18, no. 1, pp. 59-60. (In Russ.)]
3. Казмирчук В.Е., Ковальчук Л.В., Мальцев Д.В. Клиническая иммунология и аллергология. К.: Феникс, 2009. 524 с. [Kazmirchuk V.E., Kovalchuk L.B., Maltsev D.V. Clinical immunology and allergology]. Kiev: Feniks, 2009. 524 p.
4. Меснянкина О.А., Янчевская Е.Ю., Бен М. Фракталкин: патогенетическая роль и диагностические возможности // Кубанский научный медицинский вестник, 2017. Т. 1, № 2. С. 148-151. [Mesnyankina O.A., Yanchevskaya E.Y., Ben M. Fractalkine: pathogenic role and diagnostic capabilities. *Kubanskiy nauchnyy meditsinskiy vestnik = Kuban Scientific Medical Bulletin*, 2017, Vol. 1, no. 2, pp. 148-151. (In Russ.)]
5. Саприна Т.В., Прохоренко Т.С., Лазаренко Ф.Э., Ворожцова И.Н., Рязанцева Н.В. Взаимосвязь иммунологических и метаболических факторов в развитии и прогрессировании микроангиопатий при латентном аутоиммунном диабете взрослых (LADA) // Бюллетень сибирской медицины, 2014. Т. 13, № 1. С. 73-78. [Saprina T.V., Prokhorenko T.S., Lazarenko F.E., Vorozhtsova I.N., Ryazantseva N.V. Immunological and metabolic factors interaction in the development and progression of microvascular complications in latent autoimmune diabetes of adults (LADA). *Byulleten sibirskoy meditsiny = Bulletin of Siberian Medicine*, 2014, Vol. 13, no. 1, pp. 73-78. (In Russ.)]

6. Accacha S., Rosenfeld W., Jacobson A., Michel L., Schnurr F.J., Shelov S., Ten S., Boucher-Berry C., Carey D.E., Speiser P.W., Lowell B., Conroy R., Klein M., Fennoy I., Rapaport R., Rosenbaum M. Plasma advanced glycation end products (AGEs), receptors for AGEs and their correlation with inflammatory markers in middle school-age children. *Horm. Res. Paediatr.*, 2013, Vol. 80, no. 5, pp. 318-327.
7. Cabrera S.M., Wang X., Chen Y.G., Jia S., Kaldunski M.L., Greenbaum C.J.; Type 1 Diabetes TrialNet Canakinumab Study Group, Mandrup-Poulsen T; AIDA Study Group, Hessner MJ. Interleukin-1 antagonism moderates the inflammatory state associated with Type 1 diabetes during clinical trials conducted at disease onset. *Eur. J. Immunol.*, 2016, Vol. 46, no. 4, pp. 1030-1046.
8. Degirmenci I., Ozbayer C., Kebapci M.N., Kurt H., Colak E., Gunes H.V. Common variants of genes encoding TLR4 and TLR4 pathway members TIRAP and IRAK1 are effective on MCP1, IL6, IL1 β , and TNF α levels in type 2 diabetes and insulin resistance. *Inflamm. Res.*, 2019, Vol. 68, no. 9, pp. 801-814.
9. Domingueti C.P., Fóscolo R.B., Reis J.S., Campos F.M., Dusse L.M., Carvalho M.d., Braga Gomes K., Fernandes A.P. Association of Haemostatic and Inflammatory Biomarkers with Nephropathy in Type 1 Diabetes Mellitus. *J. Diabetes Res.*, 2016, Vol. 2016, 2315260. doi: 10.1155/2016/2315260.
10. Edlinger C., Lichtenauer M., Wernly B., Pistulli R., Paar V., Proding C., Krizanic F., Thieme M., Kammler J., Jung C., Hoppe U.C., Schulze P.C., Kretzschmar D. Disease-specific characteristics of vascular cell adhesion molecule-1 levels in patients with peripheral artery disease. *Heart Vessels*, 2019, Vol. 34, no. 6, pp. 976-983.
11. Fatima N., Faisal S.M., Zubair S., Ajmal M., Siddiqui S.S., Moin S., Owais M. Role of pro-inflammatory cytokines and biochemical markers in the pathogenesis of type 1 Diabetes: Correlation with Age and Glycemic Condition in Diabetic Human Subjects. *PLoS One*, 2016, Vol. 11, no. 8, e0161548. doi: 10.1371/journal.pone.0161548.
12. Imai T., Yasuda N. Therapeutic intervention of inflammatory/immune diseases by inhibition of the fractalkine (CX3CL1)-CX3CR1 pathway. *Inflamm. Regen.* 2016, Vol. 36, 9. doi: 10.1186/s41232-016-0017-2.
13. Jia Y., Xu H., Yu Q., Tan L., Xiong Z. Identification and verification of vascular cell adhesion protein 1 as an immune-related hub gene associated with the tubulointerstitial injury in diabetic kidney disease. *Bioengineered*, 2021, Vol. 12, no. 1, pp. 6655-6673.
14. Jousen A.M., Doehmen S., Le M.L., Koizumi K., Radetzky S., Krohne T.U., Poulaki V., Semkova I., Kociok N. TNF- α mediated apoptosis plays an important role in the development of early diabetic retinopathy and long-term histopathological alterations. *Mol. Vis.*, 2009, Vol. 15, pp. 1418-1428.
15. Medica D., Franzin R., Stasi A., Castellano G., Migliori M., Panichi V., Figliolini F., Gesualdo L., Camussi G., Cantaluppi V. Extracellular vesicles derived from endothelial progenitor cells protect human glomerular endothelial cells and podocytes from complement- and cytokine-mediated injury. *Cells*, 2021, Vol. 10, no. 7, 1675. doi: 10.3390/cells10071675.
16. Mendiola A.S., Garza R., Cardona S.M., Mythen S.A., Lira S.A., Akassoglou K., Cardona A.E. Fractalkine signaling attenuates perivascular clustering of microglia and fibrinogen leakage during systemic inflammation in mouse models of diabetic retinopathy. *Front. Cell. Neurosci.*, 2017, Vol. 10, 303. doi: 10.3389/fncel.2016.00303.
17. Mizutani N., Sakurai T., Shibata T., Uchida K., Fujita J., Kawashima R., Kawamura Y.I., Toyama-Sorimachi N., Imai T., Dohi T. Dose-dependent differential regulation of cytokine secretion from macrophages by fractalkine. *J. Immunol.*, 2007, Vol. 179, no. 11, pp. 7478-7487.
18. Mu Z.P., Wang Y.G., Li C.Q., Lv W.S., Wang B., Jing Z.H., Song X.J., Lun Y., Qiu M.Y., Ma X.L. Association between tumor necrosis Factor- α and Diabetic Peripheral Neuropathy in Patients with Type 2 Diabetes: a Meta-Analysis. *Mol. Neurobiol.*, 2017, Vol. 54, no. 2, pp. 983-996.
19. Myśliwska J., Ryba-Stanisławowska M., Smardzewski M., Słomiński B., Myśliwiec M., Siebert J. Enhanced apoptosis of monocytes from complication-free juvenile-onset diabetes mellitus type 1 may be ameliorated by TNF- α inhibitors. *Mediators Inflamm.* 2014, Vol. 2014, 946209. doi: 10.1155/2014/946209.
20. Pestana R.M., Domingueti C.P., Duarte R.C., Fóscolo R.B., Reis J.S., Rodrigues A.M., Martins L.B., Sousa L.P., Lage D.P., Ferreira C.N., Ferreira A.V., Fernandes A.P., Gomes K.B. Cytokines profile and its correlation with endothelial damage and oxidative stress in patients with type 1 diabetes mellitus and nephropathy. *Immunol. Res.*, 2016, Vol. 64, no. 4, pp. 951-960.
21. Ramírez R., Carracedo J., Merino A., Soriano S., Ojeda R., Alvarez-Lara M.A., Martín-Malo A., Aljama P. CD14⁺CD16⁺ monocytes from chronic kidney disease patients exhibit increased adhesion ability to endothelial cells. *Contrib. Nephrol.*, 2011, Vol. 171, pp. 57-61.
22. Riopel M., Seo J.B., Bandyopadhyay G.K., Li P., Wollam J., Chung H., Jung S.R., Murphy A., Wilson M., de Jong R., Patel S., Balakrishna D., Bilakovics J., Fanjul A., Plonowski A., Koh D.S., Larson C.J., Olefsky J.M., Lee Y.S. Chronic fractalkine administration improves glucose tolerance and pancreatic endocrine function. *J. Clin. Invest.*, 2018, Vol. 128, no. 4, pp. 1458-1470.

23. Ristikj-Stomnaroska D., Risteska-Nejashmikj V., Papazova M. Role of Inflammation in the Pathogenesis of Diabetic Peripheral Neuropathy. *Open Access Maced. J. Med. Sci.*, 2019, Vol. 7, no. 14, pp. 2267-2270.
24. Rolfes V., Ribeiro L.S., Hawwari I., Böttcher L., Rosero N., Maasewerd S., Santos M.L.S., Próchnicki T., Silva C.M.S., Wanderley C.W.S., Rothe M., Schmidt S.V., Stunden H.J., Bertheloot D., Rivas M.N., Fontes C.J., Carvalho L.H., Cunha F.Q., Latz E., Arditi M., Franklin B.S. Platelets fuel the inflammasome activation of innate immune cells. *Cell Rep.*, 2020, Vol. 31, no. 6, 107615. doi: 10.1016/j.celrep.2020.107615.
25. Rutti S., Arous C., Schvartz D., Timper K., Sanchez J.C., Dermitzakis E., Donath M.Y., Halban P.A., Bouzakri K. Fractalkine (CX3CL1), a new factor protecting β -cells against TNF α . *Mol. Metab.*, 2014, Vol. 3, no. 7, pp. 731-741.
26. Voropai A.A., Levkovich M.A., Galkina G.A., Komkova M.V., Morozova M.V. Role of TLR2, TLR4 gene polymorphism in developing microvascular complications in adolescents with type 1 diabetes mellitus. *Medical Immunology (Russia)*, 2021, Vol. 23, no. 4, pp. 895-902. doi: 10.15789/1563-0625-ROT-2271.
27. Zhuang Q., Cheng K., Ming Y. CX3CL1/CX3CR1 axis, as the therapeutic potential in renal diseases: friend or foe? *Curr. Gene Ther.*, 2017, Vol. 17, no. 6, pp. 442-452.

Авторы:

Левкович М.А. — д.м.н., доцент, ведущий научный сотрудник отдела аллергических и аутоиммунных заболеваний в педиатрии, Научно-исследовательский институт акушерства и педиатрии ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Ростов-на-Дону, Россия

Галкина Г.А. — д.м.н., профессор кафедры эндокринологии (с курсом детской эндокринологии) ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ; заведующая эндокринологическим отделением, Научно-исследовательский институт акушерства и педиатрии ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Ростов-на-Дону, Россия

Воропай А.А. — врач — детский эндокринолог, Научно-исследовательский институт акушерства и педиатрии ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Ростов-на-Дону, Россия

Комкова М.В. — к.м.н., врач — детский эндокринолог, Научно-исследовательский институт акушерства и педиатрии ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Ростов-на-Дону, Россия

Морозова Н.В. — к.м.н., врач — детский эндокринолог, Научно-исследовательский институт акушерства и педиатрии ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Ростов-на-Дону, Россия

Authors:

Levkovich M.A., PhD, MD (Medicine), Associate Professor, Leading Research Associate, Department of Allergic and Autoimmune Diseases in Pediatrics, Research Institute of Obstetrics and Pediatrics, Rostov State Medical University, Rostov-on Don, Russian Federation

Galkina G.A., PhD, MD (Medicine), Professor, Department of Endocrinology (with a Course in Pediatric Endocrinology), Rostov State Medical University; Head, Department of Endocrinology, Research Institute of Obstetrics and Pediatrics, Rostov State Medical University, Rostov-on Don, Russian Federation

Voropai A.A., Pediatric Endocrinologist, Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education, Rostov State Medical University, Research Institute of Obstetrics and Pediatrics, Rostov State Medical University, Rostov-on Don, Russian Federation

Komkova M.V., PhD (Medicine), Pediatric Endocrinologist, Research Institute of Obstetrics and Pediatrics, Rostov State Medical University, Rostov-on Don, Russian Federation

Morozova N.V., PhD (Medicine), Pediatric Endocrinologist, Research Institute of Obstetrics and Pediatrics, Rostov State Medical University, Rostov-on Don, Russian Federation

Кравченко Л.В. — д.м.н., ведущий научный сотрудник педиатрического отдела, Научно-исследовательский институт акушерства и педиатрии ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Ростов-на-Дону, Россия

Крукиер И.И. — д.б.н., ведущий научный сотрудник акушерско-гинекологического отдела, Научно-исследовательский институт акушерства и педиатрии ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Ростов-на-Дону, Россия

Андреева В.О. — д.м.н., главный научный сотрудник акушерско-гинекологического отдела, Научно-исследовательский институт акушерства и педиатрии ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Ростов-на-Дону, Россия

Погорелова Т.Н. — д.б.н., главный научный сотрудник акушерско-гинекологического отдела, Научно-исследовательский институт акушерства и педиатрии ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Ростов-на-Дону, Россия

Kravchenko L.V., PhD, MD (Medicine), Leading Research Associate, Pediatric Department, Research Institute of Obstetrics and Pediatrics, Rostov State Medical University, Rostov-on Don, Russian Federation

Krukier I.I., PhD, MD (Biology), Leading Research Associate, Obstetrics and Gynecology Department, Research Institute of Obstetrics and Pediatrics, Rostov State Medical University, Rostov-on Don, Russian Federation

Andreeva V.O., PhD, MD (Medicine), Chief Research Associate, Obstetrics and Gynecology Department, Research Institute of Obstetrics and Pediatrics, Rostov State Medical University, Rostov-on Don, Russian Federation

Pogorelova T.N., PhD, MD (Biology), Chief Research Associate, Obstetrics and Gynecology Department, Research Institute of Obstetrics and Pediatrics, Rostov State Medical University, Rostov-on Don, Russian Federation

Поступила 19.09.2022
Отправлена на доработку 12.10.2022
Принята к печати 08.11.2022
Дата онлайн-публикации 14.11.2022

Received 19.09.2022
Revision received 12.10.2022
Accepted 08.11.2022
Date of publication online 14.11.2022

ДИНАМИКА ПОКАЗАТЕЛЕЙ ЦИТОКИНОВОГО СТАТУСА СЫВОРОТКИ КРОВИ У ПОДРОСТКОВ С ВАРИКОЦЕЛЕ

Пичугова С.В., Лагерева Ю.Г., Бейкин Я.Б.

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

ГАУЗ Свердловской области «Клинико-диагностический центр город Екатеринбург», г. Екатеринбург, Россия

Резюме. Варикоцеле – это варикозное расширение вен лозовидного сплетения яичка, рассматривается как частный случай флебопатии. При варикоцеле происходит нарушение венозного оттока по левой почечной вене из вен лозовидного сплетения яичка, повышение гидростатического давления приводит к несостоятельности тонуса стенки яичковой вены, развивается клапанная венозная недостаточность и дилатация венозной системы. Вазодилатация требует целостности эндотелиального слоя, а его повреждение в результате гидродинамического стресса является пусковым механизмом развития воспалительной реакции и продукции цитокинов. Провоспалительные цитокины оказывают выраженное повреждающее действие на эндотелиальные клетки, приводя к формированию эндотелиальной дисфункции и хронического воспаления. Ангиогенез является важной характеристикой воспалительных заболеваний. И контролирующие его механизмы, и воспаление используют многие общие факторы, включая IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF α . Цель исследования – определить динамику уровня про- и противовоспалительных цитокинов, VEGF в сыворотке крови у подростков с левосторонним варикоцеле для оценки выраженности воспалительной реакции сосудов лозовидного сплетения, прогноза ангиогенеза и ремоделирования вен яичка.

Обследовано 100 подростков с левосторонним варикоцеле II-III степени и 30 подростков без варикоцеле, составивших группу сравнения. Всем подросткам за период от 14 до 17 лет с периодичностью раз в год выполнено определение уровня IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF α , IL-4, IL-10, VEGF в сыворотке крови, а также в зависимости от степени варикоцеле, давности выполнения варикоцелэктомии.

Выявлены статистически значимо более высокие уровни провоспалительных цитокинов в разные возрастные периоды у подростков с варикоцеле, а также повышение противовоспалительных цитокинов, что может свидетельствовать о воспалительном процессе в венах яичка при варикоцеле. Установлены более высокие уровни провоспалительных цитокинов у пациентов при III степени по сравнению с пациентами с II степенью, но без статистически значимых различий. У подростков до проведения варикоцелэктомии определены значимо более высокие уровни цитокинов, сохраняющиеся и в послеоперационном периоде. На основании данных результатов можно предположить, что при флебопатии до оперативной коррекции сохраняется воспалительный процесс, а адаптация к измененному кровотоку после операции не требует времени. Значения VEGF сохраняются прибли-

Адрес для переписки:

*Пичугова Светлана Владимировна
ГАУЗ Свердловской области «Клинико-диагностический
центр город Екатеринбург»
620144, Россия, г. Екатеринбург, ул. 8 Марта, 78в.
Тел.: 8 (905) 802-15-39.
E-mail: ekb-lem@mail.ru*

Address for correspondence:

*Svetlana V. Pichugova
Yekaterinburg Regional Clinical and Diagnostic Center
78v March 8 St
Yekaterinburg
620144 Russian Federation
Phone: +7 (905) 802-15-39.
E-mail: ekb-lem@mail.ru*

Образец цитирования:

*С.В. Пичугова, Ю.Г. Лагерева, Я.Б. Бейкин «Динамика показателей цитокинового статуса сыворотки крови у подростков с варикоцеле» // Медицинская иммунология, 2023. Т. 25, № 1. С. 111-126.
doi: 10.15789/1563-0625-DOC-2563*

*© Пичугова С.В. и соавт., 2023
Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0*

For citation:

*S.V. Pichugova, Yu.G. Lagereva, Ya.B. Beikin "Dynamics of cytokine status of blood serum in adolescents with varicocele", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2023, Vol. 25, no. 1, pp. 111-126.
doi: 10.15789/1563-0625-DOC-2563*

*© Pichugova S.V. et al., 2023
The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License
DOI: 10.15789/1563-0625-DOC-2563*

зительно одинаковыми на протяжении всего исследования и, возможно, изменения стенки сосудов обусловлены воспалительным процессом, а не активацией ангиогенеза.

При варикоцеле наблюдается воспалительный статус в измененном венозном сплетении яичка, более выраженный при III степени варикоцеле и обусловленный более поздней хирургической коррекцией.

Ключевые слова: варикоцеле, подростки, эндотелиальная дисфункция, воспаление, цитокины

DYNAMICS OF CYTOKINE STATUS OF BLOOD SERUM IN ADOLESCENTS WITH VARICOCELE

Pichugova S.V., Lagereva Yu.G., Beikin Ya.B.

*Institute of immunology and Physiology Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Yekaterinburg, Russian Federation
Yekaterinburg Regional Clinical and Diagnostic Center, Yekaterinburg, Russian Federation*

Abstract. Varicocele is a varicose dilation of pampiniform plexus veins in testicular gland, considered a special case of phlebopathy. With varicocele, there is impaired venous outflow *via* the left renal vein from the veins of testicular pampiniform plexus. Increased hydrostatic pressure leads to failure of the wall tone of the testicular vein, valvular venous insufficiency with dilation of the local venous system. Vasodilation requires integrity of endothelial layer, and its damage resulting from hydrodynamic stress is a trigger for development of an inflammatory response and production of cytokines. Pro-inflammatory cytokines have a pronounced damaging effect on endothelial cells, leading to endothelial dysfunction and chronic inflammation. Angiogenesis is an important characteristic of inflammatory disorders. Both inflammation and its controlling mechanisms employ many common factors, including IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF α . The purposes of our study were: to determine the dynamics of the pro- and anti-inflammatory cytokine levels, and VEGF contents in blood serum of adolescents with left-sided varicocele in order to assess the severity of inflammatory reaction of the vessels in the pampiniform plexus as well as prognosis of angiogenesis and remodeling of the testicular veins. We examined 100 adolescents with left-sided varicocele II-III degree and 30 adolescents without varicocele, who made up the comparison group. All adolescents (14 to 17 years old) underwent determination of IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF α , IL-4, IL-10, VEGF levels in blood serum at a frequency of 1 year, depending on the degree of varicocele, terms after varicocelectomy.

Statistically higher levels of pro-inflammatory cytokines were found over different age periods in adolescents with varicocele, as well as increased levels of anti-inflammatory cytokines, which may suggest an inflammatory process in testicular veins associated with varicocele. Higher levels of pro-inflammatory cytokines were found in patients with grade III varicocele compared with patients with grade II condition, but without statistically significant differences. In adolescents prior to varicocelectomy, significantly higher levels of cytokines were determined, which persisted over the postoperative period. Based on these results, one may assume that, in phlebopathy, the inflammatory process persists until surgical correction, and adaptation to the changed blood flow after surgery does not take time. VEGF values remain approximately similar over the observation period, and, probably, the changes of the vessel walls occur due to inflammatory process, and not to activation of angiogenesis

In varicocele disorder, an inflammatory status is observed in the altered testicular venous plexus, being more pronounced in grade III varicocele and affected by subsequent surgical correction.

Keywords: varicocele, adolescents, endothelial dysfunction, inflammation, cytokines

Работа выполнена в рамках госзадания ИИФ УрО РАН (тема № 122020900136-4).

Введение

На протяжении последних нескольких десятков лет в Российской Федерации складыва-

ется крайне неблагоприятная демографическая ситуация, характеризующаяся неуклонным нарастанием количества бесплодных пар, в которых нарушение фертильности диагностируется у мужчин. Одной из наиболее распространенных причин мужского бесплодия, выявляемых

в детском и подростковом возрасте, является варикоцеле [1, 22]. Резкое увеличение заболеваемости варикоцеле именно в период полового созревания связывают с ускоренным ростом в целом и увеличением объема кровотока во время роста яичек [1, 5]. Варикоцеле – это варикозное расширение вен лозовидного сплетения яичка, рассматривается как частный случай флебопатии [32]. В более чем 90% случаев варикоцеле является левосторонним, что напрямую связано с анатомической особенностью строения венозной системы, поскольку правая яичковая вена непосредственно впадает в нижнюю полую вену, в то время как левая яичковая вена под прямым углом впадает в левую почечную вену, где она подвергается сдавлению между верхней брыжеечной артерией и аортой (синдром аорто-мезентериального сдавления или nutcracker syndrome) [1, 3]. В формировании варикоцеле, помимо анатомической особенности венозной системы яичек, не исключается и участие врожденной неполноценности яичковых вен ввиду их сложного формирования в эмбриогенезе, а также возможной дисплазии соединительной ткани в стенке сосудов [5]. Патогенез венозных заболеваний сложен и недостаточно изучен [4, 32]. В случае варикоцеле, вероятнее всего, происходит нарушение венозного оттока по левой почечной вене, повышение гидростатического давления приводит к несостоятельности тонуса стенки яичковой вены, поскольку гладкомышечный слой вен и венул тоньше и менее организован, чем у артерий и артериол, что приводит к меньшей жесткости стенки вены и ее неспособности поддерживать возросший объем крови, развивается клапанная венозная недостаточность и дилатация венозной системы [2, 5, 17, 32]. Вазодилатация требует целостности эндотелиального слоя, а его повреждение в результате гидродинамического стресса является пусковым механизмом развития воспалительной реакции и продукции цитокинов [6, 21, 30].

К важнейшим функциям эндотелия относятся поддержание гемоваскулярного гомеостаза, регуляция гемостаза. Эндотелиальные клетки вовлечены во многие важные физиологические процессы, включая обмен молекулами, контроль вазомоторного тонуса и проницаемости, экстравазацию клеток крови, поддержания гомеостаза тканей и органов за счет синтеза и секреции большого количества биологически активных веществ, в том числе цитокинов, которые действуют как ангиокрины [7, 14, 17, 25, 26, 29]. Существует два варианта секреции эндотелием

биологически активных веществ – базальная (постоянная) и стимулированная, когда выделение этих веществ происходит в ответ на стимуляцию или повреждение эндотелиоцитов [4, 7]. Увеличение секреции и продукции цитокинов эндотелиальными клетками и формирование их провоспалительного состояния наблюдается при изменении скорости кровотока в условиях дистальной ортостатической флебогипертензии, сопровождающейся высоким венозным давлением, гемодинамическим стрессом и гипоксией и приводящей в конечном итоге к альтерации эндотелиоцитов [4, 6, 7, 14, 30, 32].

Кроме того, повреждение эндотелия способствует обнажению коллагена, адгезии лейкоцитов, активированию макрофагов и их экстравазации, что приводит к активной продукции цитокинов IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF α этими клетками [2, 6, 20, 25, 28, 30]. Провоспалительные цитокины оказывают выраженное повреждающее действие на эндотелиальные клетки, приводя к формированию эндотелиальной дисфункции и хронического воспаления [2, 16, 21, 28, 30, 33, 35].

Хроническое воспаление в свою очередь усиливает функцию эндотелиальных и тканевых клеток, способствует увеличению секреции провоспалительных цитокинов, активации лейкоцитов и макрофагов, разрушению внеклеточного коллагенового матрикса, активации протеолитических ферментов, формированию фиброза, миогенной модификации сосуда с последующей дилатацией [9, 10, 25, 30]. Феномен ремоделирования сосудов заключается в бесконтрольной пролиферации гладких мышечных клеток, эластических волокон сосудистой стенки, приводит к удлинению, извитости сосуда и представляет адаптивную реакцию на регионарную гипертензию и гипоксию, и ведущую роль в этом процессе играет эндотелиальная дисфункция [4, 7, 14]. Ангиогенез является важной характеристикой воспалительных заболеваний и механизмы, контролирующие ангиогенез и воспаление, используют многие общие факторы, включая IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF α , которые могут вызывать как воспалительную, так и ангиогенную активность [25]. Также при эндотелиальной дисфункции было отмечено увеличение продукции VEGF – сосудистого фактора роста, который совместно с цитокинами может способствовать венозной мальформации и ангиогенезу за счет стимуляции пролиферации гладких мышечных клеток, ремоделированию существующих и образованию новых сосудов [2, 14, 25, 32].

Проявление признаков воспаления обусловлено действием провоспалительных цитокинов: IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF α и противовоспалительных цитокинов: IL-4, IL-10, баланс между которыми жестко регулируется [12, 13, 14, 30]. И хотя цитокины действуют преимущественно местно и кратковременно, избыточность системы цитокинов проявляется в том, что каждый тип клеток способен продуцировать несколько цитокинов и каждый цитокин может секретироваться различными клетками, а измерение содержания цитокинов в сыворотке крови представляет одну из потенциальных возможностей оценки воспалительной реакции [12].

Цель исследования – определить динамику уровня про- и противовоспалительных цитокинов, VEGF в сыворотке крови у подростков с левосторонним варикоцеле для оценки выраженности воспалительной реакции сосудов лозовидного сплетения, прогноза ангиогенеза и ремоделирования вен яичка.

Материалы и методы

Обследовано 100 подростков с левосторонним варикоцеле II-III степени и 30 подростков без варикоцеле, составивших группу сравнения. Всем подросткам за период от 14 до 17 лет с периодичностью один раз в год выполнено определение уровня IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF α , IL-4, IL-10, VEGF в сыворотке крови. Все обследуемые и их законные представители дали письменное информированное согласие на проведение исследования.

Критерии включения: наличие левостороннего варикоцеле у подростков основной группы, отсутствие варикоцеле у подростков группы сравнения.

Критерии исключения: наличие острых или обострение хронических локальных или системных воспалительных процессов.

Пациенты были разделены по степени варикоцеле на две группы по 49 и 51 человек с II и III степенью соответственно.

Определение уровня цитокинов в сыворотке крови до оперативного вмешательства с последующей хирургической коррекцией варикоцеле и динамическим наблюдением было выполнено 46 пациентам. У остальных 54 подростков варикоцелэктомия была выполнена за 1-2 года на момент начала обследования.

Определение уровня цитокинов проводили с помощью наборов «Вектор-Бест» (Россия), предназначенных для количественного определения

уровня IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF α , IL-4, IL-10, VEGF методом ИФА. Исследование выполнено на анализаторе Model 680 (BioRad, США).

Статистический анализ результатов исследований проведен с использованием компьютерной программы Statistica 10.0 (StatSoft Inc., США) с предварительной оценкой нормальности распределения с помощью критерия χ^2 . Количественные показатели ($M \pm SD$) представлены в виде средних арифметических значений и стандартных отклонений. Коэффициент Стьюдента (t) применялся для оценки достоверности различий между признаками с нормальным распределением. При уровне $p < 0,05$ различия результатов считали статистически значимыми.

Результаты

При сопоставлении показателей уровней цитокинов в сыворотке крови в динамике за период с 14 до 17 лет у подростков с варикоцеле и подростков группы сравнения были получены следующие результаты (табл. 1).

При сопоставлении полученных данных было установлено, что в возрасте 14 лет у подростков с варикоцеле статистически более высокие уровни IL-6 и IL-8.

При оценке полученных результатов в возрасте 15 лет у подростков с варикоцеле наблюдался более высокий уровень всех определяемых цитокинов, но статистически значимое повышение выявлено для IL-8, IL-10 и TNF α . Отмечено, что уровень TNF α у подростков с варикоцеле в 15 лет не стал выше по сравнению с аналогичным показателем в 14 лет, а статистически значимую разницу обеспечило снижение уровня этого показателя у подростков группы сравнения в 15 лет.

В возрасте 16 лет также прослеживается повышенный уровень всех определяемых цитокинов в основной группе, но статистически значимое увеличение выявлено для IL-1 β , IL-6, IL-8 и IL-10 по сравнению с группой пациентов без варикоцеле.

В основной группе на завершающем этапе обследования в возрасте 17 лет также выявлены более высокие уровни всех цитокинов относительно группы сравнения, но статистически значимых различий не установлено, в том числе из-за значительных индивидуальных колебаний показателей.

Выполнено сравнение показателей уровней цитокинов у подростков разного возраста в каждой из обследуемых групп, но статистически зна-

ТАБЛИЦА 1. УРОВНИ ЦИТОКИНОВ У ПАЦИЕНТОВ ОСНОВНОЙ ГРУППЫ И ГРУППЫ СРАВНЕНИЯ ЗА ПЕРИОД 14-17 ЛЕТ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ

TABLE 1. LEVELS OF CYTOKINES IN PATIENTS OF THE MAIN GROUP AND THE COMPARISON GROUP FOR A PERIOD OF 14-17 YEARS IN BLOOD SERUM

Показатель Indicator	Основная группа (варикоцеле) Main group (varicocele) n = 100	Группа сравнения Comparison group n = 30
14 лет / 14 years		
IL-1β, пг/мл IL-1β, pg/mL	0,47±0,96	0,26±0,46
IL-4, пг/мл IL-4, pg/mL	0,38±0,98	0,64±0,98
IL-6, пг/мл IL-6, pg/mL	0,58±1,49*	0,11±0,42*
IL-8, пг/мл IL-8, pg/mL	17,60±25,22*	8,27±5,50*
IL-10, пг/мл IL-10, pg/mL	8,38±8,76	8,79±7,20
TNFα, пг/мл TNFα, pg/mL	7,74±9,48	5,66±5,19
VEGF, мЕд/мл VEGF, mU/mL	210,68±140,57	219,91±146,14
15 лет / 15 years		
IL-1β, пг/мл IL-1β, pg/mL	0,26±0,56	0,17±0,37
IL-4, пг/мл IL-4, pg/mL	0,67±2,24	0,27±0,51**
IL-6, пг/мл IL-6, pg/mL	0,43±1,06	0,16±0,61
IL-8, пг/мл IL-8, pg/mL	16,20±24,32*	7,78±4,07*
IL-10, пг/мл IL-10, pg/mL	9,87±12,82*	6,61±4,66*
TNFα, пг/мл TNFα, pg/mL	7,72±10,15*	4,96±5,12*
VEGF, мЕд/мл VEGF, mU/mL	203,78±136,96	199,51±139,36
16 лет / 16 years		
IL-1β, пг/мл IL-1β, pg/mL	0,27±0,56*	0,07±0,15*
IL-4, пг/мл IL-4, pg/mL	0,94±2,25	0,80±0,93**
IL-6, пг/мл IL-6, pg/mL	0,39±1,02*	0,07±0,16*
IL-8, пг/мл IL-8, pg/mL	16,90±23,80*	7,20±4,75*
IL-10, пг/мл IL-10, pg/mL	10,28±14,02*	6,49±7,16*
TNFα, пг/мл TNFα, pg/mL	8,10±13,81	5,26±5,14

Таблица 1 (окончание)
Table 1 (continued)

Показатель Indicator	Основная группа (варикоцеле) Main group (varicocele) n = 100	Группа сравнения Comparison group n = 30
VEGF, мЕд/мл VEGF, mU/mL	202,40±127,60	200,12±145,46
17 лет / 17 years		
IL-1β, пг/мл IL-1β, pg/mL	0,19±0,40	0,18±0,42
IL-4, пг/мл IL-4, pg/mL	1,12±2,83	0,94±1,08
IL-6, пг/мл IL-6, pg/mL	0,43±1,21	0,22±0,48
IL-8, пг/мл IL-8, pg/mL	14,04±19,25	9,85±11,86
IL-10, пг/мл IL-10, pg/mL	9,48±15,79	9,67±13,01
TNFα, пг/мл TNFα, pg/mL	11,30±52,60	4,81±8,73
VEGF, мЕд/мл VEGF, mU/mL	211,97±150,94	216,74±154,79

Примечание. * – статистически значимые различия показателей между основной группой и группой сравнения (p < 0,05); ** – статистически значимые различия показателей между группами разной возрастной категории основной группы и группы сравнения (p < 0,05).

Note. *, statistically significant differences in indicators between the main group and the comparison group (p < 0.05); **, statistically significant differences in indicators between groups of different age categories of the main group and the comparison group (p < 0.05).

ТАБЛИЦА 2. ЧАСТОТА ВСТРЕЧАЕМОСТИ ПОВЫШЕНИЯ УРОВНЯ ЦИТОКИНОВ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ У ПАЦИЕНТОВ С ВАРИКОЦЕЛЕ И ПОДРОСТКОВ ГРУППЫ СРАВНЕНИЯ

TABLE 2. FREQUENCY OF OCCURRENCE OF AN INCREASE IN THE LEVEL OF CYTOKINES IN THE BLOOD SERUM IN PATIENTS WITH VARICOCELE AND ADOLESCENTS IN THE COMPARISON GROUP

Показатель Indicator	Основная группа (варикоцеле) Main group (varicocele) n = 100	Группа сравнения Comparison group n = 30
14 лет / 14 years		
IL-1β, пг/мл IL-1β, pg/mL	–	–
IL-4, пг/мл IL-4, pg/mL	3 (3%)	–
IL-6, пг/мл IL-6, pg/mL	–	–
IL-8, пг/мл IL-8, pg/mL	44 (44%)*	6 (20%)*
IL-10, пг/мл IL-10, pg/mL	7 (7%)*	9 (30%)*
TNFα, пг/мл TNFα, pg/mL	31 (31%)	5 (16,6%)
VEGF, мЕд/мл VEGF, mU/mL	1 (1%)	–

Таблица 2 (окончание)
Table 2 (continued)

15 лет / 15 years		
IL-1β, пг/мл IL-1β, pg/mL	–	–
IL-4, пг/мл IL-4, pg/mL	5 (5%)*	–*
IL-6, пг/мл IL-6, pg/mL	–	–
IL-8, пг/мл IL-8, pg/mL	45 (45%)*	5 (16,6%)*
IL-10, пг/мл IL-10, pg/mL	10 (10)*	–
TNFα, пг/мл TNFα, pg/mL	36 (36%)*	5 (16,6%)*
VEGF, мЕд/мл VEGF, mU/mL	–	–
16 лет / 16 years		
IL-1β, пг/мл IL-1β, pg/mL	–	–
IL-4, пг/мл IL-4, pg/mL	10 (10%)*	–*
IL-6, пг/мл IL-6, pg/mL	–	–
IL-8, пг/мл IL-8, pg/mL	40 (40%)*	4 (13,3%)*
IL-10, пг/мл IL-10, pg/mL	8 (8%)	1 (3,%)
TNFα, пг/мл TNFα, pg/mL	32 (32%)	5 (16,6%)
VEGF, мЕд/мл VEGF, mU/mL	–	–
17 лет / 17 years		
IL-1β, пг/мл IL-1β, pg/mL	–	–
IL-4, пг/мл IL-4, pg/mL	6 (6%)*	–*
IL-6, пг/мл IL-6, pg/mL	–	–
IL-8, пг/мл IL-8, pg/mL	38 (38%)*	3 (10%)*
IL-10, пг/мл IL-10, pg/mL	6 (6%)	4 (13,3%)
TNFα, пг/мл TNFα, pg/mL	39 (39%)*	3 (10%)*
VEGF, мЕд/мл VEGF, mU/mL	–	–

Примечание. * – статистически значимые различия показателей между основной группой и группой сравнения (p < 0,05).

Note. *, statistically significant differences in indicators between the main group and the comparison group (p < 0.05).

ТАБЛИЦА 3. УРОВЕНЬ ЦИТОКИНОВ У ПАЦИЕНТОВ ОСНОВНОЙ ГРУППЫ ПРИ II И III СТЕПЕНИ ВАРИКОЦЕЛЕ ЗА ПЕРИОД 14-17 ЛЕТ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ

TABLE 3. LEVEL OF CYTOKINES IN PATIENTS OF THE MAIN GROUP WITH II AND III DEGREES OF VARICOCELE FOR A PERIOD OF 14-17 YEARS IN THE BLOOD SERUM

Показатель Indicator	Основная группа, II степень варикоцеле Main group, II degree varicocele n = 49	Основная группа, III степень варикоцеле Main group, III degree varicocele n = 51	Группа сравнения Comparison group n = 30
14 лет / 14 years			
IL-1β, пг/мл IL-1 β , pg/mL	0,55 \pm 1,13	0,39 \pm 0,78	0,26 \pm 0,44
IL-4, пг/мл IL-4, pg/mL	0,27 \pm 0,98	0,49 \pm 1,16	0,64 \pm 0,98
IL-6, пг/мл IL-6, pg/mL	0,59 \pm 1,49**	0,57 \pm 1,51**	0,11 \pm 0,42**
IL-8, пг/мл IL-8, pg/mL	17,83 \pm 25,32**	17,37 \pm 25,38**	8,27 \pm 5,50**
IL-10, пг/мл IL-10, pg/mL	8,61 \pm 7,68	8,15 \pm 9,76	8,79 \pm 7,20
TNFα, пг/мл TNF α , pg/mL	7,51 \pm 9,28	7,96 \pm 9,77	5,66 \pm 5,19
VEGF, мЕд/мл VEGF, mU/mL	207,97 \pm 140,57	213,28 \pm 141,55	219,91 \pm 146,14
15 лет / 15 years			
IL-1β, пг/мл IL-1 β , pg/mL	0,29 \pm 0,57	0,23 \pm 0,55	0,17 \pm 0,37
IL-4, пг/мл IL-4, pg/mL	0,40 \pm 1,49	0,93 \pm 2,77	0,27 \pm 0,51
IL-6, пг/мл IL-6, pg/mL	0,24 \pm 0,53	0,60 \pm 1,38**	0,16 \pm 0,61**
IL-8, пг/мл IL-8, pg/mL	14,04 \pm 17,37**	18,28 \pm 29,57**	7,78 \pm 4,07**
IL-10, пг/мл IL-10, pg/mL	7,92 \pm 7,27	11,74 \pm 16,35**	6,61 \pm 4,66**
TNFα, пг/мл TNF α , pg/mL	6,34 \pm 6,20	9,04 \pm 12,76**	4,96 \pm 5,12**
VEGF, мЕд/мл VEGF, mU/mL	209,31 \pm 140,88	198,47 \pm 134,27	199, 51 \pm 139,36
16 лет / 16 years			
IL-1β, пг/мл IL-1 β , pg/mL	0,30 \pm 0,55**	0,25 \pm 0,57**	0,07 \pm 0,15**
IL-4, пг/мл IL-4, pg/mL	0,51 \pm 1,29	1,35 \pm 3,15	0,80 \pm 0,93
IL-6, пг/мл IL-6, pg/mL	0,28 \pm 0,81	0,49 \pm 1,18**	0,07 \pm 0,16**
IL-8, пг/мл IL-8, pg/mL	12,69 \pm 15,70**	20,94 \pm 29,17**	7,20 \pm 4,75**
IL-10, пг/мл IL-10, pg/mL	8,47 \pm 8,35	12,02 \pm 17,77	6,49 \pm 7,16
TNFα, пг/мл TNF α , pg/mL	6,09 \pm 5,78	10,03 \pm 18,38	5,26 \pm 5,14

Таблица 3 (окончание)
Table 3 (continued)

Показатель Indicator	Основная группа, II степень варикоцеле Main group, II degree varicocele n = 49	Основная группа, III степень варикоцеле Main group, III degree varicocele n = 51	Группа сравнения Comparison group n = 30
VEGF, мЕд/мл VEGF, mU/mL	209,12±131,25	195,95±124,95	200,12±145,46
17 лет / 17 years			
IL-1β, пг/мл IL-1β, pg/mL	0,22±0,42	0,15±0,39	0,18±0,42
IL-4, пг/мл IL-4, pg/mL	0,47±0,94*	1,74±3,77*	0,94±1,08
IL-6, пг/мл IL-6, pg/mL	0,24±0,89	0,61±1,44	0,22±0,48
IL-8, пг/мл IL-8, pg/mL	11,69±12,93	16,29±23,73	9,85±11,86
IL-10, пг/мл IL-10, pg/mL	8,08±8,38	10,81±20,55	9,67±13,01
TNFα, пг/мл TNFα, pg/mL	5,33±4,96	17,04±73,39	4,81±8,73
VEGF, мЕд/мл VEGF, mU/mL	214,88±138,73	209,17±163,14	216±1,54

Примечание. * – статистически значимые различия показателей между группами с II и III степенью варикоцеле (p < 0,05); ** – статистически значимые различия показателей между группами с II и III степенью варикоцеле и группой сравнения (p < 0,05).

Note. *, statistically significant differences in indicators between groups with grade II and III varicocele (p < 0.05); **, statistically significant differences in indicators between groups with II and III degrees of varicocele and the comparison group (p < 0.05).

ТАБЛИЦА 4. УРОВЕНЬ ЦИТОКИНОВ У ПАЦИЕНТОВ ОСНОВНОЙ ГРУППЫ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ СРОКОВ
ВАРИКОЦЕЛЭКТОМИИ ЗА ПЕРИОД 14-17 ЛЕТ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ

TABLE 4. LEVEL OF CYTOKINES IN PATIENTS OF THE MAIN GROUP DEPENDING ON THE TIMING OF VARICOCELECTOMY
FOR A PERIOD OF 14-17 YEARS IN THE BLOOD SERUM

Показатель Indicator	Основная группа «до операции» Main group "before surgery" n = 46	Основная группа «после операции» Main group "after surgery" n = 54	Группа сравнения Comparison group n = 30
14 лет / 14 years			
IL-1β, пг/мл IL-1β, pg/mL	0,72±1,31*, **	0,25±0,41*	0,26±0,46**
IL-4, пг/мл IL-4, pg/mL	0,53±1,26	0,26±0,64	0,64±0,98
IL-6, пг/мл IL-6, pg/mL	0,78±1,57**	0,41±1,42	0,11±0,42**
IL-8, пг/мл IL-8, pg/mL	23,92±29,99*, **	12,21±18,98*	8,27±5,50**
IL-10, пг/мл IL-10, pg/mL	8,76±10,10	8,05±7,51	8,79±7,20
TNFα, пг/мл TNFα, pg/mL	9,90±10,59*, **	5,91±8,08*	5,66±5,19**
VEGF, мЕд/мл VEGF, mU/mL	231,42±144,91	193,00±135,60	219,91±146,14

Таблица 4 (окончание)
Table 4 (continued)

Показатель Indicator	Основная группа «до операции» Main group "before surgery" n = 46	Основная группа «после операции» Main group "after surgery" n = 54	Группа сравнения Comparison group n = 30
15 лет / 15 years			
IL-1β, пг/мл IL-1 β , pg/mL	0,36 \pm 0,71	0,18 \pm 0,37	0,17 \pm 0,37
IL-4, пг/мл IL-4, pg/mL	1,02 \pm 3,15	0,37 \pm 0,89	0,27 \pm 0,51
IL-6, пг/мл IL-6, pg/mL	0,70 \pm 1,44* **	0,19 \pm 1,47*	0,16 \pm 0,61**
IL-8, пг/мл IL-8, pg/mL	23,70 \pm 34,14* **	9,82 \pm 4,95* **	7,78 \pm 4,07**
IL-10, пг/мл IL-10, pg/mL	10,06 \pm 13,31	9,70 \pm 12,51	6,61 \pm 4,66
TNFα, пг/мл TNF α , pg/mL	9,53 \pm 8,55**	6,18 \pm 11,18	4,96 \pm 5,12**
VEGF, мЕд/мл VEGF, mU/mL	218,97 \pm 144,49	190,84 \pm 130,15	199,51 \pm 139,36
16 лет / 16 years			
IL-1β, пг/мл IL-1 β , pg/mL	0,36 \pm 0,69**	0,20 \pm 0,40	0,07 \pm 0,15**
IL-4, пг/мл IL-4, pg/mL	1,35 \pm 3,22	0,59 \pm 1,45	0,80 \pm 0,93
IL-6, пг/мл IL-6, pg/mL	0,67 \pm 1,42* **	0,15 \pm 0,29*	0,07 \pm 0,16**
IL-8, пг/мл IL-8, pg/mL	25,42 \pm 32,77* **	9,64 \pm 5,47*	7,20 \pm 4,75**
IL-10, пг/мл IL-10, pg/mL	9,60 \pm 11,22	10,86 \pm 16,11	6,94 \pm 7,16
TNFα, пг/мл TNF α , pg/mL	9,43 \pm 8,03**	6,97 \pm 17,29	5,26 \pm 5,14**
VEGF, мЕд/мл VEGF, mU/mL	219,43 \pm 134,01	187,89 \pm 121,24	200,12 \pm 145,46
17 лет / 17 years			
IL-1β, пг/мл IL-1 β , pg/mL	0,23 \pm 0,45	0,17 \pm 0,37	0,18 \pm 0,42
IL-4, пг/мл IL-4, pg/mL	0,94 \pm 2,13	1,26 \pm 3,32	0,94 \pm 1,08
IL-6, пг/мл IL-6, pg/mL	0,58 \pm 1,35**	0,32 \pm 1,07	0,22 \pm 0,48**
IL-8, пг/мл IL-8, pg/mL	19,35 \pm 26,28*	9,65 \pm 5,80*	9,85 \pm 11,86
IL-10, пг/мл IL-10, pg/mL	7,32 \pm 7,16	11,46 \pm 20,32	9,67 \pm 13,01
TNFα, пг/мл TNF α , pg/mL	8,14 \pm 6,77	14,08 \pm 71,49	4,81 \pm 8,73
VEGF, мЕд/мл VEGF, mU/mL	225,03 \pm 138,73	201,27 \pm 133,89	216 \pm 154,79

Примечание. * – статистически значимые различия показателей между группами «до операции» и «после операции» у подростков с варикоцеле ($p < 0,05$); ** – статистически значимые различия показателей между группами «до операции» и «после операции» у подростков с варикоцеле и подростков группы сравнения ($p < 0,05$).

Note. *, statistically significant differences between the groups "before surgery" and "after surgery" in adolescents with varicocele ($p < 0.05$); **, statistically significant differences in indicators between the groups "before surgery" and "after surgery" in adolescents with varicocele and adolescents in the comparison group ($p < 0.05$).

чимые различия выявлены только для ИЛ-4 у подростков в возрасте 14 и 15 лет в группе сравнения.

Было проанализировано, насколько часто встречается превышение максимального значения уровня цитокинов в сыворотке крови пациентов группы сравнения для подростков обеих групп. Данные приведены в таблице 2.

У подростков с варикоцеле статистически значимо более часто выявлены случаи повышения уровня провоспалительных цитокинов ИЛ-8 и TNF α и противовоспалительных цитокинов ИЛ-4 и ИЛ-10.

Дальнейший этап работы заключался в сопоставлении показателей уровней цитокинов в зависимости от степени варикоцеле, результаты представлены в таблице 3.

Только в возрасте 17 лет при III степени варикоцеле зафиксировано статистически значимое повышение уровня ИЛ-4 по сравнению с группой с II степенью варикоцеле.

Статистически значимые различия выявлены между группами с II и III степенью варикоцеле и группой сравнения в уровнях ИЛ-6 и ИЛ-8 в 14 лет, ИЛ-8 в 15 лет и ИЛ-1 β и ИЛ-8 в 16 лет. В остальных случаях статистически значимо более высокие уровни ИЛ-6, ИЛ-10 и TNF α установлены у пациентов из группы с III степенью варикоцеле в возрасте 16 лет по сравнению с аналогичными показателями у подростков из группы сравнения.

В возрасте 14 лет установлены статистически значимые различия в уровне ИЛ-6 и ИЛ-8 между II и III степенью варикоцеле и группой сравнения, при этом между разными степенями варикоцеле статистически значимых различий не установлено. Таким образом, в общей группе варикоцеле, высокий уровень указанных цитокинов в равной степени обеспечен пациентами как II, так и III степени варикоцеле.

У пациентов 15 лет при варикоцеле обеих групп статистически значимые различия по сравнению с группой сравнения зафиксированы только для ИЛ-8, а для ИЛ-6, ИЛ-10 и TNF α статистически значимые различия обнаружены только между пациентами с III степенью варикоцеле и пациентами группы сравнения.

В возрастном периоде 16 лет статистически значимые различия установлены для цитокинов ИЛ-1 β и ИЛ-8 между пациентами с варикоцеле обеих групп и группой сравнения, а для ИЛ-6 значимые результаты выявлены для пациентов с группой сравнения и варикоцеле III степени.

При сопоставлении данных пациентов обеих групп с варикоцеле и группы сравнения в воз-

расте 17 лет статистически значимых различий в уровнях цитокинов не установлено.

Таким образом, в общей группе варикоцеле, высокий уровень цитокинов ИЛ-6 и ИЛ-8 в 14 лет, ИЛ-8 в 15 лет и ИЛ-1 β и ИЛ-8 в 16 лет равной степени обеспечен пациентами как II, так и III степени варикоцеле. В то же время высокий уровень ИЛ-6, ИЛ-10, TNF α в 15 лет и ИЛ-6 в 16 лет в общей группе варикоцеле обусловлен пациентами с III степенью варикоцеле.

На заключительном этапе исследования было проведено сопоставление уровня цитокинов в зависимости от давности варикоцелэктомии. У части пациентов определение уровня цитокинов в крови было начато до оперативной коррекции (группа «до операции»), а у других пациентов хирургическое лечение варикоцеле было выполнено за 1-2 года до начала исследования (группа «после операции»). Результаты приведены в таблице 4.

Из полученных данных видно, что у подростков, которым на момент обследования еще не проводилось хирургическое лечение варикоцеле, статистически значимое повышение выявлено для провоспалительных цитокинов ИЛ-1 β , ИЛ-8 и TNF α .

Далее в возрасте 15 и 16 лет выявленная тенденция сохраняется, но статистически значимое повышение было обнаружено только для ИЛ-6 и ИЛ-8.

В 17 лет статистически значимо более высокий уровень был отмечен для ИЛ-8 у пациентов из группы «до операции».

При сопоставлении полученных данных в группах «до и после операции» и группой сравнения выявлен статистически значимо более высокий уровень провоспалительных цитокинов ИЛ-1 β , ИЛ-6, ИЛ-8 и TNF α в возрасте 14, 15, 16 лет у пациентов с более поздним оперативным вмешательством и только в 17 лет разница нивелируется. На всем протяжении исследования показатели уровней цитокинов в группе подростков с операцией в анамнезе более близки по значениям к аналогичным показателям в группе сравнения.

Обсуждение

Цитокины участвуют в самых разнообразных клеточных процессах, начиная от воспаления и заканчивая повреждением и регенерацией тканей, действуя по принципу сети, проявляя синергизм, что особенно характерно для провоспалительных цитокинов [12, 30]. Было установлено, что эндотелиальные клетки при венозных забо-

леваниях имеют провоспалительный фенотип и могут вносить вклад в развитие воспаления [2].

Все определяемые в исследовании цитокины в той или иной мере оказывают свое действие при варикозной флебопатии и их уровень был оценен в качестве маркера воспалительной реакции в сосудистой стенке.

Продукция эндотелиальными клетками IL-1 β напрямую связана с гемодинамическим стрессом в ответ на травму и способствует стимуляции адгезии лейкоцитов к эндотелиальным клеткам, оказывая мощное действие на развитие воспалительного процесса сосудов, стимулирует экспрессию IL-6, TNF α [14, 15, 24, 33].

IL-4 ингибирует выработку провоспалительных цитокинов, способствует нормализации функции эндотелиоцитов, уменьшает секрецию IL-1 β [13, 30].

Тканевая гипоксия, повышенный уровень IL-1 β , TNF α способствуют увеличению синтеза IL-6, активно вовлеченного в патогенез гипертензии, который продуцируется эндотелиальными клетками при механическом растяжении и эндотелиальной дисфункции и активно участвует в регуляции острофазного ответа [14, 30].

Хемокин IL-8 синтезируется активированными эндотелиальными клетками в ответ на гипоксию несколько позднее остальных цитокинов, но является основным цитокином, стимулирующим трансэндотелиальную миграцию лейкоцитов в очаг воспаления, является синергистом IL-1 β , TNF α , инициируя и поддерживая воспаление [8, 11, 14].

IL-10 является основным противовоспалительным цитокином, продуцируемым в том числе эндотелиальными клетками, активно подавляет продукцию противовоспалительных цитокинов и ослабляет их негативный эффект, прекращая воспалительную реакцию, отмечено многократное увеличение его уровня в ответ на повышение концентрации провоспалительных цитокинов, способен предотвращать формирование эндотелиальной дисфункции [9, 11, 15, 19, 24, 30].

TNF α активно секретируется в ответ на травму, может повреждать эндотелиальные клетки, способствует продукции IL-1 β , IL-6, IL-8 и является их синергистом, инициирует воспалительный каскад внутри сосудистой стенки и способствует ее альтерации, является универсальным стимулятором для эндотелиальных клеток, усиливая секрецию ими цитокинов [6, 9, 14, 33, 35].

При оценке полученных результатов видно, что в основной группе на протяжении всего ис-

следования сохраняются более высокие показатели уровней цитокинов, а статистически значимые отличия установлены для провоспалительных цитокинов в разные возрастные периоды. Учитывая, что условия включения в исследование соблюдены, единственным источником повышения провоспалительных цитокинов может считаться воспалительные изменения вен лозовидного сплетения яичка у подростков с варикоцеле. Динамика показателей позволяет проследить, что наибольшие показатели уровня цитокинов зафиксированы в активный пубертатный период (15-16 лет), а к 17 годам существенные различия нивелируются. О выраженном воспалительном процессе в этот период может свидетельствовать и повышение уровня IL-10 в ответ на усиление продукции провоспалительных цитокинов.

Сравнение полученных результатов в зависимости от степени варикоцеле было предпринято в связи с тем, что при III степени варикоцеле предполагаются более выраженные изменения стенки вен, когда вены определяются визуально у пациента в ортостазе. Полученные данные показывают, что не установлено статистически значимых различий в уровнях цитокинов между группами пациентов с II и III степенью варикоцеле, хотя более высокие уровни провоспалительных цитокинов определены у подростков с III степенью варикоцеле, особенно в период 15-16 лет. Исключение составляет IL-4, уровень которого статистически значимо выше у пациентов с III степенью варикоцеле. Кроме того, при сопоставлении показателей уровня цитокинов при II и III степени варикоцеле и группой сравнения, было установлено, что в ряде случаев повышенный уровень провоспалительных цитокинов в общей группе варикоцеле обеспечен в равной степени обеими группами, а в ряде случаев – только пациентами с III степенью варикоцеле. На основании полученных данных, можно предположить, что при обеих степенях варикоцеле, изменения в стенке сосудов с точки зрения активности воспалительного процесса существенной разницы не имеют, но при III степени варикоцеле провоспалительный статус выше.

Хирургическое вмешательство (варикоцелеэктомия) вызывает нарушение иммунной системы, выражающееся в чрезмерной воспалительной реакции и сопровождающееся повреждением эндотелиоцитов, активацией лейкоцитов и макрофагов [23]. Сопоставление уровня цитокинов в сыворотке крови до и после оперативной коррекции было выполнено по нескольким при-

чинам. Во-первых, была предпринята попытка определить, существует ли разница в уровне цитокинов и, соответственно, в выраженности воспалительного процесса у подростков, которым еще не проводилось оперативное лечение, а значит флебопатия присутствует. Во-вторых, провоцирует ли травма сосуда во время операции воспалительную реакцию, сопровождающуюся повышением уровня цитокинов. Как видно из полученных данных у пациентов, обследованных до варикоцелэктомии статистически значимо повышен уровень провоспалительных цитокинов, таких как IL-1 β , IL-8, TNF α , в то время как у пациентов с оперативной коррекцией варикоцеле в анамнезе уровень этих цитокинов существенно ниже. Также статистически значимо более высокий уровень провоспалительных цитокинов зафиксирован при сопоставлении результатов исследования у пациентов с более поздней оперативной коррекцией варикоцеле по сравнению с группой сравнения, в то время как показатели уровней цитокинов у подростков с более ранним оперативным вмешательством существенно ближе к показателям у подростков без варикоцеле. Можно предположить, что в первой группе сохраняющийся гемодинамический стресс способствует поддержанию воспалительного процесса в сосудистой стенке, а во второй группе пациентов показатели гемодинамики значительно лучше. Конечно, известно, что действие цитокинов кратковременно и оценивать их уровень с ответ на оперативное вмешательство в отдаленный промежуток не совсем целесообразно, но по результатам исследования видно, что у пациентов с недавним оперативным вмешательством сохраняются статистически значимо более высокие уровни IL-6, IL-8. Возможно, это связано с еще не завершившейся адаптацией к измененному в результате операции кровотоку, поскольку у пациентов с варикоцелэктомией в анамнезе этот период был более продолжительным.

Что касается прогноза ремоделирования сосудов лозовидного сплетения в условиях варикоцеле, то с этой целью была выполнена динамическая оценка уровня VEGF – фактора роста эндотелия сосудов, регулирующего ангиогенез

и морфологическую перестройку стенки сосуда. VEGF является проангиогенным фактором, модулирует функцию эндотелия, увеличивает проницаемость функционально зрелых сосудов, способствует венозной мальформации [2, 7, 18, 26, 27, 31, 34]. Прогрессирующее повышенное давление способствует запуску синтеза эндотелиальными клетками VEGF, который стимулирует пролиферацию гладких мышечных клеток сосудов и дальнейшее ремоделирование сосудов [25, 32]. Кроме того, проангиогенным действием обладают и ряд цитокинов, таких как IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF α [9, 14, 26, 30].

Как показало проведенное исследование, уровень VEGF сохранялся приблизительно одинаковым во всех обследуемых группах во все возрастные периоды, что может свидетельствовать об отсутствии активации ангиогенеза. Возможно, большая роль в изменении структуры вен лозовидного сплетения принадлежит повышению уровней провоспалительных цитокинов и индуцируемого ими воспалительного процесса.

В результате проведенного исследования можно предположить, что при варикоцеле наблюдается воспалительный процесс в измененном венозном сплетении яичка, более выраженный при III степени варикоцеле и обусловленный более поздней хирургической коррекцией.

Выводы

1. При варикоцеле выявлены повышенные уровни провоспалительных цитокинов в сыворотке крови, свидетельствующие о провоспалительном статусе сосудов венозного сплетения яичка.

2. Наиболее высокий уровень провоспалительных цитокинов установлен при III степени варикоцеле и более поздней хирургической коррекции.

3. У подростков с варикоцеле в периферической крови не выявлено повышения уровня маркеров ангиогенеза и ремоделирования сосудистой стенки

Список литературы / References

1. Андреев Р.Ю., Раснер П.И., Малхасян В.А., Фомин В.С. Варикоцеле – что нам известно? // Московский хирургический журнал, 2019. № 5. С. 24-31. [Andreev R.Yu., Rasner P.I., Malkhasyan V.A., Fomin V.S.

Varicocele – what do we know? *Moskovskiy khirurgicheskiy zhurnal = Moscow Surgical Journal*, 2019, no. 5, pp. 24-31. (In Russ.)]

2. Багдасарян А.Г., Криволапов К.К., Моисеев С.В. Дисфункция эндотелия при болезнях периферических артерий и вен // Клиническая фармакология и терапия, 2015. Т. 24, № 2. С. 54-60. [Bagdasaryan A.G., Krivolapov K.K., Moiseev S.V. Endothelial dysfunction in diseases of peripheral arteries and veins. *Klinicheskaya farmakologiya i terapiya = Clinical Pharmacology and Therapy*, 2015, Vol. 24, no. 2, pp. 54-60. (In Russ.)]

3. Капто А.А. Клинические аспекты сосудистой анатомии у пациентов с варикоцеле // Экспериментальная и клиническая урология, 2016. № 2. С. 70-79. [Kapto A.A. Clinical aspects of vascular anatomy in patients with varicocele. *Eksperimentalnaya i klinicheskaya urologiya = Experimental and Clinical Urology*, 2016, no. 2, pp. 70-79. (In Russ.)]

4. Колобова О.И., Симонова О.Г., Лещенко В.А. Роль эндотелиальной дисфункции в патогенезе варикозной болезни // Политравма, 2015. № 1. С. 36-41. [Kolobova O.I., Simonova O.G., Leshchenko V.A. The role of endothelial dysfunction in the pathogenesis of varicose veins. *Politravma = Polytrauma*, 2015, no. 1, pp. 36-41. (In Russ.)]

5. Кучеров В.А., Кравцов Ю.А., Матвеев С.В. Возможности и перспективы интраоперационного исследования половых гормонов при варикоцеле // Гинекология, 2018. № 5. С. 102-107. [Kuchеров V.A., Kravtsov Yu.A., Matveev S.V. Possibilities and prospects of intraoperative study of sex hormones in varicocele. *Ginekologiya = Gynecology*, 2018, no. 5, pp. 102-107. (In Russ.)]

6. Любин А.В., Перепелицын Н.И., Шаповалов К.Г. Функциональное состояние эндотелия при электротравме // Забайкальский медицинский вестник, 2012. № 1. С. 56-59. [Lyubin A.V., Perepelitsyn N.I., Sharovalov K.G. Functional state of the endothelium in electrical trauma. *Zabaykalskiy meditsinskiy vestnik = Trans-Baikal Medical Bulletin*, 2012, no. 1, pp. 56-59. (In Russ.)]

7. Мельникова Ю.С., Макарова Т.П. Эндотелиальная дисфункция как центральное звено патогенеза хронических болезней // Казанский медицинский журнал, 2015. Т. 96, № 4. С.659-665. [Melnikova Yu.S., Makarova T.P. Endothelial dysfunction as a central link in the pathogenesis of chronic diseases. *Kazanskiy meditsinskiy zhurnal = Kazan Medical Journal*, 2015, Vol. 96, no. 4, pp. 659-665. (In Russ.)]

8. Меняйло М.Е., Малащенко В.В., Шмаров В.А., Газатова Н.Д. Интерлейкин-8 способен поддерживать провоспалительную активность моноцитов (макрофагов) человека // Гены и клетки, 2018. Т.13, № 1. С. 65-69. [Menyailo M.E., Malashchenko V.V., Shmarov V.A., Gazatova N.D. Interleukin-8 is able to support the pro-inflammatory activity of human monocytes (macrophages). *Geny i kletki = Genes and Cells*, 2018, Vol. 13, no. 1, pp. 65-69. (In Russ.)]

9. Полупанов А.Г., Залова Т.Б., Рысмадова Ф.Т., Романова Т.А. Взаимосвязь концентрации фактора некроза опухоли альфа и интерлейкина-10 с развитием фатальных и нефатальных осложнений у больных эссенциальной гипертензией в процессе среднесрочного наблюдения // Артериальная гипертензия, 2019. Т. 25, № 5. С. 540-548. [Polupanov A.G., Zalova T.B., Rysmatova F.T., Romanova T.A. Correlation between the concentration of tumor necrosis factor alpha and interleukin-10 with the development of fatal and non-fatal complications in patients with essential hypertension during mid-term follow-up. *Arterialnaya gipertenziya = Arterial Hypertension*, 2019, Vol. 25, no. 5, pp. 540-548. (In Russ.)]

10. Серебрякова О.В., Серкин Д.М., Бокалова Ю.В., Просьянин В.И. Цитокиновый статус у больных диабетической кардиомиопатией // Здоровье и образование в XXI веке, 2017. Т. 19, № 1. С. 54-60. [Serebryakova O.V., Serkin D.M., Bokalova Yu.V., Prosyenin V.I. Cytokine status in patients with diabetic cardiomyopathy. *Zdorovye i obrazovanie v XXI veke = Health and Education Millennium*, 2017, Vol. 19, no. 1, pp. 54-60. (In Russ.)]

11. Соколов Д.И., Кузнецова С.А., Котов А.Ю., Симбирцев А.С. Цитокиновая регуляция экспрессии адгезионных молекул ICAM-1 и продукция хемокина IL-8 эндотелиальными клетками // Медицинская иммунология, 2000. Т. 2, № 1. С. 25-33. [Sokolov D.I., Kuznetsova S.A., Kotov A.Yu., Simbirtsev A.S. Cytokine regulation of expression of adhesion molecules ICAM-1 and production of chemokine IL-8 by endothelial cells. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2000, Vol. 2, no. 1, pp. 25-33. (In Russ.)]

12. Супрун Е.Н. Цитокины и антитела к цитокинам // Аллергология и иммунология в педиатрии, 2015. № 4. С. 44-48. [Suprun E.N. Cytokines and antibodies to cytokines. *Allergologiya i immunologiya v pediatrii = Allergology and Immunology in Pediatrics*, 2015, no. 4, pp. 44-48. (In Russ.)]

13. Токарев А.Р. Нейро-цитокиновые механизмы острого стресса // Вестник новых медицинских технологий. Электронное издание, 2019. № 3. С. 194-199. [Tokarev A.R. Neuro-cytokine mechanisms of acute stress.

Vestnik novykh meditsinskikh tekhnologiy. Elektronnoe izdanie = Bulletin of New Medical Technologies. Electronic Edition, 2019, no. 3, pp. 194-199. (In Russ.)]

14. Фрейдлин И.С., Шейкин Ю.А. Эндотелиальные клетки в качестве мишеней и продуцентов цитокинов // Медицинская иммунология, 2001. Т. 3, № 4. С. 499-514. [Freidlin I.S., Sheikin Yu.A. Endothelial cells as targets and producers of cytokines. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2001, Vol. 3, no. 4, pp. 499-514. (In Russ.)]

15. Шмидт Е.А., Бернс С.А., Барабаш О.Л., Юхно Е.С. Динамика уровней цитокинов у больных инфарктом миокарда, перенесших экстренное чрескожное коронарное вмешательство // Медицинская иммунология, 2012. Т.14, №.4-5. С. 359-364. [Schmidt E.A., Burns S.A., Barabash O.L., Yukhno E.S. Dynamics of cytokine levels in patients with myocardial infarction who underwent emergency percutaneous coronary intervention. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2012, Vol. 14, no. 4-5, pp. 359-364. (In Russ.)] doi:10.15789/1563-0625-2012-4-5-359-364.

16. Batko K., Krzanowski M., Gajda M., Dumnicka P., Fedak D., Woziwodzka K., Sułowicz W., Kuźniewski M., Litwin J.A., Krzanowska K. Endothelial injury is closely related to osteopontin and TNF receptor-mediated inflammation in end-stage renal disease. *Cytokine*, 2019, Vol. 121, 154729. doi: 10.1016/j.cyto.2019.05.016.

17. Fang J., Hirschi K. Molecular regulation of arteriovenous endothelial cell specification. *F1000Res.*, 2019, Vol. 8, F1000 Faculty Rev-1208. doi: 10.12688/f1000research.16701.1.

18. Guerra G., Perrotta F., Testa G. Circulating endothelial progenitor cells biology and regenerative medicine in pulmonary vascular diseases. *Curr. Pharm. Biotechnol.*, 2018, Vol. 19, no. 9, pp. 700-707.

19. Gust J., Ponce R., Liles W.C., Garden G.A., Turtle C.J. Cytokines in CAR T Cell-Associated Neurotoxicity. *Front. Immunol.*, 2020, Vol. 11, 577027. doi: 10.3389/fimmu.2020.577027.

20. Hassanin A.M., Ahmed H.H., Kaddah A.N. A global view of the pathophysiology of varicocele. *Andrology*, 2018, Vol. 6, no. 5, pp. 654-661.

21. Hou D., Zhou X., Zhong X., Settles M., Herring J., Wang L., Abdo Z., Forney L.J., Xu C. Microbiota of the seminal fluid from healthy and infertile men. *Fertil. Steril.*, 2013, Vol. 100, no. 5, pp. 1261-1269.

22. Karna K.K., Choi B.R., Kim M., Kim H.K., Park J.K. The effect of schisandra chinensis baillon on cross-talk between oxidative stress, endoplasmic reticulum stress, and mitochondrial signaling pathway in testes of varicocele-induced SD rat. *Int. J. Mol. Sci.*, 2019, Vol. 20, no. 22, 5785. doi: 10.3390/ijms20225785.

23. Luggya T.S., Roche T., Ssemogerere L., Kintu A., Kasumba J.M., Kwizera A., Tindimwebwa J. Effect of low-dose ketamine on post-operative serum IL-6 production among elective surgical patients: a randomized clinical trial. *Afr. Health Sci.*, 2017, Vol.17, no. 2, pp. 500-507.

24. Madhushankha M., Jayarajah U., Abeygunasekera A. M. Clinical characteristics, etiology, management and outcome of hematospermia: a systematic review. *Am. J. Clin. Exp. Urol.*, 2021, Vol. 9, no. 1, pp. 1-17.

25. Naito H., Iba T., Takakura N. Mechanisms of new blood-vessel formation and proliferative heterogeneity of endothelial cells. *Int. Immunol.*, 2020, Vol. 32, no. 5, pp. 295-305.

26. Norooznehad A.H., Mansouri K. Endothelial cell dysfunction, coagulation, and angiogenesis in coronavirus disease 2019 (COVID-19). *Microvasc. Res.*, 2021, Vol. 137, 104188. doi: 10.1016/j.mvr.2021.104188.

27. Ogaki A., Ikegaya Y., Koyama R. Vascular Abnormalities and the Role of Vascular Endothelial Growth Factor in the Epileptic Brain. *Front. Pharmacol.*, 2020, Vol. 11, 20. doi: 10.3389/fphar.2020.00020.

28. Samary C.S., Ramos A.B., Maia L.A., Rocha N.N., Santos C.L., Magalhães R.F., Clevelario A.L., Pimentel-Coelho P.M., Mendez-Otero R., Cruz F.F., Capelozzi V.L., Ferreira T.P.T., Koch T., de Abreu M.G., Dos Santos C.C., Pelosi P., Silva P.L., Rocco P.R.M. Focal ischemic stroke leads to lung injury and reduces alveolar macrophage phagocytic capability in rats. *Crit. Care*, 2018, Vol. 22, no. 1, 249. doi: 10.1186/s13054-018-2164-0.

29. Smadja D.M., Levy M., Huang L., Rossi E., Blandinières A., Israel-Biet D., Gaussem P., Bischoff J. Treprostinil indirectly regulates endothelial colony forming cell angiogenic properties by increasing VEGF-A produced by mesenchymal stem cells. *Thromb. Haemost.*, 2015, Vol. 114, no. 4, pp. 735-747.

30. Tanase D.M., Gosav E.M., Radu S., Ouatu A., Rezus C., Ciocoiu M., Costea C.F., Floria M. Arterial hypertension and interleukins: potential therapeutic target or future diagnostic marker? *Int. J. Hypertens.*, 2019, 3159283. doi: 10.1155/2019/3159283.

31. Weiner G.A., Shah S.H., Angelopoulos C.M., Bartakova A.B., Pulido R.S., Murphy A., Nudleman E., Daneman R., Goldberg J.L. Cholinergic neural activity directs retinal layer-specific angiogenesis and blood retinal barrier formation. *Nat. Commun.*, 2019, Vol. 10, no. 1, 2477. doi: 10.1038/s41467-019-10219-8.

32. Yao Ph., Mukhdomi T. Varicose Vein Endovenous Laser Therapy. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 Jan. 2022 May 15.
33. Yokota S., Miyamae T., Kuroiwa Y., Nishioka K. Novel coronavirus disease 2019 (COVID-19) and cytokine storms for more effective treatments from an inflammatory pathophysiology. *J. Clin. Med.*, 2021, Vol. 10, no. 4, 801. doi: 10.3390/jcm10040801.
34. Zeinali M., Amree A.H., Khorramdelazad H., Karami H., Abedinzadeh M. Inflammatory and anti-inflammatory cytokines in the seminal plasma of infertile men suffering from varicocele. *Andrologia*, 2017, Vol. 49, no. 6. doi: 10.1111/and.12685.
35. Zhou X., Cai J., Liu W., Wu X., Gao C. Cysteinyl leukotriene receptor type 1 (CysLT1R) antagonist zafirlukast protects against TNF- α -induced endothelial inflammation. *Biomed. Pharmacother.*, 2019, Vol. 111, pp. 452-459.

Авторы:

Пичугова С.В. — к.м.н., старший научный сотрудник лаборатории иммунопатофизиологии ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения Российской академии наук; заведующая лабораторией электронной микроскопии ГАУЗ Свердловской области «Клинико-диагностический центр город Екатеринбург», г. Екатеринбург, Россия

Лазерева Ю.Г. — д.б.н., старший научный сотрудник лаборатории иммунопатофизиологии ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения Российской академии наук; заведующая лабораторией клинической иммунологии ГАУЗ Свердловской области «Клинико-диагностический центр город Екатеринбург», г. Екатеринбург, Россия

Бейкин Я.Б. — д.м.н., заведующий лабораторией иммунопатофизиологии ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения Российской академии наук; главный врач ГАУЗ Свердловской области «Клинико-диагностический центр город Екатеринбург», г. Екатеринбург, Россия

Authors:

Pichugova S.V., PhD (Medicine), Senior Research Associate, Laboratory of Immunopathophysiology, Institute of immunology and Physiology Ural Branch, Russian Academy of Sciences; Head, Laboratory of Electron Microscopy, Yekaterinburg Regional Clinical and Diagnostic Center, Yekaterinburg, Russian Federation

Lagereva Yu.G., PhD, MD (Biology), Senior Research Associate, Laboratory of Immunopathophysiology, Institute of immunology and Physiology Ural Branch, Russian Academy of Sciences; Head, Laboratory of Clinical Immunology, Yekaterinburg Regional Clinical and Diagnostic Center, Yekaterinburg, Russian Federation

Beikin Ya.B., PhD, MD (Medicine), Head, Laboratory of Immunopathophysiology, Institute of immunology and Physiology Ural Branch, Russian Academy of Sciences; Chief Physician, Yekaterinburg Regional Clinical and Diagnostic Center, Yekaterinburg, Russian Federation

Поступила 11.08.2022
Отправлена на доработку 16.08.2022
Принята к печати 08.11.2022

Received 11.08.2022
Revision received 16.08.2022
Accepted 08.11.2022

СОДЕРЖАНИЕ ХЕМОКИНОВ В СЛЕЗНОЙ ЖИДКОСТИ ПАЦИЕНТОВ С ДИАБЕТИЧЕСКОЙ РЕТИНОПАТИЕЙ И САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ 2-го ТИПА

Агарков Н.М.^{1,2}, Лев И.В.³

¹ ФГБОУ ВО «Юго-Западный государственный университет», г. Курск, Россия

² ФГАОУ ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет», г. Белгород, Россия

³ Тамбовский филиал МНТК «Микрохирургия глаза имени академика С.Н. Федорова» Министерства здравоохранения РФ, г. Тамбов, Россия

Резюме. Диабетическая ретинопатия выступает серьезным микрососудистым осложнением сахарного диабета, в патогенезе которой важное значение принадлежит хемокинам. Однако изучение хемокинов в слезной жидкости пациентов с диабетической ретинопатией и сахарным диабетом 2-го типа проводится редко. Цель исследования — анализ содержания хемокинов в слезной жидкости пациентов, страдающих диабетической ретинопатией и сахарным диабетом 2-го типа. При определении концентрации хемокинов в слезной жидкости сформировано две клинические группы: основная группа в количестве 56 пациентов пожилого возраста, страдающих диабетической ретинопатией и сахарным диабетом 2-го типа, и контрольная группа в количестве 48 человек пожилого возраста, представленных сахарным диабетом 2-го типа без диабетической ретинопатии. Диагностика диабетической ретинопатии выполнялась после комплексного офтальмологического обследования с применением различных современных инструментальных аппаратов и с учетом критериев Общероссийской ассоциации врачей-офтальмологов «Сахарный диабет: ретинопатия диабетическая, макулярный отек диабетический». Уровень хемокинов в слезной жидкости определяли в утренние часы на приборе MAGPIX (США). Показано неравнозначное изменение содержания хемокинов в слезной жидкости пациентов с диабетической ретинопатией и сахарным диабетом 2-го типа по сравнению с пациентами, страдающими сахарным диабетом с отсутствием диабетической ретинопатии. У пациентов пожилого возраста с диабетической ретинопатией и сахарным диабетом 2-го типа выявлено снижение содержания в вышеуказанном биоматериале GRO α /CXCL1, RANTES/CCL5 и MIP-1 α /CCL3 со статистически значимым различием по отношению к контрольной группе. При этом наиболее существенно уменьшилось содержание в слезной жидкости хемокина GRO α /CXCL1, составившее в основной группе 38,24 \pm 2,57 пг/мл против 13,61 \pm 1,74 пг/мл в контрольной группе. Уровень RANTES/CCL5 понизился до 0,92 \pm 0,16 пг/мл против 1,69 \pm 0,18 пг/мл ($p < 0,001$) соответственно, а MIP-1 α /CCL3 — до 2,06 \pm 0,71 пг/мл против 3,79 \pm 0,64 пг/мл соответственно. Однако часть хемокинов в слезной жидкости пациентов с диабетической ретинопатией и сахарным диабе-

Адрес для переписки:

Агарков Николай Михайлович
ФГБОУ ВО «Юго-Западный государственный
университет»
305040, Россия, г. Курск, ул. 50 лет Октября, 94.
Тел.: 8 (910) 740-96-13.
E-mail: vitalaxen@mail.ru

Address for correspondence:

Nikolai M. Agarkov
South-Western State University
94 50 let Oktyabrya St
Kursk
300540 Russian Federation
Phone: +7 (910) 740-96-13.
E-mail: vitalaxen@mail.ru

Образец цитирования:

Н.М. Агарков, И.В. Лев «Содержание хемокинов в слезной жидкости пациентов с диабетической ретинопатией и сахарным диабетом 2-го типа» // Медицинская иммунология, 2023. Т. 25, № 1. С. 127-134. doi: 10.15789/1563-0625-COC-2559

© Агарков Н.М., Лев И.В., 2023

Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

N.M. Agarkov, I.V. Lev "Contents of chemokines in lacrimal fluid of the patients with diabetic retinopathy and type 2 diabetes mellitus", Medical Immunology (Russia)/ Meditsinskaya Immunologiya, 2023, Vol. 25, no. 1, pp. 127-134. doi: 10.15789/1563-0625-COC-2559

© Agarkov N.M., Lev I.V., 2023

The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License

DOI: 10.15789/1563-0625-COC-2559

том 2-го типа статистически значимо во всех случаях увеличилась. Сказанное относится к MCP-1/CCL2, IP-10/CXCL10 и SDF1 α /CXCL12. Содержание IP-10/CXCL10 повысилось в слезной жидкости максимально до 38,24 \pm 2,57 пг/мл у пациентов с диабетической ретинопатией и сахарным диабетом 2-го типа по сравнению с 13,61 \pm 1,74 пг/мл у пациентов с сахарным диабетом без диабетической ретинопатии, MCP-1/CCL2 до 742,34 \pm 0,89 пг/мл по сравнению с 633,72 \pm 0,64 пг/мл соответственно, SDF1 α /CXCL12 до 264,78 \pm 7,82 пг/мл по сравнению с 213,49 \pm 6,08 пг/мл. Кроме того, сопряженность изученных хемокинов у пациентов с диабетической ретинопатией и сахарным диабетом 2-го типа выше, чем в контрольной группе, что подтверждается большим количеством корреляционных связей в основной группе. Полученные результаты расширяют представление о влиянии хемокинов слезной жидкости на развитие диабетической ретинопатии.

Ключевые слова: хемокины, слезная жидкость, диабетическая ретинопатия, сахарный диабет, пожилые, корреляционные связи

CONTENTS OF CHEMOKINES IN LACRIMAL FLUID OF THE PATIENTS WITH DIABETIC RETINOPATHY AND TYPE 2 DIABETES MELLITUS

Agarkov N.M.^{a, b}, Lev I.V.^c

^a South-Western State University, Kursk, Russian Federation

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

^c S. Fedorov MNTK Eye Microsurgery Center, Tambov Branch, Tambov, Russian Federation

Abstract. Diabetic retinopathy is a serious microvascular complication of diabetes mellitus with chemokines playing an important pathogenetic role. However, the studies of chemokines in lacrimal fluid of the patients with diabetic retinopathy and type 2 diabetes mellitus (T2DM) are rarely performed. The aim of the study was to analyze the content of chemokines in lacrimal fluid of patients suffering from diabetic retinopathy and T2DM. When determining the concentration of chemokines in the lacrimal fluid, two clinical groups were formed: the main group of 56 elderly patients suffering from diabetic retinopathy and T2DM, and a control group of 48 age-matched persons with T2DM, however, without diabetic retinopathy. The diagnosis of diabetic retinopathy was performed after comprehensive ophthalmological examination using various modern techniques and applying the criteria of the All-Russian Association of Ophthalmologists "Diabetes mellitus: diabetic retinopathy, diabetic macular edema". The chemokine levels in the lacrimal fluid were determined in the morning on the MAGPIX device (USA). The changed contents of chemokines was shown in lacrimal fluid of patients with diabetic retinopathy and T2DM, in comparison with patients suffering from T2DM in absence of diabetic retinopathy. In elderly patients with diabetic retinopathy and T2DM, a decreased content of GRO α /CXCL1, RANTES/CCL5 and MIP-1 α /CCL3 was revealed in lacrimal fluid, at a statistically significant difference as related to controls. At the same time, the content of GRO α /CXCL1 chemokine in lacrimal fluid was decreased most significantly, (38.24 \pm 2.57 in the main group *versus* 13.61 \pm 1.74 pg/mL in the comparison group). The level of RANTES/CCL5 decreased to 0.92 \pm 0.16 pg/mL *versus* 1.69 \pm 0.18 pg/mL ($p < 0.001$); MIP-1 α /CCL3, to 2.06 \pm 0.71pg/mL *versus* 3.79 \pm 0.64 pg/mL, respectively. However, the proportion of chemokines in the lacrimal fluid of patients with diabetic retinopathy and T2DM was significantly increased in all cases. This finding concerns MCP-1/CCL2, IP-10/CXCL10, and SDF1 α /CXCL12. The content of IP-10/CXCL10 in lacrimal fluid increased to maximal values of 38.24 \pm 2.57 pg/mL in the patients with diabetic retinopathy and T2DM compared with 13.61 \pm 1.74 pg/mL in patients with diabetes mellitus without diabetic retinopathy, MCP-1/CCL2 to 742.34 \pm 0.89 pg/mL compared to 633.72 \pm 0.64 pg/mL, respectively; SDF1 α /CXCL12, to 264.78 \pm 7.82 pg/mL compared to 213.49 \pm 6.08 pg/mL. In addition, the interrelations between studied chemokines in patients with diabetic retinopathy and type 2 diabetes mellitus are more pronounced than in comparison group as confirmed by large number of correlations in the main group. The results obtained expand the knowledge on the effects of chemokines in lacrimal fluid upon development of diabetic retinopathy.

Keywords: chemokines, lacrimal fluid, diabetic rethinopathy, diabetes mellitus, elderly, correlations

Введение

В связи с высокой распространенностью сахарного диабета 2-го типа и особенно у людей старшего возраста диабетическая ретинопатия становится ведущей проблемой общественного здравоохранения во все мире [10] и является частым его осложнением, возникающим у трети всех больных сахарным диабетом 2-го типа и основной причиной потери зрения [3]. В 2020 году примерно 596 миллионов человек во всем мире имели нарушение зрения вдаль и 510 миллионов – нарушение зрения вблизи. При этом одной из ведущих причин нарушения зрения вдаль и вблизи экспертами называется диабетическая ретинопатия. По оценке исследователей, в 2020 году 4,4 миллиона человек имели различные нарушения остроты зрения в результате диабетической ретинопатии [4] и прогнозируется к 2045 году увеличение пациентов с диабетической ретинопатией до 700 миллионов человек [2].

Триггером развития диабетической ретинопатии, как известно, выступает системная хроническая гипергликемия, вызванная сахарным диабетом 2-го типа, и сопровождающаяся клинически недиагностируемой активацией каскада метаболических и иммунных нарушений [13]. После многочисленных исследований в экспериментальных условиях и клинической практике, датирующихся последними годами прошлого тысячелетия, в настоящее время иммунологические процессы рассматриваются как одни из важнейших элементов, приводящих в действие различные патологические механизмы, ответственные за проявления, развитие и прогрессирование диабетической ретинопатии [13]. Предыдущие исследования показали, что нарушение регуляции иммунных реакций, связанных с сахарным диабетом 2-го типа и диабетической ретинопатией, может индуцировать повышенную экспрессию различных медиаторов, приводящих к развитию диабетической ретинопатии [7] и, прежде всего, цитокинов, среди которых недостаточно изученными остаются хемокины слезной жидкости, тогда как изменение содержания хемокинов в стекловидном теле у пациентов с различными фенотипами диабетической ретинопатии показано в ряде публикаций [6, 7, 14]. Хемокины, представляющие многофункциональные медиаторы, осуществляют рекрутирование лейкоцитов в очаги воспаления, способствуя воспалению, и усиливают иммунный ответ [7], способствуя формированию диабетической ретинопатии. Поэтому изучение уровней хемокинов в слезной жидкости, ответственных за патогенез диабетической ретинопатии, представляет в настоящее время актуальность.

Цель исследования – анализ содержания хемокинов в слезной жидкости пациентов, страдающих диабетической ретинопатией и сахарным диабетом 2-го типа.

Материалы и методы

Изучение уровней хемокинов в слезной жидкости выполнено у 56 пациентов с диабетической ретинопатией и сахарным диабетом 2-го типа в возрасте 60-74 лет, составивших основную группу. Контролем служили 48 пациентов аналогичного возраста, имеющих сахарный диабет 2-го типа без диабетической ретинопатии. Все исследования проводились в Тамбовском филиале МНТК «Микрохирургия глаза имени академика С.Н. Федорова».

Пациентам обеих клинических групп выполнялось комплексное офтальмологическое обследование с применением оптической когерентной томографии, щелевой лампы, ангиографического исследования сосудов сетчатки. Выявление диабетической ретинопатии осуществлялось в соответствии с критериями клинических рекомендаций Общероссийской ассоциации врачей-офтальмологов «Сахарный диабет: ретинопатия диабетическая, макулярный отек диабетический» [1].

Среди критериев исключения принимались: воспалительные заболевания сетчатки, хроническая или острая патология органа зрения, нарушения рефракции и низкая прозрачность оптических сред, не позволяющая объективно оценить состояние глазного дна и сосудистые изменения внутриорбитальных артерий и вен.

Получение образцов слезной жидкости осуществлялось в утренние часы посредством градуированной стерильной пипетки с помещением в специальные пробирки Eppendorf. Уровень хемокинов определяли на приборе MAGPIX (США) на платформе xMAP. Среди хемокинов в слезной жидкости у пациентов основной и контрольной группы определяли содержание MCP-1/CCL2, MIP-1 α /CCL3, MIP-1 β /CCL4, IP-10/CXCL10, GRO α /CXCL1, RANTES/CCL5 и SDF1 α /CCL12.

От всех пациентов, включенных в исследование, получено письменное согласие на участие и использование полученных результатов в научных публикациях.

Исследование проводилось в соответствии с соблюдением принципов Хельсинкской декларации.

При статистической обработке принялась программа Statistica 10.0 с определением средних значений и стандартных отклонений (SD). Для оценки достоверности различий между группами пациентов использовался непараметрический критерий Краскела–Уоллиса. При выявлении

связей между хемокинами применялся корреляционный анализ с расчетом коэффициента корреляции Спирмена.

Результаты

Содержание хемокинов в слезной жидкости пациентов с диабетической ретинопатией и сахарным диабетом 2-го типа в сравнении с аналогичной возрастной группой пациентов с сахарным диабетом 2-го типа без диабетической ретинопатии статистически значимо различается по большинству изученных показателей, но с различной направленностью сдвигов и выраженностью произошедших изменений в исследуемом биоматериале (табл. 1). Из анализированных нами семи хемокинов уровень трех хемокинов в слезной жидкости статистически значимо повысился среди пациентов с диабетической ретинопатией и сахарным диабетом 2-го типа, уровень трех хемокинов в данной группе статистически значимо снизился, а уровень одного хемокина остался без достоверных изменений с некоторой тенденцией к снижению.

Снижение концентрации хемокинов в слезной жидкости пациентов, страдающих диабетической ретинопатией с сахарным диабетом 2-го типа, оказалась значительным по отношению к пациентам эквивалентного возраста с сахарным диабетом 2-го типа без диабетической ретинопатии. Вместе с тем указанное снижение хемокинов было неравнозначным и в большей степени произошло уменьшение концентрации GRO α /CXCL1 в слезной жидкости пациентов с диа-

бетической ретинопатией и сахарным диабетом 2-го типа. Уровень хемокина RANTES/CCL5 в слезной жидкости пациентов с диабетической ретинопатией и сахарным диабетом 2-го типа уменьшился статистически достоверно в 1,8 раза по сравнению с пациентами с сахарным диабетом 2-го типа, не имеющими диабетической ретинопатии, что значительно меньше, чем понижение концентрации GRO α /CXCL1, снижение которого с группой сравнения составило 2,43 раз ($p < 0,001$). Такая же закономерность в снижении концентрации в слезной жидкости у пациентов с диабетической ретинопатией и сахарным диабетом 2-го типа свойственна хемокину MIP-1 α /CCL3, когда уровень последнего репрезентативно уменьшился в обсуждаемой клинической группе.

Однако изменения таких хемокинов, как MCP-1/CCL2, IP-10/CXCL10 и SDF1 α /CCL12 статистически значимо повысились в слезной жидкости обследованных пациентов с диабетической ретинопатией и сахарным диабетом 2-го типа. При этом максимальное увеличение среди вышеназванных, как и ранее рассмотренных хемокинов, присуще IP-10/CXCL10, уровень которого вырос в основной группе пациентов практически в 3 раза ($p < 0,001$) по сравнению с уровнем этого же хемокина у пациентов с сахарным диабетом 2-го типа без диабетической ретинопатии. Концентрация же хемокинов MCP-1/CCL2 и SDF1 α /CCL12 увеличилась в слезной жидкости пациентов, страдающих диабетической ретинопатией с сахарным диабетом 2-го типа, в равной

ТАБЛИЦА 1. УРОВЕНЬ ХЕМОКИНОВ В СЛЕЗНОЙ ЖИДКОСТИ ПАЦИЕНТОВ С ДИАБЕТИЧЕСКОЙ РЕТИНОПАТИЕЙ И САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ 2-ГО ТИПА (M \pm SD, пг/мл)

TABLE 1. LEVEL OF CHEMOKINES IN THE LACRIMAL FLUID OF PATIENTS WITH DIABETIC RETINOPATHY AND TYPE 2 DIABETES MELLITUS (M \pm SD, pg/mL)

Исследуемый хемокин Interleukin name	Пациенты с диабетической ретинопатией и сахарным диабетом 2-го типа Patients with diabetic retinopathy and type 2 diabetes mellitus	Пациенты с сахарным диабетом 2-го типа без диабетической ретинопатии Patients with type 2 diabetes mellitus without diabetic retinopathy	p
MCP-1/CCL2	742,34 \pm 0,89	633,72 \pm 0,64	> 0,01
MIP-1 α /CCL3	2,06 \pm 0,71	3,79 \pm 0,64	< 0,05
MIP-1 β /CCL4	20,82 \pm 1,89	23,17 \pm 1,14	>0,05
IP-10/CXCL10	38,24 \pm 2,57	13,61 \pm 1,74	< 0,001
GRO α /CXCL1	7,53 \pm 0,64	18,28 \pm 0,79	< 0,001
RANTES/CCL5	0,92 \pm 0,16	1,69 \pm 0,18	< 0,001
SDF1 α /CCL12	264,78 \pm 7,82	213,49 \pm 6,08	< 0,005

степени. Только содержание MIP-1 β /CCL4 осталось без изменений у пациентов с диабетической ретинопатией и сахарным диабетом 2-го типа.

Анализ корреляционных связей между рассмотренными выше хемокинами слезной жидкости в сравниваемых клинических группах выявил большую сопряженность у пациентов с диабетической ретинопатией и сахарным диабетом 2-го типа (рис. 1).

Так, у пациентов с диабетической ретинопатией и сахарным диабетом 2-го типа между исследованными хемокинами в слезной жидкости установлено 8 статистически значимых корреляционных связей. При этом преобладают обратные ассоциации между хемокинами, а именно обратные связи выявлены между GRO α /CXCL1 и IP-10/CXCL10, SDF1 α /CCL12. Следует также отметить, что GRO α /CXCL1 имеет 4 корреляционные связи — две указанные выше обратные связи и 2 прямые корреляционные связи с RANTES/CCL5 и MIP-1 α /CCL3. Такое же количество связей характерно для IP-10/CXCL10 с некоторой разницей направления связей, заключающейся в доминировании обратных соотношений. У пациентов с диабетической ретинопатией и сахарным диабетом 2-го типа обнаружены также прямые ассоциации между GRO α /CXCL1 и RANTES/CCL5, GRO α /CXCL1 и MIP-1 α /CCL3, IP-10/CXCL10 и SDF1 α /CCL12.

Среди пациентов с сахарным диабетом 2-го типа без диабетической ретинопатии между изученными хемокинами выявлено всего 3 статистически значимые корреляционные связи (рис. 2).

Обратные достоверные корреляционные связи характерны для GRO α /CXCL1 и IP-10/CXCL10, RANTES/CCL5 и IP-10/CXCL10. Прямая корреляционная связь установлена между IP-10/CXCL10 и SDF1 α /CCL12.

Обсуждение

Гипергликемия у пациентов с диабетической ретинопатией и сахарным диабетом 2-го типа увеличивает продукцию активных форм кислорода и провоспалительных цитокинов, в том числе хемокинов [8, 9]. Названные метаболические и иммунные нарушения возникают у пациентов с диабетической ретинопатией как на системном, так и локальном уровне. Локальная гипоксия сетчатки приводит к высвобождению различных провоспалительных цитокинов, включая TNF α , IL-1 β , IL-8, IFN γ , хемокинов — моноцитарного хемоаттрактного белка-1 (MCP-1). Повышение концентрации последнего установлено нами у пациентов с диабетической ретинопатией и сахарным диабетом 2-го типа в слезной жидкости. Известно, что MCP-1 привлекает и активирует

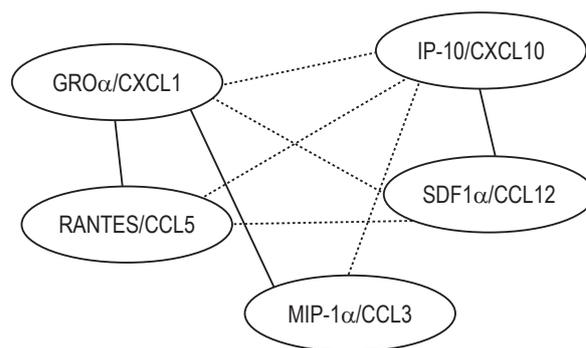


Рисунок 1. Статистически значимые корреляционные связи между уровнем хемокинов в слезной жидкости пациентов, страдающих диабетической ретинопатией и сахарным диабетом 2-го типа, $p < 0,05$ для коэффициента корреляции

Примечание. — — — — — прямая связь, — обратная связь.

Figure 1. Statistically significant correlations between the level of chemokines in the lacrimal fluid of patients suffering from diabetic retinopathy and type 2 diabetes mellitus, $p < 0.05$ for the correlation coefficient

Note. — — — — —, direct connection; , inverse connection.

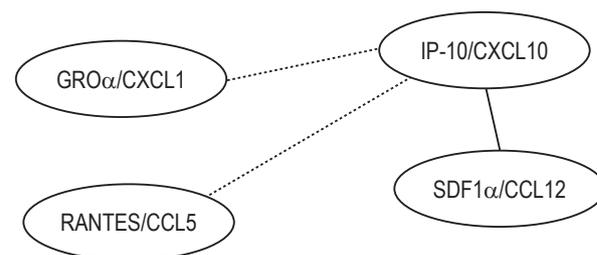


Рисунок 2. Статистически значимые корреляционные связи между уровнем хемокинов в слезной жидкости пациентов, страдающих сахарным диабетом 2-го типа без диабетической ретинопатии, $p < 0,05$ для коэффициента корреляции.

Примечание. См. примечание к рисунку 1.

Figure 2. Statistically significant correlations between the level of chemokines in the lacrimal fluid of patients suffering from type 2 diabetes mellitus without diabetic retinopathy, $p < 0.05$ for the correlation coefficient

Note. As for Figure 1.

моноциты и макрофаги, стимулирует фиброз и ангиогенез [8]. MCP-1 представляет хемокин, продуцируемый несколькими клеточными структурами иммунной системы, а также эндотелиальными клетками [13], клетками Мюллера, клетками микроглии, астроцитами, нейронами сетчатки и пигментными эпителиальными клетками сетчатки у пациентов с сахарным диабетом [8]. Повышенный уровень MCP-1 наблюдается в тканях глаза у пациентов с непролиферативной и про-

лиферативной диабетической ретинопатией [12, 14] и его уровень в стекловидном теле данных пациентов выше, чем в сыворотке крови. Интравитреальное повышение уровня MCP-1 может быть связано с прогрессированием непролиферативной диабетической ретинопатии в пролиферативную диабетическую ретинопатию [11]. MCP-1 оказывает цитотоксичное действие на сетчатку глаза через окислительный стресс, вызываемый активированными макрофагами и микроглией. Кроме того, показано, что MCP-2 значительно повышен в слезной жидкости пациентов с сахарным диабетом без диабетической ретинопатии по сравнению с недиабетиками и как MCP-1 активно вовлечен в патогенез диабетической ретинопатии [13].

Патогенетическая роль других хемокинов и их содержание у пациентов с диабетической ретинопатией изучены в стекловидном теле. Уровень всех анализируемых хемокинов в стекловидном теле пациентов с пролиферативной диабетической ретинопатией, за исключением CCL17, оказались повышенными по сравнению с пациентами без пролиферативной диабетической ретинопатии [6]. В частности, содержание MCP-1/CCL2 в стекловидном теле составляло, соответственно, 7619,5 пг/мл и 1537,0 пг/мл, MIP-1 β /CCL4 – 23,22 пг/мл и 17,86 пг/мл с достоверным различием в обоих случаях по критерию Манна–Уитни в отличие от наших данных, когда концентрация MIP-1 β /CCL4 в слезной жидкости пациентов с диабетической ретинопатией и сахарным диабетом 2-го типа была недостоверно выше – 23,17 \pm 1,14 пг/мл против 20,82 \pm 1,89 пг/мл в группе пациентов с сахарным диабетом 2-го типа без диабетической ретинопатии.

Согласно результатам непараметрического критерия Манна–Уитни, все протестированные хемокины обнаружены в более высоких концентрациях в группе с пролиферативной диабетической ретинопатией, чем в группе без пролиферативной ретинопатии. Хотя CCL17 и CCL19 никогда ранее не исследовались при диабетической ретинопатии авторами [6] обнаружены низкие уровни CCL17 в стекловидном теле пациентов с пролиферативной диабетической ретинопатией и отсутствие этого хемокина у пациентов без пролиферативной ретинопатии. Что касается CCL19, то статистическая разница установлена у пациентов с пролиферативной диабетической ретинопатией со средним уровнем 219,67 пг/мл и 41,00 пг/мл в контрольной группе ($p < 0,001$). Содержание хемокинов CXCL9 и CXCL10 в стекловидном теле пациентов с пролиферативной диабетической ретинопатией многократно превышено в сравнении с пациентами без пролиферативной ретинопатии, достигая соответствен-

но 1230,99 пг/мл, 1283,00 пг/мл и 200,44 пг/мл, 284,82 пг/мл [6].

В образцах стекловидного тела пациентов с пролиферативной диабетической ретинопатией уровни хемокинов CXCL16 и CX3CL1 были значительно выше, чем у пациентов без диабета с регматогенной отслойкой сетчатки, составляя 9306,3 пг/мл против 2156,3 пг/мл и 22,3 пг/мл против 4,7 пг/мл соответственно ($p < 0,001$) [7]. Акцентируется также, что уровни CXCL16 были в 458,8 и 417,3 раза выше, чем уровни CX3CL1 в контрольной группе без диабета и пациентов с пролиферативной диабетической ретинопатией соответственно. Кроме того, значимые корреляции обнаружены между уровнями в стекловидном теле CXCL16 и CX3CL1 ($r = 0,745$; $p < 0,001$). По мнению авторов, хемокины CXCL16 играют важную роль в развитии пролиферативной диабетической ретинопатии, так как индуцируют адгезию лейкоцитов к эндотелиальным клеткам микрососудов сетчатки и активируют молекулы межклеточной адгезии (ICAM-1) [7].

Сообщается об участии IP-10/CXCL10 в поддержании хронического лейкоцитарного воспаления и значительном повышении его уровня в слезной жидкости пациентов с диабетической ретинопатией по сравнению с пациентами без диабетической ретинопатии и в контрольной группе [5]. Нами также диагностировано увеличение почти в 3 раза в слезной жидкости IP-10/CXCL10 среди пациентов, страдающих диабетической ретинопатией и сахарным диабетом 2-го типа. Однако уровень IP-10/CXCL10 в стекловидном теле также повышен и положительно коррелирует с повышенным содержанием VEGF. Сообщается также об увеличении уровня GRO α /CXCL1 в плазме крови и стекловидном теле пациентов с диабетической ретинопатией [5]. В слезной жидкости пациентов с диабетической ретинопатией и сахарным диабетом 2-го типа, как установлено в нашем исследовании, концентрация GRO α /CXCL1, напротив, снижена до 7,53 \pm 0,64 пг/мл против 18,28 \pm 0,79 пг/мл в слезной жидкости пациентов с диабетической ретинопатией и сахарным диабетом 2-го типа. GRO α /CXCL1 также может влиять на развитие диабетической ретинопатии, так как представляет собой хемокин, привлекающий нейтрофилы и индуцирующий действие воспаления и ангиогенеза [7]. Мощным ангиогенным фактором, индуцирующим неоваскуляризацию сетчатки у пациентов с диабетом и диабетической ретинопатией, выступает хемокин RANTES/CCL5 [5], который был значительно выше у пациентов с диабетической ретинопатией в стекловидном теле и снижен в слезной жидкости обследованных нами пациен-

тов с диабетической ретинопатией и сахарным диабетом 2-го типа.

Заключение

У пациентов с диабетической ретинопатией и сахарным диабетом 2-го типа установлены неоднозначные изменения в содержании хемокинов в слезной жидкости. Уровни MIP-1 α /CCL3, GRO α /CXCL1 и RANTES/CCL5 статистически значимо снижены у пациентов вышеназванной группы по сравнению с пациентами с сахарным

диабетом 2-го типа без диабетической ретинопатии. Напротив, диагностировано увеличение в слезной жидкости пациентов с диабетической ретинопатией и сахарным диабетом 2-го типа в сравнении с контрольной группой концентрации IP-10/CXCL10, MCP-1/CCL2 и SDF1 α /CCL12, что свидетельствует об ассоциации данных хемокинов с диабетической ретинопатией. Ассоциация между хемокинами слезной жидкости более выражена среди пациентов с диабетической ретинопатией и сахарным диабетом 2-го типа.

Список литературы / References

1. Астахов Ю.С., Нероев В.В., Шестакова М.В., Зайцева О.В., Охочимская Т.Д., Рябина М.В., Шадричев Ф.Е., Григорьева Н.Н., Липатов Д.В., Кононенко И.В. Клинические рекомендации «Сахарный диабет: ретинопатия диабетическая, макулярный отек диабетический». М.: Ассоциация врачей-офтальмологов, 2020. 70 с. [Astakhov Yu.S., Neroev V.V., Shestakova M.V., Zaitseva O.V., Okhotsimskaya T.D., Ryabina M.V., Shadrachev F.E., Grigorieva N.N., Lipatov D.V., Kononenko I.V. Clinical recommendations "Diabetes mellitus: diabetic retinopathy, diabetic macular edema"]. Moscow: Association of Ophthalmologists, 2020. 70 p.
2. Фабрикантов О.Л., Агарков Н.М., Лев И.В., Гурко Т.С., Яблоков М.М., Москалева Е.О., Москалев А.А. Аллостатическая нагрузка как способ объективизации возрастной жизнеспособности пациентов с офтальмопатологией // Научные результаты биомедицинских исследований, 2021. Т. 7, № 3. С. 451-460. [Fabrikantov O.L., Agarkov N.M., Lev I.V., Gurko T.S., Yablokov M.M., Moskaleva E.O., Moskaev A.A. Allostatic load as a method of objectification of age-related viability of patients with ophthalmopathology. *Nauchnye rezultaty biomeditsinskih issledovaniy = Research Results in Biomedicine*, 2021, Vol. 7, no. 3, pp. 451-460. (In Russ.)]
3. Altmann C., Schmidt M.H. The Role of Microglia in Diabetic Retinopathy: Inflammation, Microvasculature Defects and Neurodegeneration. *Int. J. Mol. Sci.*, 2018, Vol. 19, no. 1, 110. doi 10.3390/ijms19010110.
4. Burton M.J., Ramke J., Marques A.P., Bourne R.R., Congdon N., Jones I., Tong B.A., Arunga S., Bachani D., Bascaran C., Bastawrous A., Blanchett K., Braihitwaite T., Buchan J.C., Cairns J., Cama A., Chagunda M., Chuluunhhuu C., Cooper A., Crofts-Lawrence J., Dean W.H., Denniston A.K., Ehrlich J.R., Emerson P.M., Evans J.R., Frick K.D., Friedman D.S., Furtado J.M., Gichangi M.M., Gichuli S., Gilbert S.S., Guring R., Habtamu E., Holland P., Konas J.B., Keane P.A., Keay L., Khanna R.C., Khaw P.T., Kuper H., Kyari F., Lansingh V.C., Mactaggart I., Mafwiri M.M., Mathenge W., McCormick M., Morjaria P., Mowatt L., Muirhead D., Murths G.V., Mwangi N., Patel D.B., Peto T., Qureshi B.M., Salomao S.R., Sarah V., Shilio B.R., Solomon A.W., Swenor B.K., Taylor H.R., Wang N., Webson A., West S.K., Wong T.Y., Wormald R., Yasmin S., Yusufu M., Silva J.C., Resnikoff S., Ravilla T., Gilbert C.E., Foster A., Faal H.B. The Lancet Global Health Commission on Global Eye Health: vision beyond 2020. *Lancet Glob. Health*, 2021, Vol. 9, no. 4, pp. 489-551.
5. Chen H., Zhang X., Liao N., Wen F. Assessment of biomarkers using multiplex assays in aqueous humor of patients with diabetic retinopathy. *BMC Ophthalmol.*, 2017, Vol. 17, no. 1, 176. doi: 10.1186/s12886-017-0572-6.
6. Dai Y., Wu Z., Wang F., Zhang Z., Yu M. Identification of chemokines and growth factors in proliferative diabetic retinopathy vitreous. *Biomed Res. Int.*, 2014, no. 2014, 486386. doi: 10.1155/2014/486386.
7. El-Asrar A.M., Nawaz M.I., Ahmad A., Zutter A.D., Siddiquei M.M., Blanter M., Allegaert E., Gikandi P.W., Hertogh G.D., Damme J.V., Opdenakker G., Struyf S. Evaluation of proteoforms of the transmembrane chemokines CXCL16 and CX3CL1, their receptors, and their processing metalloproteinases ADAM10 and ADAM17 in proliferative diabetic retinopathy. *Front. Immunol.*, 2021, Vol. 11, 601639. doi: 10.3389/fimmu.2020.601639.
8. Gui F., You Z., Fu S., Wu H., Zhang Y. Endothelial dysfunction in diabetic retinopathy. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*, 2020, no. 11, 591. doi: 10.3389/fendo.2020.00591.
9. Kastelan S., Oreskovic I., Biscan F., Kastelan H., Antunica A.G. Inflammatory and angiogenic biomarkers in diabetic retinopathy. *Biochem. Med. (Zagreb)*, 2020, Vol. 30, no. 3, 030502. doi: 10.11613/BM.2020.030502.
10. Kinuthia U.M., Wolf A., Langmann A. Microglia and Inflammatory Responses in Diabetic Retinopathy. *Front. Immunol.*, 2020, Vol. 11, 564077. doi: 10.3389/fimmu.2020.564077.
11. Rusnak S., Vrzalova J., Sobotova M., Hecova L., Ricarova R., Topolcan O. The Measurement of intraocular biomarkers in various stages of proliferative diabetic retinopathy using multiplex xMAP technology. *J. Ophthalmol.*, 2015, Vol. 2015, 424783. doi: 10.1155/2015/424783.
12. Roy S., Kern T.S., Song B., Stuebe C. Mechanistic insights into pathological changes in the diabetic retina: implications for targeting diabetic retinopathy. *Am. J. Pathol.*, 2017, Vol. 187, no. 1, pp. 9-19.

13. Sheemar A., Soni D., Takkar B., Basu S., Venkatesh P. Inflammatory mediators in diabetic retinopathy: Deriving clinicopathological correlations for potential targeted therapy. *Indian J. Ophthalmol.*, 2021, Vol. 69, no. 11, pp. 3035-3049.

14. Vujosevic S., Simo R. Local and systemic inflammatory biomarkers of diabetic retinopathy: an integrative approach. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 2017, Vol. 58, no. 6, pp. BIO65-BIO75.

Авторы:

Агарков Н.М. — д.м.н., профессор кафедры биомедицинской инженерии ФГБОУ ВО «Юго-Западный государственный университет», г. Курск; старший научный сотрудник лаборатории «Проблемы старения» ФГАОУ ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет», г. Белгород, Россия

Лев И.В. — к.м.н., заведующая Офтальмологическим отделением Тамбовского филиала МНТК «Микрохирургия глаза имени академика С.Н. Федорова» Министерства здравоохранения РФ, г. Тамбов, Россия

Authors:

Agarkov N.M., PhD, MD (Medicine), Professor, Department of Biomedical Engineering, South-Western State University, Kursk; Senior Research Associate, Laboratory "Problems of Aging", Belgorod State National Research University, Belgorod, Russian Federation

Lev I.V., PhD (Medicine), Ophthalmologist, Head, First Ophthalmological Department, S. Fedorov MNTK Eye Microsurgery Center, Tambov Branch, Tambov, Russian Federation

Поступила 27.07.2022

Принята к печати 16.10.2022

Дата онлайн-публикации 18.11.2022

Received 27.07.2022

Accepted 16.10.2022

Date of publication online 18.11.2022

ПРИМЕНЕНИЕ БИОИНФОРМАТИЧЕСКОГО АНАЛИЗА ДЛЯ ПРОГНОСТИЧЕСКОЙ ОЦЕНКИ КЛИНИЧЕСКОЙ ЗНАЧИМОСТИ МИССЕНС-МУТАЦИЙ ГЕНА *HS3ST6* В РАЗВИТИИ НАСЛЕДСТВЕННОГО АНГИОТЕКА

Печникова Н.А.¹, Останкова Ю.В.¹, Сайтгалина М.А.¹, Бебяков А.М.¹, Денисова А.Р.^{2,3}, Подчерняева Н.С.², Тотолян Арег А.^{1,4}

¹ ФБУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера», Санкт-Петербург, Россия

² ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Министерства здравоохранения РФ (Сеченовский университет), Москва, Россия

³ ФГБНУ «Российский научный центр хирургии имени академика Б.В. Петровского», Москва, Россия

⁴ ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Резюме. Наследственный ангиоотек (НАО) – генетически детерминированное заболевание, характеризующееся повторяющимися отеками, поражающими подкожные и/или подслизистые слои ткани, лицо, губы, шею, конечности, ротовую полость, кишечник и/или гортань. В последнем случае заболевание становится опасным для жизни. Преимущественно НАО связан со снижением уровней С1 (ингибитор С1-эстеразы), описаны НАО с дисфункциональным и с нормальным С1-ингибитором. При первом и втором вариантах причиной заболевания становятся мутации в гене *C1NH*. НАО с нормальным количественным и функциональным уровнями С1-ингибитора имеет те же клинические проявления, но с мутациями в иных генах, в том числе *F12*, *PLG*, *ANGPT1*, *KNG1*, *MYOF*, *HS3ST6*. В настоящее время мутации в гене *HS3ST6* остаются малоизученными, описана только одна миссенс-мутация (р. Thr144Ser, rs746467957), связанная с развитием НАО.

Целью нашей работы являлось изучение новых мутаций в гене *HS3ST6* и прогностический анализ *in silico* их характера и клинической значимости для развития НАО.

Материалом служили образцы цельной крови, полученные от 13 пациентов с симптомами НАО без снижения уровней и функции С1-INH.

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:

Yulia V. Ostankova
Saint Petersburg Pasteur Institute
14 Mira St
St. Petersburg
197101 Russian Federation
Phone: +7 (812) 233-20-92.
E-mail: shenna1@yandex.ru

Образец цитирования:

Н.А. Печникова, Ю.В. Останкова, М.А. Сайтгалина, А.М. Бебяков, А.Р. Денисова, Н.С. Подчерняева, Арег А. Тотолян «Применение биоинформатического анализа для прогностической оценки клинической значимости миссенс-мутаций гена *HS3ST6* в развитии наследственного ангиоотека» // Медицинская иммунология, 2023. Т. 25, № 1. С. 135-154.
doi: 10.15789/1563-0625-ABA-2577

© Печникова Н.А. и соавт., 2023
Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

N.A. Pechnikova, Yu.V. Ostankova, M.A. Saitgalina, A.M. Bebyakov, A.R. Denisova, N.S. Podchernyaeva, Areg A. Totolian "Applying bioinformatic analysis for prognostic assessment of the *HS3ST6* missense mutations clinical significance in the development of hereditary angioedema", *Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2023, Vol. 25, no. 1, pp. 135-154.
doi: 10.15789/1563-0625-ABA-2577

© Pechnikova N.A. et al., 2023
The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License
DOI: 10.15789/1563-0625-ABA-2577

Методы исследования включали секвенирование полного экзона пациентов, биоинформатический анализ мутаций гена *HS3ST6* с использованием ряда баз данных и веб-ресурсов для прогноза влияния мутаций на белок и оценки консервативности позиций обнаруженных мутаций.

Мутации в гене *HS3ST6* выявлены у четырех больных, в том числе два случая с двумя мутациями одновременно. Применение биоинформатического анализа позволило получить новые данные о четырех миссенс-мутациях в исследуемом гене. Для трех из них определена потенциальная патогенетическая значимость. Для мутации NC_000016.9:g.1962132G>A (p.A163V) наиболее вероятным путем участия в патогенезе НАО является косвенное нарушение О-сульфирования гепарансульфата непосредственно внутри белка. Мутация NC_000016.9:g.1962024G>A (p.P199L), по всей видимости, приводит к развитию заболевания за счет нарушения соединения с гепарансульфатом SDC2. При мутации NC_000016.9:g.1962046C>T (p.A192T) дестабилизация 192 аминокислотной позиции рядом с RAPS может способствовать срыву О-сульфирования гепарансульфата за счет нарушения функциональной активности белка и, соответственно, катализа переноса сульфогруппы на гепарансульфат синдекана-2. Во всех трех случаях представляется возможным формирование НАО в связи с нарушением этапов О-сульфирования гепарансульфата синдекана-2.

Учитывая, что методы *in silico* открывают новые возможности оценки патогенетической значимости мутаций, применение биоинформатического анализа может способствовать детальному исследованию истоков НАО. В настоящей работе убедительно показано, что редкие мутации в гене *HS3ST6*, могут быть задействованы в патогенезе НАО и провоцировать отеки за счет повышенного релиза брадикинина.

Ключевые слова: первичные иммунодефициты, наследственный ангиоотек, ген *HS3ST6*, патогенетически значимые мутации, полиморфизм, биоинформатические технологии, анализ *in silico*

APPLYING BIOINFORMATIC ANALYSIS FOR PROGNOSTIC ASSESSMENT OF THE *HS3ST6* MISSENSE MUTATIONS CLINICAL SIGNIFICANCE IN THE DEVELOPMENT OF HEREDITARY ANGIOEDEMA

Pechnikova N.A.^a, Ostankova Yu.V.^a, Saitgalina M.A.^a, Bebyakov A.M.^a, Denisova A.R.^{b,c}, Podchernyaeva N.S.^b, Totolian Areg A.^{a,d}

^a Saint Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation

^b I. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russian Federation

^c B. Petrovsky Russian Scientific Center of Surgery, Moscow, Russian Federation

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

Abstract. Hereditary angioedema (HAE) is a genetically determined disease characterized by recurrent attacks of edema affecting the subcutaneous and/or submucosal layers of tissue, face, lips, neck, extremities of the body, oral cavity, intestine and/or larynx. In the latter case, the disease becomes life-threatening. The majority of HAE cases are associated with decreased levels of C1 (C1-esterase inhibitor), there are also descriptions of HAE with dysfunctional C1 inhibitor and HAE with normal C1 inhibitor. In the first and second variants, mutations in the C1NH gene are the cause of the disease. HAE with normal quantitative and functional levels of C1-inhibitor has the same clinical manifestations but with mutations in other genes, including *F12*, *PLG*, *ANGPT1*, *KNG1*, *MYOF*, and *HS3ST6*. Currently, mutations in the *HS3ST6* gene remain poorly understood; only one missense mutation (p.Thr144Ser, rs746467957) associated with the development of HAE has been described.

The aim of our work was to study new mutations in the *HS3ST6* gene and analyze *in silico* their prognostic nature and clinical significance for the development of hereditary angioedema.

The material was whole blood samples obtained from 13 patients with symptoms of hereditary angioedema without reduced levels and function of C1-INH.

Whole exome sequencing of patients, bioinformatic analysis of *HS3ST6* gene mutations using a number of databases and Web resources to predict the effect of mutations on the protein and assess the conservatism of the positions of the mutations detected was involved in study methods.

Mutations in the *HS3ST6* gene were identified in four patients, including two cases with two mutations simultaneously. Application of bioinformatic analysis allowed us to obtain new data on four missense mutations in the studied gene. Potential pathogenetic significance was determined for three of them. The mutation NC_000016.9:g.1962132G>A (p.A163V) is most likely to be involved in pathogenesis of HAE by indirect disruption of heparan sulfate O-sulfation directly within the protein. The NC_000016.9:g.1962024G>A mutation (p.P199L) appears to lead to the development of the disease through disruption of docking with SDC2 heparan sulfate. In the NC_000016.9:g.1962046C>T (p.A192T) mutation, destabilization of the 192 amino acid position next to PAPS, may contribute to disruption of heparan sulfate O-sulfation through disruption of protein functional activity and, therefore, catalysis transfer of sulfo group to heparan sulfate syndecan-2. Thus, in all three cases, the formation of HAE appears to be possible due to disruption of the O-sulfation steps of heparan sulfate syndecan-2.

Considering that *in silico* methods offer new opportunities to assess the pathogenetic significance of mutations, the application of bioinformatic analysis can contribute to a detailed investigation of the causes of hereditary angioedema. The present work convincingly demonstrates that rare mutations in the *HS3ST6* gene may be involved in the pathogenesis of HAE and provoke edema due to increased bradykinin release.

Keywords: primary immunodeficiencies, hereditary angioedema, *HS3ST6* gene, pathogenetically significant mutations, polymorphism, bioinformatic technologies, *in silico* analysis

Введение

Иммунодефициты, возникающие в результате недостаточности или отсутствия элементов иммунной системы, включая лимфоциты, фагоциты и компоненты системы комплемента, подразделяют на первичные, генетически обусловленные, и вторичные, причиной которых становятся внешние факторы, например, вирусные инфекции, дефицит питательных веществ и другие [25]. В свою очередь первичные иммунодефициты (ПИД) классифицируют на типы, связанные с дефицитом Т-клеток, В-клеток, одновременно Т- и В-клеток, дефицитом компонентов комплемента, фагоцитов, иммуноглобулина А [4]. Одним из заболеваний, относящихся к ПИД, связанным с дефицитом компонентов комплемента, является ангиоотек (АО) [2].

Ангиоотек представляет собой неочаговый отек, поражающий подкожные и/или подслизистые слои ткани, лицо, губы, шею, конечности, ротовую полость, кишечник и/или гортань. В последнем случае заболевание становится опасным для жизни [12]. Ангиоотеки подразделяют на приобретенный (аллергический, не аллергический, идиопатический и другие) и наследственный [12].

Для больных наследственным ангиоотеком (НАО) характерно отсутствие реакции на антигистаминные препараты, кортикостероиды или адреналин, при этом серьезность заболевания обусловлена изменчивой клинической картиной, сопровождающейся непредсказуемыми спорадическими отеками, наибольшую опасность из которых представляют способные привести к асфиксии, а значит к необратимым повреждениям мозга, слепоте, параличу конечностей и смерти, отеки гортани [7, 8, 23, 26]. Частота летального

исхода от отека гортани встречается в 1 случае на 20 пациентов [22]. Наследственная форма ангиоотека (НАО) в большинстве случаев связана со снижением уровней С1 (ингибитор С1-эстеразы), С4 (С4-компонент комплемента), С1q (С1q-компонент системы комплемента), выявлением и повышением уровней антител к С1 [20]. В настоящее время разработана новая номенклатура для замены ранее использовавшихся обозначений НАО 1-го, 2-го и 3-го типа: НАО с дефицитом С1-ингибитора (тип 1), НАО с дисфункциональным С1-ингибитором (тип 2) и НАО с нормальным С1-ингибитором. У пациентов с НАО типа 1 дефицит ингибитора С1 обусловлен мутациями в гене *SERPING1* (*C1NH*), для которого в настоящее время описано более 150 различных мутаций, в том числе миссенс, нонсенс, сдвиг рамки считывания, делеции и инсерции, приводящие к появлению белков неправильной конформации, которые в конечном итоге не могут быть секретированы [1]. НАО типа 2 также связан с геном *C1NH*, однако в этих случаях мутации происходят в активном сайте реактивной подвижной петли или рядом с ним, в результате чего белок-ингибитор С1 секретируется, но не функционирует, в связи с чем уровень антигена С1 INH в плазме нормальный или повышенный, в то время как функция белка снижена. НАО с нормальным количественным и функциональным уровнями С1-ингибитора имеет те же клинические проявления, но не связан с мутациями в гене *C1NH*. Пути патогенеза этого варианта НАО до конца не выяснены, однако известны мутации в ряде генов, связанные с развитием заболевания [5]. В частности, определены связанные с заболеванием мутации в генах, кодирующих фактор свертываемости крови 12 (*F12*), плазминоген (*PLG*), ангиопоэтин-1 (*ANGPT1*), кининоген-1 (*KNG1*),

миоферлин (*MYOF*) и гепарансульфат-глюкозамин 3-О-сульфотрансфераза 6 (*HS3ST6*) [10, 11, 14, 21, 32]. Поскольку НАО является редким, малознакомым для врачей заболеванием, имеющим разную силу и локализацию проявлений у одного и того же больного, дифференциальный диагноз может быть затруднен [3]. Так, например, медицинские работники, сталкивающиеся с пациентами с необъяснимой рецидивирующей болью в животе, а также иными абдоминальными симптомами, включая вздутие живота, спазмы, тошноту, рвоту и диарею при отсутствии сопутствующего отека кожи, часто не распознают заболевание, что приводит к задержке диагностики, увеличивая вероятность ненужных диагностических и лечебных операций или процедур, а также потенциального риска связанных с ними осложнений [34]. Трудности идентификации у пациентов НАО не позволяют своевременно назначить высокоэффективные таргетные методы терапии, способные значительно улучшить состояние и качество жизни больных, а также снизить вероятность летального исхода. Однако, в то время как развитие НАО опосредовано брадикинином, другие типы ангиоотека могут быть опосредованы гистамином или иными механизмами, и их дифференциация имеет решающее значение. К сожалению, не существует единого достоверного диагностического теста, позволяющего дифференцировать гистамин-опосредованные и брадикинин-опосредованные ангиоотеки, поэтому для подтверждения НАО необходимо выявление клинически значимых мутаций. Таким образом, молекулярно-генетические исследования, позволяющие подтвердить наследственную природу развития заболевания, являются ключевой составляющей диагностики.

Тем не менее выявления какой-либо модификации ассоциированного с НАО гена не достаточно для подтверждения наследственной патологии, так как обнаруженные изменения могут оказаться всего лишь следствием естественного полиморфизма, не связанного с заболеванием. Так, в настоящее время мутации в гене *HS3ST6* остаются малоизученными, описана только одна миссенс-мутация, представляющая собой замену треонина на серин в позиции 144 (p.Thr144Ser, rs746467957), связанная с развитием НАО [9].

Биоинформатические методы *in silico* позволяют оценивать потенциальную патогенетическую значимость и значимость выявленных при полноэкзомном анализе мутаций для развития заболевания без экспериментальных исследований и набора выборок достаточного для статистической достоверности объема, что затруднительно при работе с такими редкими патологиями, как ПИД.

Целью нашей работы явилось изучение новых мутаций в гене *HS3ST6* и прогностический анализ *in silico* их характера и клинической значимости для развития наследственного ангиоотека.

Материалы и методы

Материалы

В работе использовали образцы цельной крови, полученные от 13 пациентов с симптомами наследственного ангиоотека. Исследования проводили при письменном согласии пациентов или их родителей. Дизайн исследования был одобрен локальным этическим комитетом ФБУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера».

Методы

Получение геномной ДНК

Отбор образцов крови осуществляли из локтевой вены одноразовой иглой в вакуумные одноразовые пробирки, содержащие антикоагулянт этилендиаминтетрауксусная дикалиевая или трикалиевая соль (6% ЭДТА). Пробирку с закрытой крышкой аккуратно переворачивали несколько раз вверх дном, чтобы кровь в пробирке тщательно перемешалась с антикоагулянтом, не допуская образования сгустка крови. Геномную ДНК выделяли из лейкоцитарного кольца в соответствии с методикой, приведенной в руководстве Самбрук и др. [31], с модификациями. Концентрацию экстрагированных образцов ДНК оценивали на флуориметре Qubit 2.0 (Invitrogen, США) с помощью набора реактивов Qubit dsDNA HS Assay Kit (Thermo Fisher Scientific Inc.). Качество анализируемой ДНК оценивали с помощью системы капиллярного электрофореза Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies Inc., США).

Полноэкзомное секвенирование

Полноэкзомное секвенирование ДНК выполняли на платформе Illumina NextSeq 500 методом парно-концевого чтения (2 × 151 п.н.) со средним покрытием не менее 70-100x. Для пробоподготовки использовали методику селективного захвата участков ДНК, относящихся к кодирующим областям генов человека. Для приготовления библиотек использовали набор для экзомного обогащения Nextera Rapid Capture Exome (Illumina, USA), комплект зондов которого разработан для обогащения 214 405 экзонов, что, в сочетании с однородным и специфическим обогащением, обеспечивает наиболее полное доступное секвенирование экзома и надежную идентификацию истинных кодирующих вариантов. Набор применяли, согласно протоколу производителя.

Биоинформатический анализ на платформе Illumina

Для анализа использовали необработанные результаты секвенирования, полученные с помощью

Illumina NextSeq. После удаления фрагментов, содержащих последовательности адаптеров, данные полноэкзомного секвенирования были загружены в облачное хранилище BaseSpace Sequence Hub, обеспечивающее доступ к вычислительным мощностям и аналитическим решениям BaseSpace Apps. Для анализа использовали аналитическую платформу Illumina DRAGEN Bio-IT Platform, при этом эталонный геном hg19 переводили во внутренний двоичный формат системы DRAGEN и готовили bed-файл таргетных участков экзона. Запуск программы осуществляли в формате “--enable-variant-caller true” для анализа полиморфных вариантов в наиболее эффективном режиме пайплайна. В автоматическом режиме были удалены считывания низкого качества, произведены выравнивания считываний с эталонной последовательностью, построены гаплотипы-кандидаты для обнаружения наиболее вероятных диплоидных комбинаций полиморфных вариантов (SNV, InDel) и произведена их аннотация в dbSNP. Для объединения информации о представленности полиморфных вариантов в различных базах и создания единой таблицы использовали сервис VariantInterpreter (<https://variantinterpreter.informatics.illumina.com>).

Создание и наполнение таблиц данных о частотах полиморфных вариантов в популяциях, а также об их патогенетической значимости из базы ClinVar, осуществляли с использованием Python-скрипта. Учитывали данные со значениями Quality более 30 и TotalDepth более 4.

Биоинформатический анализ *in silico*

Анализ представлений третичной структуры белка, его отделов, затрагиваемых обнаруженными мутациями, и непосредственно мутаций были выполнены с использованием веб-ресурса PyMOL Molecular Graphics System, версия 2.4 (<https://pymol.org/2/>, Schrodinger LLC). Модель строили на базе исходного файла структуры белка, загруженного посредством SWISSMODEL (swissmodel.expasy.org) с идентификацией Q96Q15 (*HS3S6_HUMAN*). Визуализировали третичную структуру *HS3ST6*, выгружая выходные данные в графическом представлении.

Прогноз влияния исследуемых однонуклеотидных замен на структуру белка выполняли с использованием веб-сервера нового поколения Have Our Protein Explained (HOPE), доступного по адресу <https://www3.cmbi.umcn.nl/hope> [6, 36]. Алгоритм работы включал загрузку аминокислотной последовательности исследуемого белка дикого типа с последующим введением мутации в анализируемую позицию. Обработку данных осуществляли согласно предустановленным алгоритмам с представлением результата в виде текстового файла прогноза влияния мутации на белок.

Анализ влияния выявленных мутаций на стабильность белка проводили с использованием веб-ресурсов MUpPro (<http://mupro.proteomics.ics.uci.edu/>) [9, 33], I-Mutant2.0 (<http://gpcr.biocomp.unibo.it/~emidio/I-Mutant2.0/dbMut.html>) [13]. Ресурс I-Mutant2.0 для расчета изменения свободной энергии Гиббса ($\Delta\Delta G$, ккал/моль) и индекса надежности (RI) по данным последовательности белка применяли в режиме: pH 7,0 и 37 °C. Расчеты стабильности белка осуществляли посредством I-Mutant Suite в режиме «изменения»: прогнозирование изменения стабильности белка при одноточечной мутации, значение $\Delta\Delta G$ ($\Delta\Delta G$, ккал/моль) и двоичная классификация на основе последовательности белка. Изменение стабильности мутировавшего белка по сравнению с его формой дикого типа определяется как разница в соответствующих свободных энергиях разворачивания двух сравниваемых белков ($\Delta\Delta G$ или $\Delta\Delta G$ (энергия Гиббса), ккал/моль). Таким образом, $\Delta\Delta G$ или $\Delta\Delta G$ представляют собой прогноз значения изменения энергии Гиббса с использованием метода опорных векторов (MUpPro и I-Mutant Suite), который характерен для исследуемой мутации. Значения $\Delta\Delta G < 0$ показывают снижение показателя энергии Гиббса (т. е. насколько снизится стабильность белка), в то же время значения $\Delta\Delta G > 0$ показывают рост показателей энергии Гиббса (т. е. насколько повысится стабильность белка). RI (индекс надежности) является показателем оценки прогноза для I-Mutant Suite, чем выше значение, тем достовернее прогноз [9, 13, 33].

Для прогноза патогенетической значимости выявленных мутаций использовали веб-ресурсы I-Mutant Disease (<http://gpcr2.biocomp.unibo.it/cgi/predictors/I-Mutant3.0/I-Mutant3.0.cgi>), PolyPhen-2 (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>) и MutationTaster2021 (ENST00000293937, <http://www.mutationtaster.org>) [6, 21]. При этом параметр «статус» демонстрирует наличие или отсутствие влияния мутации на организм человека и определяет ее как патогенетически значимую (способна вызывать заболевания) или нейтральную (не приводит к развитию заболевания). Значение RI (индекс надежности) — является оценкой прогноза веб-ресурса I-Mutant Disease, варьирующей от 0 до 10, при этом чем выше значение RI, тем достовернее прогноз. PolyPhen-2 использовали также для прогноза возможного влияния замещения аминокислоты на структуру и функции белка человека. PolyPhen-2 использует прогноз по HumDiv (варианты менделевской болезни в сравнении с расхождением с близкими гомологами белков человека у млекопитающих (~95% идентичности последовательности) и HumVar (все человеческие варианты, связанные

с каким-либо заболеванием (за исключением мутаций, вызывающих онкологию) или потерей активности/функции по сравнению с распространенным вариантом (частота минорного аллеля > 1%) человеческого полиморфизма без сообщений об ассоциации с заболеванием с другим эффектом). Численные значения NumDiv и NumVar демонстрируют вероятность того, что замена нанесет ущерб, т. е. чем выше число, тем выше вероятность негативного влияния мутации. Установленные алгоритмы автоматически рассчитывают данные о нейтральности или патогенетической значимости исследуемой мутации [http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/dokuwiki/docs].

Для оценки тканевой специфичности РНК белка HS3ST6 использовали базу данных ProteinAtlas (<https://www.proteinatlas.org/>), анализируя данные экспрессии РНК на основе нормализованных кодирующих белок транскриптов на миллион (nTPM).

Результаты

При анализе результатов полноэкзомного секвенирования мутации в гене *HS3ST6* были выявлены у пяти человек из 13 (38,46%), в том числе одна девочка и четыре мальчика. Показаны четыре мутации, приводящие к аминокислотным заменам, при этом у двух пациентов выявляли по две мутации. Интересно, что, несмотря на отсутствие родственных связей,

миссенс-мутации NC_000016.9:g.1962132G>A и NC_000016.9:g.1962046C>T представлены у двух пациентов, а миссенс-мутация NC_000016.9:g.1961674G>C у трех пациентов, причем в одном случае замена в гомозиготной форме (табл. 1).

Оценка влияния точечных мутаций на структуру белка

Влияние точечной мутации на структуру белка связано, прежде всего, с особенностями заменяемых и заменяющих аминокислот, т. е. молекулярной массой, гидропатией и другими параметрами (табл. 2).

Консервативность позиций мутаций и их влияние на белок оценивали с использованием веб-ресурса MutationTaster2021, результаты анализа представлены в таблицах 3 и 4.

В основе оценки консервативности позиции MutationTaster2021 лежит выравнивание последовательности рассматриваемого гена с гомологичными аминокислотными или нуклеотидными последовательностями десяти видов живых организмов. При анализе статус эволюционной сохранности (особенности) обозначают либо как полностью идентичные — аминокислоты в аминокислотной последовательности человека и гомолога, либо как сохраняемые, т. е. сходные аминокислоты в человеческой и гомологичной аминокислотной последовательности, либо как не сохраняемые, т. е. разные аминокислоты в по-

ТАБЛИЦА 1. ВЫЯВЛЕННЫЕ МИССЕНС-МУТАЦИИ В ГЕНЕ *HS3ST6* У ПАЦИЕНТОВ С СИМПТОМАМИ НАСЛЕДСТВЕННОГО АНГИОТЕКА

TABLE 1. IDENTIFIED MISSENSE MUTATIONS IN THE *HS3ST6* GENE IN PATIENTS WITH SYMPTOMS OF HEREDITARY ANGIOEDEMA

Пациент Patient	Мутация Mutation	Частота встречаемости в мире Frequency	ClinVar	Носительство Carrying
1 ♀	NC_000016.9:g.1962132G>A, p.A163V	0,34966	rs8055325	Гетерозигота Heterozygote
1 ♀	NC_000016.9:g.1961674G>C, p.L316V	0,52666	rs337285	Гомозигота Homozygote
3 ♂	NC_000016.9:g.1962046C>T, p.A192T	0,34778	rs1742399	Гетерозигота Heterozygote
3 ♂	NC_000016.9:g.1962132G>A, p.A163V	0,34966	rs8055325	Гетерозигота Heterozygote
9 ♂	NC_000016.9:g.1961674G>C, p.L316V	0,52666	rs337285	Гетерозигота Heterozygote
12 ♂	NC_000016.9:g.1962024G>A, p.P199L	0,00194	rs189679573	Гетерозигота Heterozygote
14 ♂	NC_000016.9:g.1961674G>C, p.L316V	0,52666	rs337285	Гетерозигота Heterozygote

ТАБЛИЦА 2. ХАРАКТЕРИСТИКИ АМИНОКИСЛОТ ПО ДАННЫМ IMGT Aide-mémoire

TABLE 2. CHARACTERISTICS OF AMINO ACIDS ACCORDING TO IMGT Aide-mémoire

Аминокислота Amino acid	Мол. масса (Да) Molecular weight (Da)	Кол-во атомов Number of atoms	Объем Volume (Å ³) [23]	Индекс гидропатии Hydropathy index [15]	Атомы-доноры Donor Atoms	Акцепторы водорода Hydrogen acceptors
Аланин Alanine	89	13	88,6	1,8 (гидрофобная) (hydrophobic)	Нет No	Нет No
Пролин Proline	115	17	112,7	-1,6 (нейтральная) (neutral)	Нет No	Нет No
Валин Valine	117	19	140,0	4,2 (гидрофобная) (hydrophobic)	Нет No	Нет No
Триптофан Tryptophan	119	17	116,1	-0,7 (нейтральная) (neutral)	Да Yes	Да Yes
Лейцин Leucine	131	22	166,7	3,8 (гидрофобная) (hydrophobic)	Нет No	Нет No

ТАБЛИЦА 3. АНАЛИЗ ЗНАЧИМОСТИ ЛОКАЛИЗАЦИИ МИССЕНС-МУТАЦИЙ ПО ДАННЫМ ВЕБ-РЕСУРСА MutationTaster2021

TABLE 3. ANALYSIS OF THE SIGNIFICANCE OF LOCALIZATION OF MISSENSE MUTATIONS ACCORDING TO THE MutationTaster2021

Диапазон Range		Особенности Features	Эффект* Effect*
NC_000016.9:g.1962132G>A (p.A163V)			
50	342	Топологический домен – люминальный Topological domain – luminal	Утрачен Lost
181	181	Отвечает за связывание с PAPS (фосфоаденозинфосфосульфат) Responsible for binding to PAPS (phosphoadenosine phosphosulfate)	Может быть утрачен May be lost
189	189	Отвечает за связывание с PAPS (фосфоаденозинфосфосульфат) Responsible for binding to PAPS (phosphoadenosine phosphosulfate)	Может быть утрачен May be lost
192	192	Замена аминокислот А > Т Amino acid substitution A > T	Может быть утрачен May be lost
220	221	Регион, отвечающий за связывание с белковым субстратом Region responsible for binding to protein substrate	Может быть утрачен May be lost
281	281	Наличие углеводородной связи с другими позициями, участок, отвечающий за гликозилирование Presence of a hydrocarbon bond with other positions, the site responsible for glycosylation	Может быть утрачен May be lost
288	288	Наличие дисульфидной связи с другими позициями Presence of disulfide bond with other positions	Может быть утрачен May be lost
300	300	Наличие дисульфидной связи с другими позициями Presence of disulfide bond with other positions	Может быть утрачен May be lost
305	309	Сайт связывания нуклеотидфосфата PAPS (фосфоаденозинфосфосульфат) Nucleotide phosphate binding site PAPS (phosphoadenosine phosphosulfate)	Может быть утрачен May be lost

Таблица 3 (окончание)
Table 3 (continued)

Диапазон Range		Особенности Features	Эффект* Effect*
316	316	Замена аминокислоты L > V Amino acid substitution L > V	Может быть утрачен May be lost
NC_000016.9:g.1961674G>C (p.L316V)			
50	342	Топологический домен – люминальный Topological domain – luminal	Утрачен Lost
316	316	Замена аминокислоты L > V Amino acid substitution L > V	Утрачен Lost
NC_000016.9:g.1962046C>T (p.A192T)			
50	342	Топологический домен – люминальный Topological domain – luminal	Утрачен Lost
192	192	Замена аминокислот A > T Amino acid substitution A > T	Утрачен Lost
220	221	Регион, отвечающий за связывание с белковым субстратом Region responsible for binding to the protein substrate	Может быть утрачен May be lost
281	281	Наличие углеводородной связи с другими позициями, участок, отвечающий за гликозилирование Presence of a hydrocarbon bond with other positions, the site responsible for glycosylation	Может быть утрачен May be lost
288	288	Наличие дисульфидной связи с другими позициями Presence of disulfide bond with other positions	Может быть утрачен May be lost
300	300	Наличие дисульфидной связи с другими позициями Presence of disulfide bond with other positions	Может быть утрачен May be lost
305	309	Сайт связывания нуклеотидфосфата PAPS (фосфоаденозинфосфосульфат) Nucleotide phosphate binding site PAPS (phosphoadenosine phosphosulfate)	Может быть утрачен May be lost
316	316	Замена аминокислоты L > V Amino acid substitution L > V	Может быть утрачен May be lost
NC_000016.9:g.1962024G>A (p.P199L)			
50	342	Топологический домен – люминальный Topological domain – luminal	Утрачен Lost

Примечание. * – «Утрачен» – обмен аминокислотами, вызванный рассматриваемым изменением (мутацией), затрагивает функцию и/или особенности белка указанной области; «Может быть утрачен» – из-за изменения сайта сплайсинга отсутствует экзон или белок укорочен из-за кодона преждевременной терминации. В таких случаях свойства/функции белка затрагиваются косвенно.

Note. *, "Lost", the amino acid exchange caused by the change (mutation) in question affects the function and/or features of the protein of the specified region; "May be lost", due to splicing site change there is no exon or the protein is shortened due to a premature termination codon. In such cases, the properties/functions of the protein are indirectly affected.

следовательности белка человека и гомолога, а также отсутствие гомолога – гомолог исследуемой позиции отсутствует у того или иного вида.

Таким образом, с помощью веб-ресурсов NOPE и MutationTaster2021 были получены прогностические данные о потенциальном влиянии выявленных аминокислотных замен на структуру и функцию белка на основании информации о локализации исследуемых позиций, а также

различий аминокислот в норме и при замене. Миссенс-мутации NC_000016.9:g.1962132G>A, p.A163V и NC_000016.9:g.1962046C>T, p.A192T потенциально способны приводить к потере функциональной активности люминального домена и, соответственно, модификациям в строении белка, изменениям сайта сплайсинга, изменениям функции белка. Мутация NC_000016.9:g.1961674G>C, p.L316V мо-

ТАБЛИЦА 4. ОЦЕНКА КОНСЕРВАТИВНОСТИ ПОЗИЦИЙ ВЫЯВЛЕННЫХ МУТАЦИЙ ПО ДАННЫМ ВЕБ-РЕСУРСА MutationTaster2021

TABLE 4. ASSESSMENT OF THE POSITIONS CONSERVATIVITY OF IDENTIFIED MUTATIONS ACCORDING TO THE WEB RESOURCE MutationTaster2021

Вид* Type*	Особенности Features	Ген** Gene**	Позиция Position	Участок Site
NC_000016.9:g.1962132G>A (p.A163V)				
<i>Human</i>			163	EKTPSYFVTREAPGRIHGMSPDTK
<i>Mutated</i>	Не сохраняется Not saved		163	EKTPSYFVTREVPGRIHGMSPDTK
<i>Ptroglogytes</i>	Не сохраняется Not saved	ENSPTRG00000007616	156	EKT-----
<i>M. mulatta</i>	Нет гомолога No homologue			
<i>F. catus</i>	Идентичные Identical	ENSFCAG00000011735	163	EKTPSYFVTREAPGRIHGMSPDT
<i>M. musculus</i>	Идентичные Identical	ENS- MUSG00000039628	163	EKTPSYFVTQEAPRRIHGMSPDT
<i>G. gallus</i>	Нет гомолога No homologue			
<i>T. rubripes</i>	Идентичные Identical	ENSTRUG00000006242	99	EKTPSYFVTKEAPGRVCAMNCQT
<i>D. rerio</i>	Идентичные Identical	ENS DARG00000059948	177	EKTPSYFITHEAPARVFSMSRGT
<i>D. melano-gaster</i>	Не сохраняется Not saved	FBgn0031005	204	EKTPSYFVTKEVPQRVYHMNPAT
<i>C. elegans</i>	Идентичные Identical	F52B10.2	101	EKSPAYFHSMKMAPERIKSLNPNT
<i>X. tropicalis</i>	Идентичные Identical	ENSXETG00000007214	152	EKTPSYFVTMEAPKRIYNMSSDT
NC_000016.9:g.1961674G>C (p.L316V)				
<i>Human</i>			316	KGRPHPRVPQALVRRRLQEFYRPFN
<i>Mutated</i>	Сохраняется Saved		316	KGRPHPRVPQAVRRLQEFYRPF
<i>P. troglodytes</i>	Сохраняется Saved	ENSPTRG00000007616	253	KGRPHPRVPQAVRRLQEFYRPF
<i>M. mulatta</i>	Нет гомолога No homologue			
<i>F. catus</i>	Сохраняется Saved	ENSFCAG00000011735	316	KGRPHPRVPEAVRRLRDFYRPF
<i>M. musculus</i>	Сохраняется Saved	ENS- MUSG00000039628	316	KGRPHPRVPEAVVQRLQAFYRPF
<i>G. gallus</i>	Нет гомолога No homologue			

Таблица 4 (продолжение)
Table 4 (continued)

Вид* Type*	Особенности Features	Ген** Gene**	Позиция Position	Участок Site
T. rubripes	Сохраняется Saved	ENSTRUG00000006242	253	KGRPHPHIPPEVLQRLREFYRPF
D. rerio	Сохраняется Saved	ENSDARG00000059948	331	KGRAHPQIPPDVLHRLRDFYRPF
D. melanogaster	Не сохраняется Not saved	FBgn0031005	358	KGRNHPHIDPGAIERLREFYRPF
C. elegans	Сохраняется Saved	ENSXETG00000007214	266	-----EPSVLKTLREFYGPE
X. tropicalis	Сохраняется Saved	F52B10.2	305	-----TKVLQRLQEFYRPF
NC_000016.9:g.1962046C>T (p.A192T)				
Human			192	RNPVTRAISDYAQTLSKTPG LPSF
Mutated	Не сохраняется Not saved		192	RNPVTRAISDYTQTLKTPG LPS
P. troglodytes	Не сохраняется Not saved	ENSPTRG00000007616	157	-----
M. mulatta	Нет гомолога No homologue			
F. catus	Идентичные Identical	ENSFCAG00000011735	192	RNPVTRAISDYAQTLSKTPG LPS
M. musculus	Идентичные Identical	ENS- MUSG00000039628	192	RNPVTRAISDYAQTLSKTPG LPS
G. gallus	Нет гомолога No homologue			
T. rubripes	Не сохраняется Not saved	ENSTRUG00000006242	128	RDPVTRALSDYTQTLKSNPG LPS
D. rerio	Не сохраняется Not saved	ENSDARG00000059948	206	RDPVTRAVSDYTQTLKSN
D. melanogaster	Не сохраняется Not saved	FBgn0031005	233	RDPVTRAISDYTQAASKKAD MKL
C. elegans	Не сохраняется Not saved	F52B10.2	130	RDPVTRAISDYTQSSSKRKRVL MPS
X. tropicalis	Не сохраняется Not saved	ENSXETG00000007214	181	RNPVTRAISDYTQTLKTPS LPS
NC_000016.9:g.1962024G>A (p.P199L)				
Human			199	ISDYAQTLSKT GLPSFRALAFRH
Mutated	Не сохраняется Not saved		199	ISDYAQTLSKTLGLPSFRALAFR
P. troglodytes	Не сохраняется Not saved	ENSPTRG00000007616	164	-----RALAFR
M. mulatta	Нет гомолога No homologue			

Таблица 4 (окончание)
Table 4 (continued)

Вид* Type*	Особенности Features	Ген** Gene**	Позиция Position	Участок Site
<i>F. catus</i>	Идентичные Identical	ENSFCAG00000011735	199	ISDYAQTLSKTPGLPSFRALAFR
<i>M. musculus</i>	Идентичные Identical	ENS- MUSG00000039628	199	ISDYAQTLSKTPGLPSFRALAFR
<i>G. gallus</i>	Нет гомолога No homologue			
<i>T. rubripes</i>	Идентичные Identical	ENSTRUG00000006242	135	LSDYTQTLKPNGLPSFQSLALK
<i>D. rerio</i>	Идентичные Identical	ENSDARG00000059948	213	-----PGLPSFQSLVFK
<i>D. melanogaster</i>	Не сохраняется Not saved	FBgn0031005	240	ISDYTQAASKKADMKLFEQLAFV
<i>C. elegans</i>	Не сохраняется Not saved	F52B10.2	137	ISDYTQSSSKRKRVLMPMS
<i>X. tropicalis</i>	Идентичные Identical	ENSXETG00000007214	188	-----TLSKTPSLPSFQALAFK

Примечание. * – вид живого организма, геном которого использовали для анализа консервативности исследуемой позиции белка (при этом Human – последовательность не мутированного белка у *Homo sapiens*, mutated – отображает исследуемую мутацию у *Homo sapiens*). ** – идентификация гена, позиция – номер позиции в представленном гене.

Note. *, species of the living organism whose genome was used to analyze the conserved position of the protein under study (Human – sequence of non-mutated protein in *Homo sapiens*, mutated – reflects the studied mutation in *Homo sapiens*). **, gene identification, position – position's number in the presented gene.

жет изменять функцию белка за счет влияния на взаимодействие доменов. Только мутация NC_000016.9:g.1962024G>A, p.P199L локализована в высококонсервативном регионе, за счет чего может стать причиной изменения конформации и повреждения белка, а также нарушения взаимодействия с другими молекулами или другими частями белка.

Оценка влияния точечных мутаций на стабильность белка

Согласно анализу влияния мутаций с использованием веб-приложений MUpro и I-Mutant Suite, все обнаруженные аминокислотные замены приводят к снижению стабильности белка, при этом значимое снижение показано для миссенс-мутаций NC_000016.9:g.1962046C>T и NC_000016.9:g.1962024G>A (табл. 5).

ТАБЛИЦА 5. ПРОГНОЗ СТАБИЛЬНОСТИ БЕЛКА ПРИ ВЫЯВЛЕННЫХ МИССЕНС-МУТАЦИЯХ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ВЕБ-РЕСУРСОВ MUpro И I-Mutant Suite

TABLE 5. PREDICTION OF PROTEIN STABILITY FOR IDENTIFIED MISSENSE MUTATIONS USING THE MUpro AND I-Mutant Suite WEB RESOURCES

Ресурс Resource	Показатели Indicators	Миссенс-мутации Missense-mutations			
		NC_000016.9:g. 1962132G>A (p.A163V)	NC_000016.9:g. 1961674G>C (p.L316V)	NC_000016.9:g. 1962046C>T (p.A192T)	NC_000016.9:g. 1962024G>A (p.P199L)
MUpro	ΔΔG	-0,28	-0,91	-1,29	-1,10
I-Mutant Suite	DDG	-0,03	-1,48	-0,62	-1,27
	RI	7	6	6	8

ТАБЛИЦА 6. ПРОГНОЗ ПАТОГЕНЕТИЧЕСКОЙ ЗНАЧИМОСТИ МИССЕНС-МУТАЦИЙ ПО ДАННЫМ ВЕБ-РЕСУРСОВ I-Mutant Disease, PolyPhen-2, MutationTaster2021

TABLE 6. PREDICTION OF MISSENSE-MUTATIONS PATHOGENETIC SIGNIFICANCE ACCORDING TO I-Mutant Disease, PolyPhen-2, AND MutationTaster2021

Веб-ресурс Web resource	Показатели Indicators	Миссенс-мутации Missense-mutations			
		NC_000016.9: g.1962132G>A (p.A163V)	NC_000016.9: g.1961674G>C (p.L316V)	NC_000016.9: g.1962046C>T (p.A192T)	NC_000016.9: g.1962024G>A (p.P199L)
I-Mutant Disease	Статус Status	Патогенетически значимая Pathogenetically significant	Нейтральная Neutral	Нейтральная Neutral	Патогенетически значимая Pathogenetically significant
	RI	0	7	1	2
PolyPhen-2	Статус Status	Нейтральная Neutral	Нейтральная Neutral	Нейтральная Neutral	Патогенетически значимая Pathogenetically significant
	HumVar	0,286	0,000	0,017	0,378
	HumDiv	0,438	0,000	0,085	0,920
Mutation-Taster2021	Статус Status	Нейтральная Neutral	Нейтральная Neutral	Нейтральная Neutral	Патогенетически значимая Pathogenetically significant
	Оценка Score	64	32	58	98
PROVEAN	Статус Status	Патогенетически значимая Pathogenetically significant	Нейтральная Neutral	Нейтральная Neutral	Патогенетически значимая Pathogenetically significant
	Оценка Score	-3,543	2,405	3,674	-9,618

Оценка патогенетической значимости точечных мутаций

По результатам анализа с использованием всех четырех веб-ресурсов только миссенс-мутация NC_000016.9:g.1962024G>A была определена как патогенетически значимая.

При использовании веб-ресурса I-Mutant Disease показано, что мутации NC_000016.9:g.1962132G>A и NC_000016.9:g.1962024G>A могут стать причиной развития НАО. Однако, согласно результатам анализа с помощью PolyPhen-2, патогенетически значимой является только миссенс-мутация NC_000016.9:g.1962024G>A. По данным PROVEAN, заболевание могут вызвать миссенс-мутации NC_000016.9:g.1962132G>A и NC_000016.9:g.1962024G>A. В то же время, по прогнозам MutationTaster2021 аминокислотные замены NC_000016.9:g.1961674G>C, NC_000016.9:g.1962046C>T и NC_000016.9:g.1962024G>A

не имеют патогенетического характера. Данные анализа патогенетической значимости мутаций с использованием четырех веб-ресурсов представлены в таблице 6.

Оценка тканевой специфичности экспрессии HS3ST6

При анализе тканевой специфичности РНК HS3ST6 с использованием ProteinAtlas наибольшая выраженность экспрессии белка показана в коже, пищевом тракте, тканях женской половой системы. Данные об экспрессии РНК исследуемого гена представлены на рисунке 1.

Визуализация третичной структуры белка HS3ST6 с помощью ресурса PyMol, а также данные базы UniProt позволили определить, какие именно отделы белка затрагивают обнаруженные мутации. Данные визуализации α и β -спиралей представлены на рисунке 2.

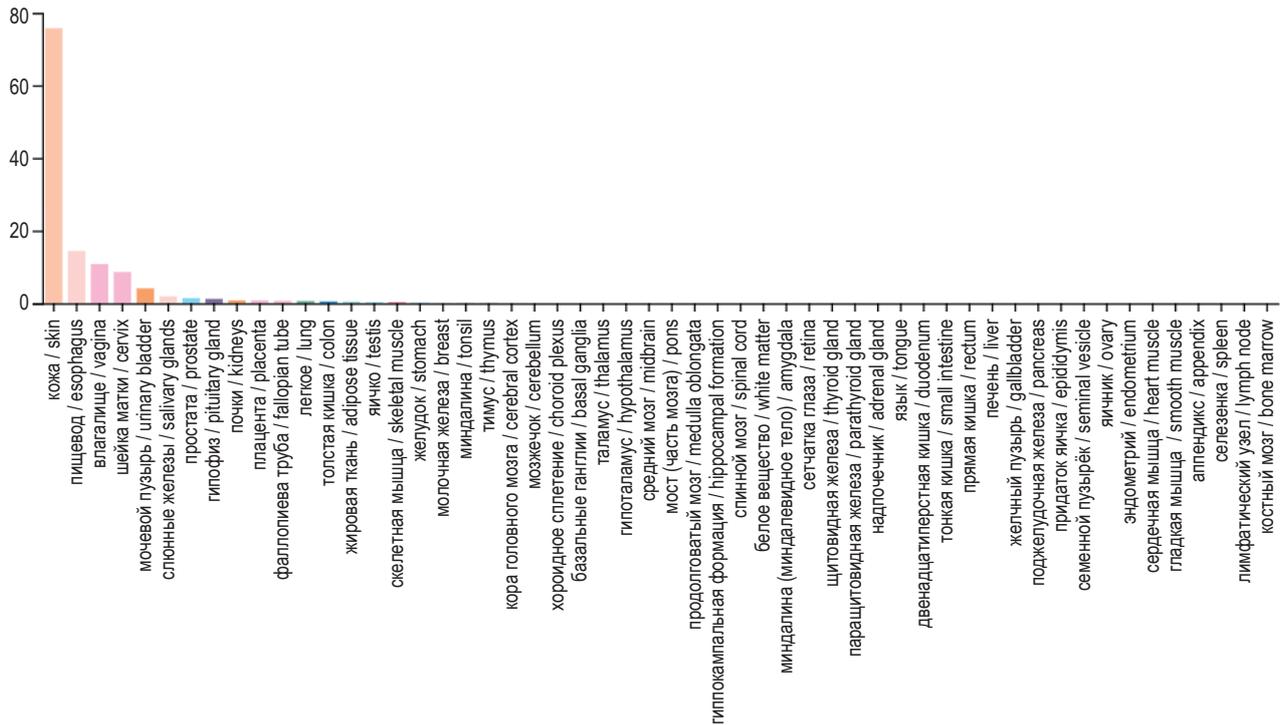


Рисунок 1. Консенсусный набор данных тканевой специфичности РНК для белка HS3ST6 по данным ProteinAtlas

Figure 1. Consensus RNA tissue specificity dataset for the HS3ST6 protein from ProteinAtlas

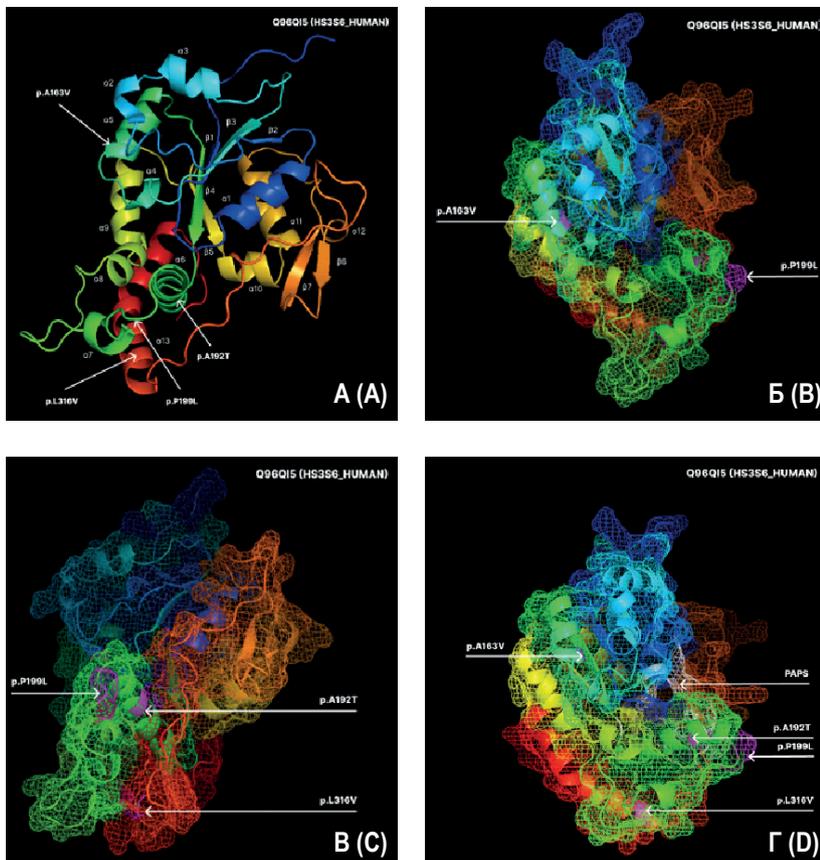


Рисунок 2. Визуализация третичной структуры белка HS3ST6 с помощью ресурса PyMol

Примечание. А – третичная структура белка Q96QI5 (HS3S6_HUMAN), указаны точки локализации выявленных мутаций. Б – локализация потенциально патогенетически значимых миссенс-мутаций p.A163V и p.P199L. В – локализация условно нейтральных миссенс-мутаций p.A192T и p.L316V. Г – локализация выявленных мутаций и PAPS в белке HS3S6.

Figure 2. Visualization of the tertiary structure of the HS3ST6 protein using PyMol

Note. (A) Tertiary structure of protein Q96QI5 (HS3S6_HUMAN), localization points of identified mutations are indicated. (B) Localization of potentially pathogenetically significant missense mutations p.A163V and p.P199L. (C) Localization of conditionally neutral missense mutations p.A192T and p.L316V. (D) Localization of identified mutations and PAPS in the HS3S6 protein.

Согласно полученным результатам (база данных UniProt, <https://www.uniprot.org/>), для белка HS3ST6 характерны несколько неупорядоченных регионов (1-21, 55-85 аминокислотные позиции) и регионов, отвечающих за связывание с субстратом (122-128, 153-156 и 220-221 позиции). Кроме того, аминокислотные позиции 100-104, 181 и 189 взаимодействуют с 3'-фосфо-5'-аденилсульфатом (PAPS) и играют важную роль в физиологически нормальном функционировании белка. По результатам MutationTaster2021, еще один участок PAPS показан в позициях 305-309 (табл. 3).

Обсуждение

Наследственный ангиоотек характеризуется повторяющимися эпизодами отека тканей конечностей, лица, кишечного тракта или дыхательных путей за счет скопления жидкости вне кровеносных сосудов, что, как правило, связано с повышением уровня брадикинина в результате сложного биохимического каскада. В частности, во время приступов вазоактивный пептидный гормон брадикинин расщепляется из своего предшественника, высокомолекулярного кининогена (HMWK), плазменным калликреином и активирует рецептор брадикинина B2 на поверхности эндотелиальных клеток. В дальнейшем высвобождение брадикинина приводит к вазодилатации сосудов и повышенной проницаемостью стенок сосудов, приводящих к отеку мягких тканей. Однако, наряду с уже известными механизмами реализации брадикинина при НАО, когда задействованы белки SERPING1, F12, PLG, ANGPT1, KNG1, MYOF, наименее изученным остается белок HS3ST6. Ранее было показано, что HMWK связывается с широким спектром клеток, предположительно за счет участков взаимодействия в доменах D3 (235–357 аминокислотные позиции), D5H (503–626 аминокислотные позиции), D6 (503–626 аминокислотные позиции). Домен 6 действует как связывающий домен для двух родственных белков FXI и прекалликреина плазмы, в то время как домен 5 связывается с отрицательно заряженными поверхностями, запуская последующую цепь реакций контактного пути. Однако полностью акцепторные сайты все еще не определены [28]. Среди клеток, с которыми взаимодействует HMWK, присутствуют и эндотелиальные клетки. Предполагают, что взаимодействие HMWK с данным типом клеток осуществляется путем объединения на клеточной поверхности с цитокератином 1 (D3), gC1qR (D5L) [15, 17, 18].

HMWK связывается также с хондроитинсульфатными и гепаран-сульфатными (HS) цепями клеточных протеогликанов синдекана-1 (SDC1), синдекана-2 (SDC2), синдекана-4 (SDC4) и глипикана [28], которые обеспечивает защиту HMWK от расщепления [29]. Кроме того, протеогликан опосредуют эндоцитоз кининогена (HK) [16, 37], что может потенциально снижать реализацию брадикинина. Экспрессия белков семейства синдеканов позволяет нам предположить их существенную роль в связывании HMWK. Так, в работе, посвященной мутации в гене *HS3S6*, авторы сообщали об участии SDC2 в связывании с HMWK [9]. В физиологических условиях для связывания HMWK с SDC2 требуется нормальное функционирование гепарансульфат глюкозамин 3-О-сульфотрансферазы 6, кодируемой геном *HS3S6*. Указанная сульфотрансфераза, используя 3'-фосфо-5'-аденилсульфат (PAPS), катализирует перенос сульфогруппы на гепарансульфат (HS) синдекан-2. В результате специфического для SDC2 O-сульфатирования образуется модифицированный ферментом гепарансульфат, действующий как рецептор для связывания с HMWK на поверхности клеток. Однако, при наличии патогенетически значимых мутаций в гене *HS3S6* этап O-сульфатирования SDC2 может быть нарушен, что, в свою очередь, приведет к отекам тканей [9]. Наибольшая выраженность экспрессии РНК *HS3S6* в коже, пищеводе и тканях женской половой системы косвенно свидетельствует о возможном участии *HS3S6* в развитии НАО.

Хотя по прогнозу PolyPhen-2 и MutationTaster2021 мутация NC_000016.9:g.1962132G>A (p.A163V) нейтральна, что подтверждается данными о ее распространенности в гомозиготном и гетерозиготном состояниях, согласно базами данных 1000G и ExAC, а позиция локализации не относится к высококонсервативным, замена аланина на более гидрофобную и объемную аминокислоту валин, т. е. больший размер мутантного остатка по сравнению с остатком дикого типа, в позиции 163 одной из α -цепей ($\alpha 5$) белка *HS3S6* рядом с высококонсервативным участком, создает вероятность появления неровностей аминокислотной последовательности и в дальнейшем неправильного формирования третичной структуры белка. Снижение стабильности белка будет при этом, вероятно, незначительно, однако мутация может косвенно затрагивать расположенные в визуальном желобе или канале HS3ST6 (рис. 2Г) участки PAPS (181, 189, 305-309 аминокислотные позиции), которые важны для

этапа О-сульфатирования [24]. Учитывая частоту встречаемости NC_000016.9:g.1962132G>A в популяции (0,34966), расположение мутации, прогноз ее патогенетической значимости и сопутствующего изменения вторичной структуры белка, можно предположить, что мутация NC_000016.9:g.1962132G>A (p.A163V) принимает опосредованное участие в патофизиологии НАО за счет неправильного связывания с гепарансульфатом SDC2 в области α -цепей (рис. 3Б), либо в комплексе с другими, неисследованными, мутациями.

К более выраженному снижению стабильности белка способна приводить миссенс-мутация NC_000016.9:g.1961674G>C (p.L316V) за счет замены лейцина на менее гидрофобную аминокислоту валин. Кроме того, из-за замены лейцина (объем 166.7 Å³) на валин (объем 140.0 Å³) в 316 позиции белка предположительно формируется пустое пространство, в результате чего могут наблюдаться нарушения взаимодействия с другими молекулами. Однако, находясь в одной из α -цепей (α 13), мутация не затрагивает консервативную область и участки PAPS. Интересно отметить, что данная мутация была обнаружена у трех пациентов. У пациентки № 1 – в гомозиготном состоянии совместно с гетерозиготной заменой NC_000016.9:g.1962132G>A (p.A163V), взаимодействие и комбинация эффектов двух мутаций остаются неизвестными. У пациентов № 9 и № 14 мутация была представлена в гетерозиготном состоянии. Учитывая частоту встречаемости аллели в мире (0,52666), данные проведенного анализа, а также то, что NC_000016.9:g.1962132G>A показана в соответствующем положении гомологичных последовательностей, можно предположить, что она не играет роли в патогенезе НАО.

Еще одна идентифицированная миссенс-мутация гена *HS3ST6* NC_000016.9:g.1962046C>T (p.A192T) была обнаружена только у одного пациента (№ 3). Мутация локализована в одной из α -цепей (α 6), не затрагивает консервативных позиций белка, хотя и находится на расстоянии нескольких позиций от консервативной области и способна внести изменения в один из участков PAPS (305-309 аминокислотные позиции). По нашим предположениям, последнее обстоятельство может сказываться на неизвестных в настоящее время функциях белка, включающих задействование α 6-цепи желобка белка (предполагаемое место фиксации гепарансульфата) [38]. Обнаруженная миссенс-мутация наблюдается в соответствующем положении в других гомоло-

гичных последовательностях, что свидетельствует о существовании большего количества белков для мутантного остатка, чем для остатка дикого типа. Несмотря на то, что замена p.A192T вносит существенные изменения в стабильность белка, сама мутация оценивается как не имеющая патогенетической значимости. Однако триптофан по размеру, объему и индексу гидропатии сильно отличается от аланина, т. е. повлечет потерю гидрофобных взаимодействий в ядре белка, что, соответственно, приводит к потере физиологических белок-белковых взаимодействий и конформаций внутри белка.

Наибольший интерес для диагностики НАО может иметь новая, ранее не описанная миссенс-мутация NC_000016.9:g.1962024G>A (p.P199L), локализованная в консервативном участке между двумя α -цепями (α 6 и α 7). Интересно отметить, что влияние мутации на белок характеризуется только затрагиванием люменального домена без изменений сайта сплайсинга, подробные данные о влиянии на белок в программе MutationTaster2021 отсутствуют. Тем не менее данная мутация приводит к значительному снижению стабильности белка и оценивается как патогенетически значимая по прогнозам всех использованных в настоящей работе методов анализа. По нашим предположениям, мутация NC_000016.9:g.1962024G>A приводит к увеличению гибкости между двумя α -цепями белка за счет замены пролина, обеспечивающего жесткую конфигурацию белка, на лейцин с изменением индекса гидропатии. Таким образом, нарушается стабильность белка рядом с центрами PAPS, что становится причиной неправильного взаимодействия с гепарансульфатом и нарушения этапа О-сульфатирования синдекана-2, который, как уже было упомянуто выше, обеспечивает связывание НМВК и его эндоцитоз. В результате свободный от связывания с SDC2 высокомолекулярный кининогенин, не подвергаясь эндоцитозу, при контакте с клеточной поверхностью будет легко взаимодействовать с gC1qR и цитокератином-1. При связывании с ними НМВК будет подвергаться повышенному расщеплению калликреином с последующим высвобождением ВК, который и приведет к появлению симптомов НАО. Крайне низкая частота встречаемости замены NC_000016.9:g.1962024G>A в популяции (0,00194) является косвенным подтверждением патогенетической значимости данной мутации.

Авторы предполагают, что миссенс-мутация NC_000016.9:g.1962132G>A (p.A163V),

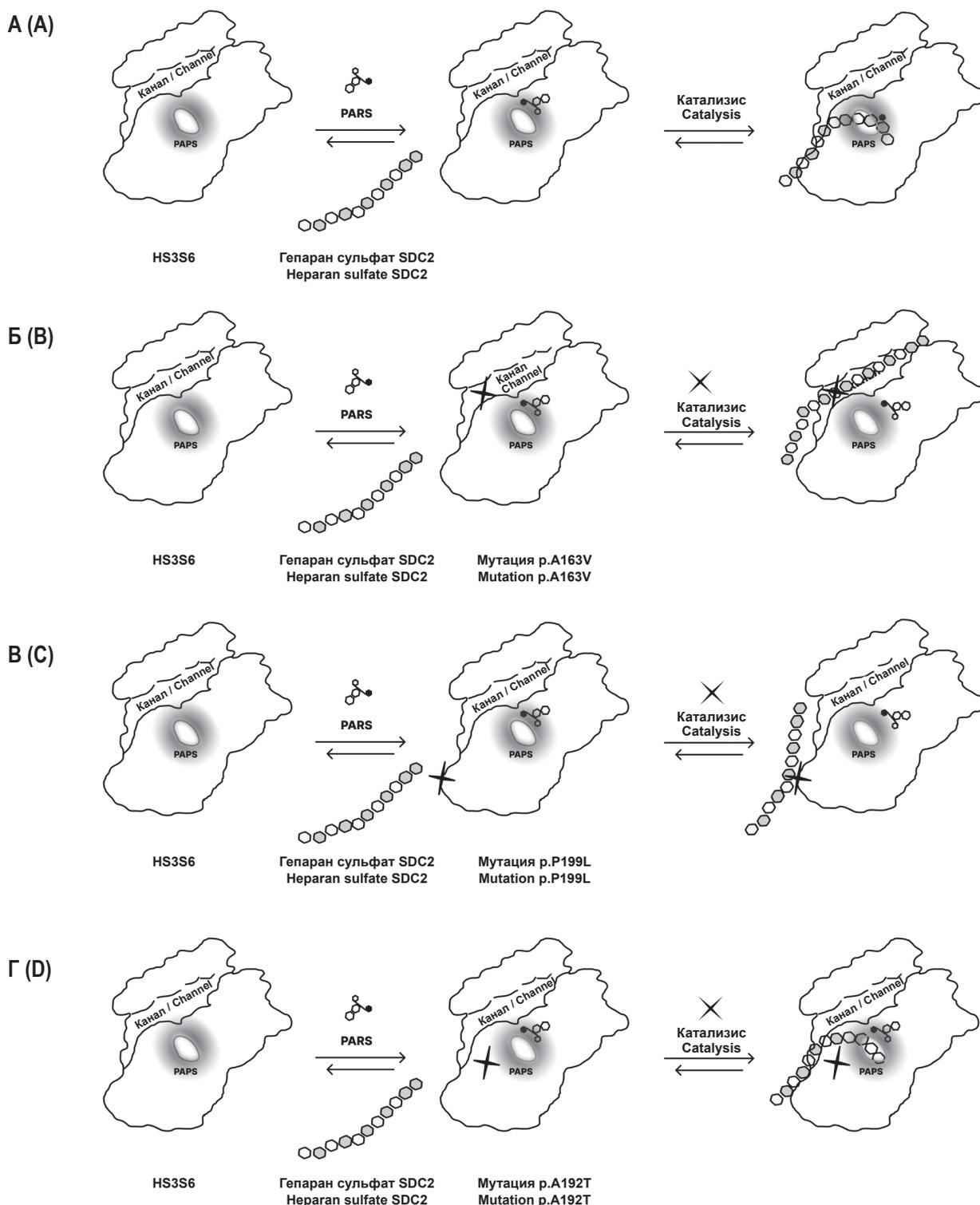


Рисунок 3. Предположительные схемы О-сульфирования гепарансульфата в белке HS3ST6

Примечание. А – этап О-сульфирования гепарансульфата посредством белка без мутаций. Б – этап О-сульфирования гепарансульфата при наличии мутации р.А163V. В – этап О-сульфирования гепарансульфата при наличии мутации р.Р199L. Г – этап О-сульфирования гепарансульфата при наличии мутации р.А192Т.

Figure 3. Presumptive schemes of heparan sulfate O-sulfation in the HS3ST6 protein

Note. (A) The O-sulfation step of heparan sulfate via a protein without mutations. (B) The O-sulfation stage of heparan sulfate in the presence of p.A163V mutation. (C) O-sulfation stage of heparan sulfate in the presence of p.P199L mutation. (D) Heparan sulfate O-sulfation stage in the presence of p.A192T mutation.

NC_000016.9:g.1962046C>T (p.A192T) и NC_000016.9:g.1962024G>A (p.P199L) участвуют в патогенезе НАО по различным сценариям, связанным с нарушением О-сульфирования гепарансульфата (рис. 3).

Таким образом, мы считаем, что мутации NC_000016.9:g.1962132G>A (p.A163V) задействована в патогенезе НАО за счет косвенного или опосредованного нарушения О-сульфирования гепарансульфата непосредственно внутри белка (рис. 3Б). Мутация NC_000016.9:g.1962024G>A (p.P199L), по всей видимости, приводит к развитию заболевания за счет нарушения контакта или объединения с гепарансульфатом SDC2 (рис. 3В). При мутации NC_000016.9:g.1962046C>T (p.A192T) дестабилизация 192 аминокислотной позиции рядом с PAPS, может способствовать срыву О-сульфирования гепарансульфата за счет нарушения функциональной активности белка и, соответственно, катализа переноса сульфогруппы на гепарансульфат синдекана 2 (рис. 3Г). Во всех трех случаях представляется возможным формирование патологии в связи с нарушением этапов О-сульфирования гепарансульфата синдекана 2.

Заключение

Впервые описана миссенс-мутация NP_NC_000016.9:g.1962024G>A (p.P199L), которая способна вызывать клинические симптомы НАО у пациентов даже в случае гетерозиготного носительства и может оцениваться как патогенетически значимая. Миссенс-мутации NC_000016.9:g.1962132G>A (p.A163V) и NC_000016.9:g.1962046C>T (p.A192T) могут рассматриваться как условно патогенетически значимые у лиц с симптоматикой НАО, но требуют более глубокого исследования участия в патогенезе заболевания.

Учитывая, что методы *in silico* открывают новые возможности оценки патогенетической значимости мутаций, применение биоинформатического анализа может способствовать детальному исследованию истоков наследственного ангиоотека. В настоящей работе убедительно показано, что редкие мутации в гене *HS3ST6* могут быть задействованы в патогенезе НАО и провоцировать отеки за счет повышенного релиза брадикинина.

Список литературы / References

1. Близнетц Е.А., Ряднинская Н.В., Галеева Н.М., Кузнецова И.А., Дмитриева А.В., Латышева Т.В., Латышева Е.А., Гусева М.Н., Поляков А.В. ДНК-диагностика наследственного ангионевротического отека и клиническое значение вариантов гена SERPING1. Медицинская генетика. 2018. Т. 17, № 7. С. 11-20. [Bliznetz E.A., Ryadninskaya N.V., Galeeva N.M., Kuznetsova I.A., Dmitrieva A.V., Latysheva T.V., Latysheva E.A., Guseva M.N., Polyakov A.V. DNA diagnostics of hereditary angioedema and the clinical significance of the SERPING1 gene variants. *Meditsinskaya genetika = Medical Genetic*, 2018, Vol. 17, no. 7, pp. 11-20. (In Russ.)]
2. Гусева М.Н., Зинина Е.И., Суспицын Е.Н., Костик М.М. Наследственный ангиоотек – проблема на стыке иммунологии и аллергологии: анализ данных литературы и описание серии 34 случаев. Педиатрия. Журнал им. Г.Н. Сперанского. 2021. Т. 100. № 2. С. 49-56. [Guseva M.N., Zinina E.I., Suspitsyn E.N., Kostik M.M. Hereditary angioedema – a problem at the intersection of immunology and allergology: analysis of literature data and description of a series of 34 cases. *Pediatrics. Zhurnal im. G.N. Speransky = Pediatrics. Journal n.a. G.N. Speransky*, 2021, Vol. 100, no. 2, pp. 49-57. (In Russ.)]
3. Мухина А.А., Кузьменко Н.Б., Родина Ю.А., Кондратенко И.В., Бологов А.А., Латышева Т.В., Продоус А.П., Пампура А.Н., Ильина Н.И., Латышева Е.А., Балашов Д.Н., Костинова А.М., Пашченко О.Е., Зиновьева Н.В., Зимин С.Б., Хорева А.Л., Моисеева А.А., Кутлянцева А.Ю., Филоненко Д.А., Барычева Л.Ю., Аллагулиева С.М., Хачирова Л.С., Сибгатулина Ф.И., Тузанкина И.А., Болков М.А., Шахова Н.В., Камалтынова Е.М., Хайруллина Р.М., Прольгина Д.Д., Кальметьева Л.Р., Давлетбаева Г.А., Мирсаяпова И.А., Сулима Е.И., Гусева М.Н., Тоголян 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., Печкурова А.Д., 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., Демихова Е.В., Демихов В.Г., Калинкина В.А., Тимофеева Е.В., Павлова Т.Б., Шинкарева В.М., Гуркина М.В., Щербина А.Ю., Новичкова Г.А., Румянцев А.Г. Характеристика пациентов с первичными иммунодефицитными состояниями в Российской Федерации: от рождения до старости. Педиатрия. 2019. Т. 98, № 3. С. 24–31. [Mukhina A.A., Kuzmenko N.B., Rodina Yu.A., Kondratenko I.V., Bologov A.A., Latysheva T.V., Prodeus A.P., Pampura A.N., Ilyina N.I., Latysheva E.A., Balashov D.N., Kostinova A.M., Pashchenko O.E., Zinovyeva N.V., Zimin S.B., Khoreva A.L., Moiseyeva A.A., Kutlyantseva A. Yu., Filonenko D.A., Barycheva L.Yu., Allagulyeva S.M., Khachirova L.S., Sibgatulina F.I., Tuzankina I.A., Bolkov M.A., Shakhova N.V., Kamaltynova E.M., Khayrullina R.M., Prolygina D.D.,

Kalmetyeva L.R., Davletbayeva 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., Pechkurova A.D., 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., Timofeyeva E.V., Pavlova T.B., Shinkareva V.M., Gurkina M.V., Shcherbina A.Yu., Novichkova G.A., Rumyantsev A.G. Characteristics of patients with primary immunodeficiency states in the Russian Federation: from birth to old age. *Pediatrics. Zhurnal im. G.N. Speransky = Pediatrics. Journal n.a. G.N. Speransky*, 2019, Vol. 98, no. 3, pp. 24–31. (In Russ.)

4. Мухина А.А., Кузьменко Н.Б., Родина Ю.А., Хорева А.Л., Моисеева А.А., Швец О.А., Кондратенко И.В., Латышева Т.В., Латышева Е.А., Костинова А.М., Пащенко 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., Демихова 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. Журнал 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., Kalmetyeva 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 A.V., 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., U Khanova 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. *Pediatrics. Zhurnal im. G.N. Speransky = Pediatrics. Journal n.a. G.N. Speransky*, 2020, Vol. 99, no. 2, pp. 16–32. (In Russ.)]

5. Печникова Н.А., Останкова Ю.В., Тотолян Арег А. Применение биоинформатического анализа для выявления генов-кандидатов, ассоциированных с наследственным ангиоотекотом. *Медицинская иммунология*. 2022. Т. 24, № 5. С. 1027–1046. [Pechnikova N.A., Ostantkova Yu.V., Totolian Areg A. Applying bioinformatic analysis for prognostic assessment of the HS3ST6 missense mutations clinical significance in the development of hereditary angioedema. *Meditsinskaya Immunologiya = Medical Immunology*, 2022, Vol. 24, no. 5, pp. 1027–1046. (In Russ.)]

6. Awan F.M., Obaid A., Ikram A., Janjua H.A. Mutation-structure-function relationship based integrated strategy reveals the potential impact of deleterious missense mutations in autophagy related proteins on Hepatocellular Carcinoma (HCC): A comprehensive informatics approach. *Int. J. Mol. Sci.*, 2017, Vol. 18, no. 1, 139. doi: 10.3390/ijms18010139.

7. Bork K., Brehler R., Witzke G., Boor S., Heineke W., Hardt J. Blindness, tetraspasticity, and other signs of irreversible brain damage in hereditary angioedema. *Ann. Allergy Asthma Immunol.*, 2017, Vol. 118, no. 4, pp. 520–521.

8. Bork K., Siedlecki K., Bosch S., Schopf R.E., Kreuz W. Asphyxiation by laryngeal edema in patients with hereditary angioedema. *Mayo Clin. Proc.*, 2000, Vol. 75, no. 4, pp. 349–354.

9. 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.

10. Bork K., Wulff K., Witzke G., Hardt J. Hereditary angioedema with normal C1-INH with versus without specific F12 gene mutations. *Allergy*, 2015, Vol. 70, no. 8, pp. 1004–1012.

11. Busse P.J., Christiansen S.C. Hereditary angioedema. *N. Engl. J. Med.*, 2020, Vol. 382, pp. 1136-1148.
12. Depetri F., Tedeschi A., Cugno M. Angioedema and emergency medicine: From pathophysiology to diagnosis and treatment. *Eur. J. Intern. Med.*, 2019, Vol. 59, pp. 8-13.
13. Ercetin E., Richtmann S., Delgado B.M., Gomez-Mariano G., Wrenger S., Korenbaum E., Liu B., DeLuca D., Kühnel M.P., Jonigk D., Yuskaeva K., Warth A., Muley T., Winter H., Meister M., Welte T., Janciauskiene S., Schneider M.A. Clinical significance of SERPINA1 gene and its encoded alpha1-antitrypsin protein in NSCLC. *Cancers (Basel)*, 2019, Vol. 11, no. 9, 1306. doi:10.3390/cancers11091306.
14. Faisant C., Du Thanh A., Mansard C., Deroux A., Boccon-Gibod I., Bouillet L. Idiopathic Non-histaminergic Angioedema: Successful Treatment with Omalizumab in Five Patients. *J. Clin. Immunol.*, 2017, Vol. 37, no. 1, pp. 80-84.
15. Hasan A.A., Cines D.B., Herwald H., Schmaier A.H., Muller-Esterl W. Mapping the cell binding site on high molecular weight kininogen domain 5. *J. Biol. Chem.*, 1995, Vol. 270, pp. 19256-19261.
16. Henderson L.M., Figueroa C.D., Muller-Esterl W., Bhoola K.D. Assembly of contact-phase factors on the surface of the human neutrophil membrane. *Blood*, 1994, Vol. 84, no. 2, pp. 474-482.
17. Kaplan A.P., Joseph K. Pathogenic mechanisms of bradykinin mediated diseases: dysregulation of an innate inflammatory pathway. *Adv. Immunol.*, 2014, Vol. 121, pp. 41-89.
18. Kaplan A.P., Joseph K. The bradykinin-forming cascade and its role in hereditary angioedema. *Ann. Allergy Asthma Immunol.*, 2010, Vol. 104, pp. 193-204.
19. Kyte J., Doolittle R.F. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J. Mol. Biol.*, 1982, Vol. 157, no. 1, pp. 105-132.
20. Maurer M., Grattan C.E.H., Zuraw B.L. Urticaria and angioedema without wheals. *Allergy (Fourth Edition)*, 2012, pp. 247-261.
21. Maurer M., Magerl M., Ansoategui I., Aygören-Pürsün E., Betschel S., Bork K., Bowen T., Balle Boysen H., Farkas H., Grumach A.S., Hide M., Katelaris C., Lockey R., Longhurst H., Lumry W.R., Martinez-Saguer I., Moldovan D., Nast A., Pawankar R., Potter P., Riedl M., Ritchie B., Rosenwasser L., Sánchez-Borges M., Zhi Y., Zuraw B., Craig T. The international WAO/EAACI guideline for the management of hereditary angioedema-The 2017 revision and update. *Allergy*, 2018, Vol. 73, no. 8, pp. 1575-1596.
22. Minafra F.G., Gonçalves T.R., Alves T.M., Pinto J.A. The mortality from hereditary angioedema worldwide: a review of the real-world data literature. *Clin. Rev. Allerg. Immunol.*, 2021, Vol. 62, pp. 232-239.
23. Motta G., Tersariol I.L.S. Modulation of the plasma kallikrein-kinin system proteins performed by heparan sulfate proteoglycans. *Front. Physiol.*, 2017, Vol. 8, 481. doi: 10.3389/fphys.2017.00481.
24. Muñoz E., Xu D., Kemp M., Zhang F., Liu J., Linhardt R.J. Affinity, kinetic, and structural study of the interaction of 3-O-sulfotransferase isoform 1 with heparan sulfate. *Biochemistry*, 2006, Vol. 45, no. 16, pp. 5122-5128.
25. Pac M., Bernatowska E. Comprehensive activities to increase recognition of primary immunodeficiency and access to immunoglobulin replacement therapy in Poland. *Eur. J. Pediatr.*, 2016, Vol. 175, no. 8, pp.1099-1105.
26. Papadopoulou-Alataki E. Upper airway considerations in hereditary angioedema. *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.*, 2010, Vol. 10, no. 1, pp. 20-25.
27. Pommié C., Levadoux S., Sabatier R., Lefranc G., Lefranc M.P. IMGT standardized criteria for statistical analysis of immunoglobulin V-REGION amino acid properties. *J. Mol. Recognit.*, 2004, Vol. 17, no. 1, pp. 17-32.
28. Renné T., Dedio J., David G., Müller-Esterl W. High molecular weight kininogen utilizes heparan sulfate proteoglycans for accumulation on endothelial cells. *J. Biol. Chem.*, 2000, Vol. 275, no. 43, pp. 33688-33696.
29. Renne T., Schuh K., Muller-Esterl W. Local bradykinin formation is controlled by glycosaminoglycans. *J. Immunol.*, 2005, Vol. 175, pp. 3377-3385.
30. Saih A., Baba H., Bouqdayr M., Ghazal H., Hamdi S., Kettani A., Wakrim L. In silico analysis of high-risk missense variants in human ACE2 gene and susceptibility to SARS-CoV-2 infection. *Biomed Res. Int.*, 2021, Vol. 2021, 6685840. doi: 10.1155/2021/6685840.
31. Sambrook J., Russell D. W. Purification of nucleic acids by extraction with phenol:chloroform. *Cold Spring Harb. CSH Protoc.*, 2006, Vol. 1, *pdb.prot4455*. doi: 10.1101/pdb.prot4455.
32. 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.
33. Singh S., Sharma S., Baranwal M. Identification of SNPs in hMSH3/MSH6 interaction domain affecting the structure and function of MSH2 protein. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 2021. doi: 10.1002/bab.2295.
34. Staller K., Lembo A., Banerji A., Bernstein J.A., Shah E.D., Riedl M.A. Consider Hereditary Angioedema in the Differential Diagnosis for Unexplained Recurring Abdominal Pain. *J. Clin. Gastroenterol.*, 2022. doi: 10.1097/MCG.0000000000001744.
35. Steinhaus R., Proft S., Schuelke M., Cooper D.N., Schwarz J.M., Seelow D. MutationTaster2021. *Nucleic Acids Research.*, 2021, Vol. 49, no. W1, pp. W446-W451.
36. Spiess B.D., Armour S., Horrow J., Kaplan J.A., Koch C.G., Karkouti K., Body S.C. Transfusion medicine and coagulation disorders. Kaplan's essentials of cardiac anesthesia. Ed. Kaplan J.A., 2018, pp. 685-714.

37. Wang Z., Huang C., Lv H., Zhang M., Li X. In silico analysis and high-risk pathogenic phenotype predictions of non-synonymous single nucleotide polymorphisms in human Crystallin beta A4 gene associated with congenital cataract. *PLoS One*, 2020, Vol. 15, no. 1, e0227859. doi:10.1371/journal.pone.0227859.

38. Wells M.J., Hatton M.W., Hewlett B., Podor T.J., Sheffield W.P., Blajchman M.A. Cytokeratin 18 is expressed on the hepatocyte plasma membrane surface and interacts with thrombin-antithrombin complexes. *J. Biol. Chem.*, 1997, Vol. 272, no. 45, pp. 28574-28581.

39. Xu D., Tiwari V., Xia G., Clement C., Shukla D., Liu J. Characterization of heparan sulphate 3-O-sulphotransferase isoform 6 and its role in assisting the entry of herpes simplex virus type 1. *Biochem. J.*, 2005, Vol. 385, Pt 2, pp. 451-459.

Авторы:

Печникова Н.А. — младший научный сотрудник лаборатории иммунологии и вирусологии ВИЧ-инфекции ФБУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера», Санкт-Петербург, Россия

Останкова Ю.В. — к.б.н., заведующая лабораторией иммунологии и вирусологии ВИЧ-инфекции, старший научный сотрудник лаборатории молекулярной иммунологии ФБУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера», Санкт-Петербург, Россия

Сайтгалина М.А. — младший научный сотрудник лаборатории молекулярной иммунологии ФБУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера», Санкт-Петербург, Россия

Беляков А.М. — лаборант-исследователь лаборатории иммунологии и вирусологии ВИЧ-инфекции ФБУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера», Санкт-Петербург, Россия

Денисова А.Р. — к.м.н., ассистент кафедры детских болезней, Клинический институт детского здоровья имени Н.Ф. Филатова ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Министерства здравоохранения РФ (Сеченовский университет); ведущий научный сотрудник Научно-исследовательского института педиатрии и охраны здоровья детей Научно-клинического центра № 2 ФГБНУ «Российский научный центр хирургии имени академика Б.В. Петровского», Москва, Россия

Подчерняева Н.С. — д.м.н., профессор кафедры детских болезней, Клинический институт детского здоровья имени Н.Ф. Филатова ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Министерства здравоохранения РФ (Сеченовский университет), Москва, Россия

Тотolian Арег А. — д.м.н., профессор, академик РАН, заведующий лабораторией молекулярной иммунологии, директор ФБУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера»; заведующий кафедрой иммунологии ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Authors:

Pechnikova N.A., Junior Research Associate, Laboratory of Immunology and Virology HIV, Saint Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation

Ostankova Yu.V., PhD (Biology), Head, Laboratory of Immunology and Virology HIV, Senior Research Associate, Laboratory of Molecular Immunology, Saint Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation

Saitgalina M. A., Junior Junior Research Associate, Laboratory of Molecular Immunology, Saint Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation

Bebyakov A.M., Laboratory Assistant, Laboratory of Immunology and Virology HIV, Saint Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation

Denisova A.R., PhD (Medicine), Assistant Professor, Department of Children's Diseases, N. Filatov Clinical Institute of Children's Health, I. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University); Leading Research Associate, Research Institute of Pediatrics and Children's Health, Scientific and Clinical Center No. 2, B. Petrovsky Russian Scientific Center of Surgery, Moscow, Russian Federation

Podchernyaeva N.S., PhD, MD (Medicine), Professor, Department of Children's Diseases, N. Filatov Clinical Institute of Children's Health, I. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russian Federation

Totolian Areg A., PhD, MD (Medicine), Professor, Full Member, Russian Academy of Sciences, Head, Laboratory of Molecular Immunology, Director, Saint Petersburg Pasteur Institute; Head, Department of Immunology, First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Поступила 01.09.2022

Принята к печати 16.10.2022

Дата онлайн-публикации 18.11.2022

Received 01.09.2022

Accepted 16.10.2022

Date of publication online 18.11.2022

СУБПОПУЛЯЦИОННЫЙ СОСТАВ ЛИМФОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ПРИ COVID-19

Свирищевская Е.В.^{1,2}, Коновалова М.В.¹, Садыков В.Ф.²,
Пырегов А.В.², Полтавцева Р.А.²

¹ ФГБУН «Институт биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова»
Российской академии наук, Москва, Россия

² ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии
имени академика В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Резюме. Патогенез тяжелой коронавирусной инфекции COVID-19 ассоциирован с активацией иммунной системы, цитокиновым штормом, нарушением гемостаза крови, микрососудистым тромбозом, ишемией органов и синдромом полиорганной дисфункции. Роль различных субпопуляций при COVID-19 до сих пор дискутируется. Целью исследования являлся анализ субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови больных COVID-19 по сравнению со здоровыми донорами.

В исследование включили 20 больных COVID-19 (11 мужчин и 9 женщин) и 26 здоровых доноров. Средний возраст больных составил 52 и 56 лет соответственно. Лимфоциты периферической крови выделяли на градиенте фиколла. Клетки окрашивали антителами к основным популяциям лимфоцитов, маркерам эндотелиальных клеток и апоптоза. Анализ проводили методом проточной цитометрии. Клинические данные получены стандартными лабораторными методами. Результаты показали, что у всех больных были повышены С-реактивный белок (в 14-35 раз), ферритин (в 1,2-13 раз), D-Димеры (в 1,2-90 раз). У 55% мужчин наблюдали снижение абсолютного числа лимфоцитов, у женщин этот показатель находился на нижней границе нормы. Цитометрический анализ показал, что среди лимфоцитов периферической крови доля функциональных клеток, экспрессирующих маркер CD45, у 70% больных составляла от 2 до 12% при 80-99% у всех доноров. Доля CD45⁺ лимфоцитов достоверно коррелировала с уровнем гемоглобина, но не с уровнями воспалительных биохимических маркеров. Среди функциональных лимфоцитов больных наблюдали снижение доли CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺T-клеток, увеличение доли натуральных киллеров CD56⁺ и уровня апоптотических клеток AnnexinV⁺, но не было изменения в доле В-клеток CD19 и HLA-DR⁺. Анализ субпопуляций ЛЦ, не экспрессирующих маркер CD45, показал наличие в этой фракции всех популяций лимфоцитов со сниженной экспрессией CD4, CD8, CD19, CD56 и других в крови больных и доноров. Отличием между больными и донорами был высокий процент эндотелиальных клеток, экспрессирующих маркер CD62P.

Адрес для переписки:

Свирищевская Елена Викторовна
ФГБУН «Институт биоорганической химии имени
академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова»
Российской академии наук
117997, Россия, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10.
Тел.: 8 (910) 464-87-60.
E-mail: esvir@mail.ibch.ru

Address for correspondence:

Elena V. Svirshchetskaya
Shemyakin—Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry,
Russian Academy of Sciences
16/10 Miklukho-Maclay St
Moscow
117997 Russian Federation
Phone: +7 (910) 464-87-60.
E-mail: esvir@mail.ibch.ru

Образец цитирования:

Е.В. Свирищевская, М.В. Коновалова, В.Ф. Садыков,
А.В. Пырегов, Р.А. Полтавцева «Субпопуляционный
состав лимфоцитов периферической крови при
COVID-19» // Медицинская иммунология, 2023. Т. 25,
№ 1. С. 155-166. doi: 10.15789/1563-0625-SCO-2552

© Свирищевская Е.В. и соавт., 2023
Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

E.V. Svirshchetskaya, M.V. Konovalova, V.F. Sadykov,
A.V. Pyregov, R.A. Poltavtseva "Subpopulation composition
of peripheral blood lymphocytes in COVID-19", *Medical
Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2023,
Vol. 25, no. 1, pp. 155-166.

doi: 10.15789/1563-0625-SCO-2552

© Svirshchetskaya E.V. et al., 2023
The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License

DOI: 10.15789/1563-0625-SCO-2552

Определение лабораторными методами количества лимфоцитов в крови больных COVID-19 не отражает реальную картину тяжести заболевания и требует определения доли функциональных клеток, экспрессирующих CD45.

Ключевые слова: COVID-19, лимфоциты периферической крови, экспрессия CD45, проточная цитометрия, апоптоз, эндотелий

SUBPOPULATION COMPOSITION OF PERIPHERAL BLOOD LYMPHOCYTES IN COVID-19

Svirshchevskaya E.V.^{a, b}, Konovalova M.V.^a, Sadykov V.F.^b,
Pyregov A.V.^b, Poltavtseva R.A.^b

^a Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

^b V. Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology, Moscow, Russian Federation

Abstract. The pathogenesis of severe coronavirus infection COVID-19 is associated with activation of immune system, cytokine storm, impaired blood clotting, microvascular thrombosis, organ ischemia and multiple organ dysfunction syndrome. The role of various lymphocyte subpopulations in COVID-19 is still debated. The aim of our study was to analyze the subpopulational profile of peripheral blood lymphocytes in COVID-19 patients as compared with healthy donors.

The study included 20 COVID-19 patients (11 males and 9 females,) and 26 healthy donors. Average age of the patients was 52 and 56 years, respectively. Clinical examinations were performed by standard laboratory methods. Peripheral blood lymphocytes were isolated in the Ficoll gradient. The cells were stained with antibodies to specific antigens of main lymphocyte populations, endothelial cells, and apoptotic cell markers. The analysis was performed by flow cytometry. The results showed that all patients had elevated C-reactive protein (14- to 35-fold), ferritin (1.2- to 13-fold), D-dimers (1.2- to 90-fold). 55% of men had a decrease in the absolute number of lymphocytes, in women this index was at the low normal limit. Cytometric analysis showed that, among peripheral blood lymphocytes, the proportion of functional cells expressing the CD45 marker ranged from 2 to 12% in 70% of patients, as compared with 80-99% among the donors. The proportion of CD45⁺ lymphocytes significantly correlated with the level of hemoglobin, but not with the levels of inflammatory biochemical markers. Among the functional lymphocytes of patients, there was a decrease in the proportion of CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺T cells, increased proportion of natural killer CD56⁺ and the apoptotic (AnnexinV⁺) cell contents, but the proportion of CD19 and HLA-DR⁺B cells was not changed. Analysis of the lymphocyte (LC) subpopulations that did not express CD45 marker showed that this fraction contained different lymphocyte subsets with reduced expression of CD4, CD8, CD19, CD56 etc. in the blood of patients and donors. Higher percentage of endothelial cells expressing CD62P marker made the difference between patients and donors.

Laboratory determination of lymphocyte subsets in blood samples of COVID-19 patients does not reflect the real severity pattern of the disease, thus requiring studies of the CD45-expressing functional cell populations.

Keywords: COVID-19, lymphocyte subpopulations, CD45, flow cytometry, apoptosis, endothelium

Введение

Продолжающаяся вспышка коронавирусной инфекции COVID-19 требует детального понимания патогенеза заболевания. В настоящее время инфекции, вызванные COVID-19, классифицируются как тяжелые, легкие или бессимптомные, а также критические (острый респираторный дистресс-синдром, сепсис). Неблагоприятные

прогностические факторы включают изменения в легких по типу «матового стекла» при компьютерной томографии, лимфопению, бактериальную ко-инфекцию, значительное повышение маркеров воспаления (С-реактивный белок, ферритин, D-Димеры, прокальцитонин), коморбидные хронические заболевания, такие как гипертония и диабет, возраст старше 60 лет [2]. Снижение количества лимфоцитов (ЛЦ) в кро-

ви однозначно показывает, что иммунитет принимает непосредственное участие в патогенезе инфекции [2]. Однако с точки зрения клеточной иммунной функции не ясно, как провести различие между нетяжелыми и тяжелыми случаями. Различие между нетяжелыми и тяжелыми случаями пневмонии COVID-19 напрямую влияет на выживаемость пациентов и варианты лечения.

Роль различных субпопуляций клеток крови активно изучается. Так, выявили увеличение в крови фибробластов, несущих маркеры CD45⁺/CD15⁺/CD34⁺/коллаген-1⁺ [6]. Однако доля таких клеток повышалась незначительно (3,6% против 2,1% в контроле). Секвенирование транскриптома отдельных клеток и Т-клеточного/В-клеточного рецептора в образцах ЛЦ периферической крови, собранных у бессимптомных, умеренных и тяжелых пациентов, а также здоровых доноров показало увеличение CD56⁺CD16⁺ естественных киллеров (NK), экспансию эффекторных CD4⁺Т-клеток, но не В-клеток у тяжелых больных по сравнению с пациентами средней тяжести [21]. Аналогичное исследование на клональном уровне показало увеличение доли дендритных клеток, CD14⁺ моноцитов и клеток-предшественников мегакариоцитов, уменьшение наивных CD4⁺Т-лимфоцитов, CD8⁺Т-лимфоцитов и естественных киллеров у пациентов с COVID-19 [10]. Анализ пула клеток показал уменьшение доли дендритных клеток, снижение экспрессии CD86, увеличение доли CD163⁺CD14⁺ клеток и повышение экспрессии лиганда программируемой смерти 1 в дендритных клетках и моноцитах [20].

Анализ бронхоальвеолярной лаважной жидкости у 88 пациентов с дыхательной недостаточностью, вызванной SARS-CoV-2, и у 211 пациентов с известной или предполагаемой пневмонией, вызванной другими патогенами, показал, что у большинства COVID-19 пациентов альвеолярное пространство постоянно обогащалось Т-клетками и моноцитами [7]. Авторы заключили, что SARS-CoV-2 вызывает медленно развивающийся пространственно ограниченный альвеолит, при котором альвеолярные макрофаги, содержащие SARS-CoV-2 и Т-клетки, вызывает стойкое альвеолярное воспаление. Накопление Т- и NK-клеток, но не нейтрофилов и макрофагов в легких больных показано на клеточном уровне и другими группами [3, 4].

Роль ЛЦ при COVID-19 связана с цитокиновым штормом. Показано, что повышение уровня цитокинов коррелирует с тяжестью заболевания, а также со снижением доли CD8 Т-клеток [19].

Снижение доли CD3, CD8 и CD45 Т-клеток и их функциональной активности, увеличение доли натуральных киллеров могут быть прогно-

стическими факторами тяжести заболевания [12, 14]. Таким образом, все основные субпопуляции ЛЦ периферической крови вовлечены в патогенез COVID-19. Однако для понимания, какие из этих изменений играют ключевую роль, требуется одновременный анализ все основных субпопуляций ЛЦ периферической крови.

Целью настоящего исследования являлся анализ изменения субпопуляционного состава ЛЦ периферической крови больных с тяжелым течением COVID-19 и сравнение изменений с клиническими параметрами. Результаты этого исследования помогут выявить иммунные изменения, вызванные инфекцией COVID-19, а также провести различие между тяжелыми и нетяжелыми случаями.

Материалы и методы

Выделение периферических мононуклеарных клеток

В исследование включили 20 больных COVID-19, госпитализированных в отделение реанимации ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России, Москва, и 26 здоровых доноров. Все исследования с участием клеток человека проводились в соответствии с руководящими принципами Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации. Протокол эксперимента был одобрен Институциональной этической комиссией Национального медицинского исследовательского центра акушерства, гинекологии и перинатологии, протокол № 8 от 26.08.2021.

Мононуклеарные клетки периферической крови получали градиентным центрифугированием с использованием стандартного раствора Ficoll (PanEco, Россия), плотность 1,077.

Иммуноокрашивание и проточная цитометрия

Клетки окрашивали комбинацией моноклональных антител (МАВ) и анализировали, как описано ранее (39). Для окрашивания использовали следующие МАВ: CD3-PE-Cy7 (клон UCST1), CD56-APC (клон N901), CD56-PE (клон N901), CD45RO-PE (клон UCST1) (Beckman Coulter); CD56-Brilliant Violet 421 (клон HCD56), CD56-PE-Cy7 (клон 5.1H11), анти-HLA-DR-PE (клон L243), AnnexinV-FITC (Sony Biotechnology); CD45RA-PE (клон HI100), CCR7-PE (клон G043H7) (Biolegend); CD45RA-Brilliant Violet 421 (клон HI100), CD45RO-FITC (клон UCST1), CD3-APC (BD Biosciences, США, клон UCST1), CD4-FITC (Сорбент, РФ, клон 1), CD8-PerCP Cy5.5 (Immunotech, Франция, клон B9.11).

Многоцветный проточный цитометрический анализ проводили на проточном цитометре MACSQuant Tyro (Miltenyi, Германия). Поверх-

ностное флуоресцентное иммуноокрашивание проводили в течение 60 мин на льду в буфере для окрашивания (PBS, содержащий 0,5% BSA (бычий сывороточный альбумин) (Serva, Гейдельберг, Германия) и 0,01% азида натрия (AMRESCO, Inc. (VWR International, LLC), Aurora, CO, США). Регистровали по меньшей мере 30 000 событий в лимфоцитарном окне. Полученные данные анализировали с использованием программы FlowJo версия 10 (FlowJo LLC, Эшленд, Орегон, США).

Статистический анализ

Статистический анализ проводился с использованием программного обеспечения Excel, t-критерия Стьюдента и корреляции по Пирсону. Значения сравнения при $p < 0,05$ считались статистически значимыми.

Результаты

Клиническая картина COVID-19 у мужчин и женщин

В исследование включили 20 больных с COVID-19, 11 мужчин и 9 женщин со средним возрастом 52 и 56 лет соответственно (табл. 1). Для сравнения провели анализ иммунного статуса 26 здоровых доноров, средний возраст 47 ± 17 , из них 13 человек со средним возрастом 28 ± 4 лет и 13 человек со средним возрастом 61 ± 4 . У всех мужчин с COVID-19 были повышены уровни С-реактивного белка (CRP), ферритина и D-димеров, у 45% был также повышен прокальцитонин. У всех женщин был повышен CRP, у 67% был повышен ферритин и прокальцитонин, у 89% – D-димер. У мужчин средние показатели по уровню ферритина и D-димерам были примерно в 1,5 раза выше, чем у женщин. Общее количество лейкоцитов было повышено у 27% мужчин и 44% женщин. При этом у 55% мужчин было снижено как абсолютное, так и относительное количество лимфоцитов. У всех женщин за исключением одного случая в повышенном количестве ЛЦ находились на нижней границе нормы. Соответственно, практически у всех больных было повышено относительное количество нейтрофилов. Количество тромбоцитов и моноцитов изменялось незначительно. Только у 18% мужчин снижался уровень гемоглобина, тогда как у 67% женщин наблюдали сниженный гемоглобин. Из 9 женщин с COVID-19 две умерли (22%).

Все клинические показатели здоровых доноров находились в пределах нормы (данные не приводятся). При анализе иммунного статуса здоровых доноров групп 28 ($n = 13$) и 61 ($n = 13$) лет достоверных различий не было за исключением снижения доли $CD8^+$ Т-клеток с $30,7 \pm 6,4\%$ до $25,5 \pm 7,7\%$ ($p = 0,049$) и увеличения доли активированных Т-клеток $CD3^+HLA-DR^+$ с $1,1 \pm 0,4$

до $3,4 \pm 3,3$ ($p = 0,044$) у доноров старшей группы по сравнению с молодыми донорами.

Для понимания, какие клинические параметры наиболее значимы, мы провели корреляционный анализ по Пирсону уровней CRP, ферритина, D-димеров, прокальцитонина, гемоглобина и долей $CD45^+$ ЛЦ в крови. Ни в одной из комбинаций клинических данных биохимических маркеров воспаления достоверных корреляций не было. Две достоверные корреляции были выявлены между уровнями CRP и гемоглобина с долей $CD45^+$ ЛЦ у мужчин и только гемоглобина с долей $CD45^+$ ЛЦ у женщин (табл. 1, где r – коэффициент корреляции Пирсона). Корреляция с CRP была отрицательной, т. е. чем больше показатели CRP, тем меньше было $CD45^+$ ЛЦ.

Субпопуляционный состав лимфоцитов периферической крови больных COVID-19 и здоровых доноров

При анализе иммунного статуса мужчин и женщин с COVID-19 достоверные различия наблюдали только по доле В-клеток ($CD19^+HLA-DR^+$): у женщин доля В-клеток была в 2,5 раза ниже, чем у мужчин (6 ± 4 и 15 ± 10 соответственно, $p = 0,005$). Далее приведены усредненные данные по всем больным.

На рисунке 1 приведены репрезентативные данные проточной цитометрии. Для анализа выбирали пятно лимфоцитов (рис. 1А, Д), с помощью ядерного красителя DAPI отсекали все мертвые клетки и выбирали зону синглетных клеток (не показано), далее выделяли популяцию $CD45^+$ клеток (рис. 1Б, Е) и уже в этой популяции анализировали субпопуляции лимфоцитов. Первое и самое значительное отличие наблюдали в доле $CD45^+$ ЛЦ. У больных COVID-19 доля $CD45^+$ клеток была в 4 раза ниже, чем у доноров (рис. 2А, $p < 0,0001$).

Фермент тирозинфосфатаза $CD45$, известный как общий антиген лейкоцитов (LCA) или рецептор белковой тирозинфосфатазы типа С (PTPRC), экспрессируется на поверхности всех ядросодержащих клеток гемопоэтического происхождения. В Т-клетках она может составлять до 10% белков клеточной поверхности [5]. $CD45$ необходим для передачи сигнала Т-клеткам через Т-клеточный рецептор (TCR), в меньшей степени В-клеткам [8, 9, 16]. Потеря экспрессии $CD45$ означает потерю функциональной активности ЛЦ, как минимум активность Т-клеток, составляющих основную часть ЛЦ периферической крови.

При анализе субпопуляционного состава $CD45^+$ ЛЦ были выявлены все основные типы клеток: $CD3^+$ Т-клетки, $CD19^+HLA-DR^+$ В-клетки как у доноров (рис. 1В), так и у больных (рис. 1Ж); естественные киллеры (NK)

ТАБЛИЦА 1. КЛИНИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ БОЛЬНЫХ С ТЯЖЕЛОЙ ФОРМОЙ COVID-19

TABLE 1. CLINICAL INDICATORS OF PATIENTS WITH SEVERE COVID-19

№ No.	Возраст Age	Лейкоциты, абс. WBC, abs.	Лимфоциты, абс. Lymphocytes, abs.	Нейтрофилы, % PMN, %	Моноциты, % Monocytes, %	Тромбоциты Platelets	С-реактивный белок CRP	Ферритин Ferritin	D-димеры D-dimer	Прокальцитонин Procalcitonin	Гемоглобин Hemoglobin	CD45 ⁺
Норма Norm		3,8-9,7 × 10 ⁹ /л 3.8-9.7 × 10 ⁹ /L	1-4 × 10 ⁹ /л 1-4 × 10 ⁹ /L	42-75	2-11	150-400 × 10 ⁹ /л 150-400 × 10 ⁹ /L	0-5 мкг/мл 0-5 µg/mL	20-250 мкг/л 20-250 µg/L	< 450 нг/мл < 450ng/mL	0-0,5 нг/мл 0-0.5 ng/mL	117-160 г/л 117-160 g/L	> 70
Мужчины Males												
1	68	9,1	0,5↓*	88 ↑	4,8	234	176	806	6335	1,7	118	1
2	46	15 ↑**	1,5	79 ↑	6,9	303	94	3283	1045	11,0	111 ↓	6
3	46	7,2	0,5↓	83 ↑	7,8	269	206	2354	536	1,9	131	7
4	67	5,2	0,5↓	80 ↑	7,7	284	84	444	2805	1,5	119	8
5	55	13 ↑	1,1	83 ↑	6,1	357	145	270	2265	3,2	125	10
6	41	8,5	0,9↓	82 ↑	5,1	206	169	3011	1064	2,2	120	10
7	38	14 ↑	1,0	86 ↑	4,5	339	169	690	41276	0,4	94 ↓	12
8	58	9,1	0,5↓	86 ↑	6,4	226	113	1168	13754	0,3	135	75
9	66	10,6	1,2	79 ↑	8,7	332	116	1093	3433	0,3	143	77
10	36	11,8	0,8↓	88 ↑	4,6	573	111	1134	1298	0,2	144	79
11	72	6,8	1,0	71	12,5	171	70	292	653	0,3	149	80
Средний возраст Average age 52±12					r***		-0,54 p < 0,05				0,79 p < 0.005	
Женщины Females												
1	40	43 ↑	10 ↑	75	4,5	586	191	1381	7672	5,8	73 ↓	3
2	67	13 ↑	1,2	82 ↑	6,7	434	95	67	4839	0,1	79 ↓	2
3	34	16 ↑	1,2	85 ↑	6,6	300	129	217	10067	13,0	84 ↓	4
4	69	18 ↑	1,7	83 ↑	6,5	127	131	1518	11154	4,2	103 ↓	11
5	71	7,9	1,1	81 ↑	5,3	207	101	931	946	1,0	104	10
6	73	7,6	1,1	77 ↑	6,2	228	154	390	2078	1,1	82 ↓	8
7	48	5,7	1,2	70	8,6	334	56	175	736	0,1	105 ↓	11
8	47	9,5	1,2	82 ↑	5,0	349	142	749	279	4,7	133	82
9	56	9,7	1,6	72	11,2	626	125	339	741	0,0	126	56
Средний возраст Average age 56±16					r						0,92 p < 0,0005	

Примечание. * ↓ – достоверное снижение, отмечено жирным и полужирным шрифтом; ** ↑ – достоверное повышение, отмечено жирным шрифтом; *** – коэффициент корреляции Пирсона гемоглобин / доля CD45⁺ клеток.

Note. * ↓, significant decrease, marked in bold and italics; ** ↑, significant increase, marked in bold; ***, pearson correlation coefficient hemoglobin/proportion of CD45⁺ cells.

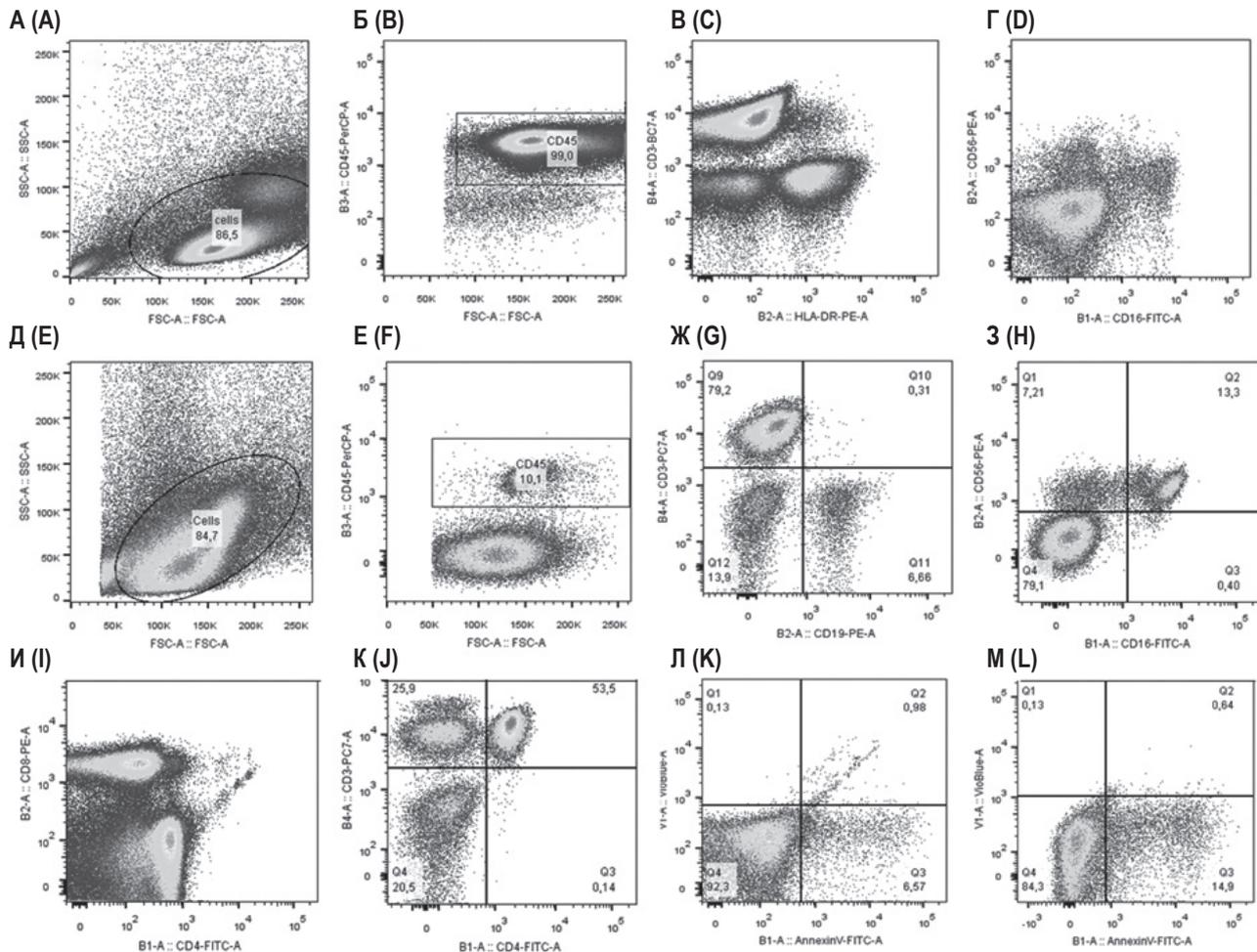


Рисунок 1. Анализ субпопуляций лимфоцитов в крови больных COVID-19 и здоровых доноров

Примечание. Анализ субпопуляций в регионе пятен лимфоцитов (А, Д, овалы) и CD45⁺ клеток (Б, Е, прямоугольники). Общий вид распределения по размеру и гранулярности (А, Д), экспрессии CD45 (Б, Е), CD3, HLA-DR, CD19 (В, Ж), CD16, CD56 (Г, З) клеток доноров (А-Г) и больных COVID-19 (Д-З). Распределение Т-клеток по экспрессии CD4, CD3, CD8 в клетках доноров (И) и больных (К). Уровень апоптоза по AnnexinV в клетках доноров (Л) и больных (М). Приведены репрезентативные данные.

Figure 1. Analysis of lymphocyte subpopulations in the blood of COVID-19 patients and healthy donors

Note. Analysis of subpopulations in the region of lymphocytes (A, E ovals) and CD45⁺ cells (B, F, rectangles). An overview of the distribution by size and granularity (A, F), expression of CD45 (B, F), CD3, HLA-DR, CD19 (C, G), CD16, CD56 (B, H) of donor cells (A-E) and COVID-19 patients (E-H). Distribution of T cells by the expression of CD4, CD3, CD8 in the donors' (I) and patients' (J) cells. The level of apoptosis according to AnnexinV staining in the donors' (K) and patients' (L) cells. Representative data are presented.

CD16⁺CD56⁺ (рис. 1Г, З). Из Т-клеток определялись CD4⁺Т-хелперы и CD8⁺ цитотоксические клетки (рис. 1И, К). Доля апоптотических клеток ЛЦ AnnexinV⁺ была выше у больных по сравнению с донорами (рис. 1Л, М). Суммарные данные по субпопуляциям в крови больных COVID-19 и доноров приведены на рисунке 2.

Среди различных субпопуляций достоверное снижение при COVID-19 выявили доли CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺Т-клеток (рис. 2А). При этом CD8⁺ клетки гибли больше, что привело к достоверному увеличению индекса CD4/CD8 (рис. 2Б). Не было достоверных различий в доли В-клеток

(рис. 2Е). Среди ЛЦ больных был повышен уровень апоптотических клеток (рис. 2Д).

Одним из вопросов является анализ Т-клеток памяти, характеризующихся экспрессией маркеров CCR7, CD62L, CD45RA, CD45RO. В зависимости от функционального состояния Т-клетки экспрессируют различные сочетания этих маркеров. Наивные непримированные Т-клетки экспрессируют CD45, CD3, CCR7, CD62L, CD45RA (Т на ve); транзитные Т-клетки из наивных в эффекторы характеризуется экспрессией CD45, CD3, CCR7, CD62L, CD45RO, называемые центральными клетками памяти (Тcm);

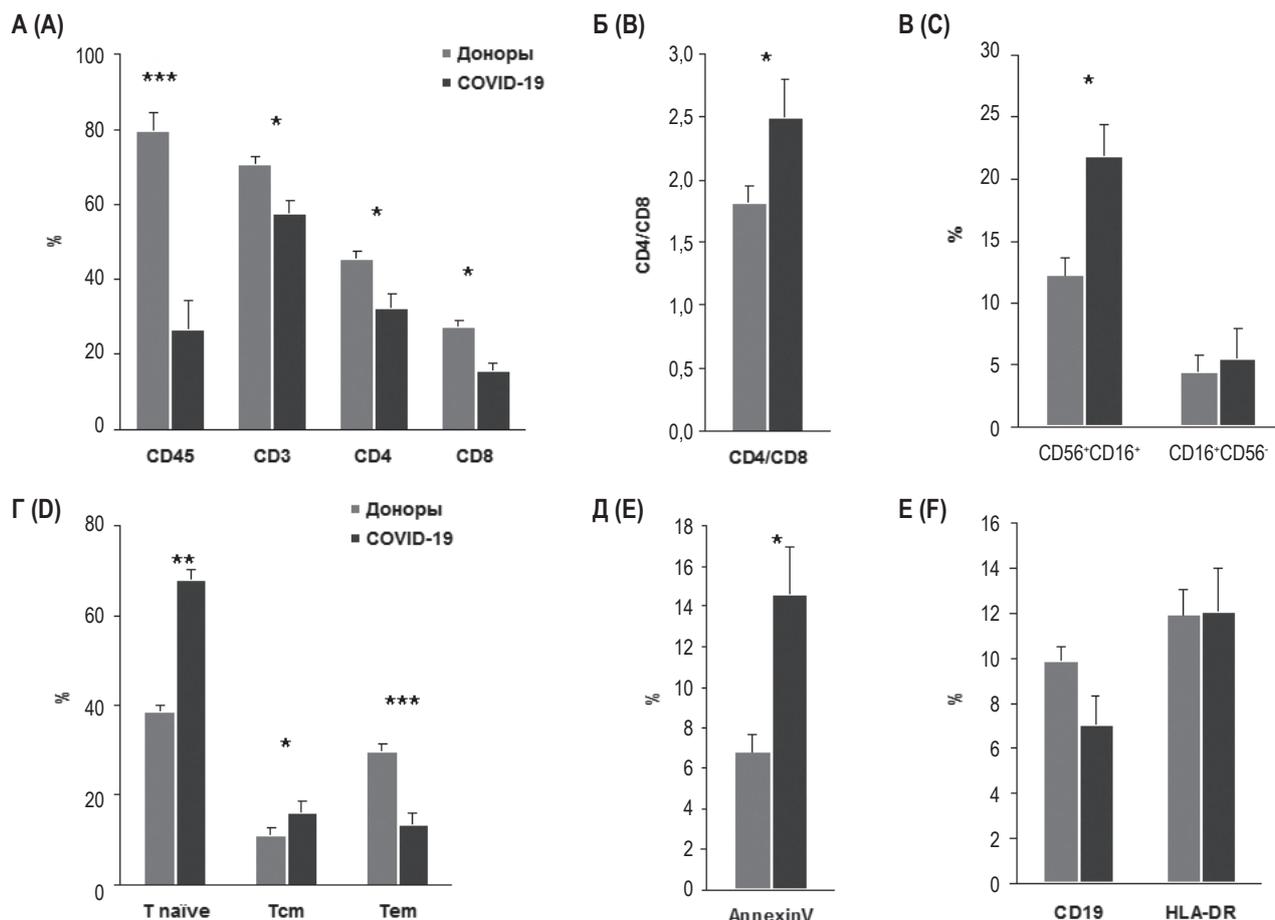


Рисунок 2. Усредненные данные по субпопуляционному составу лимфоцитов периферической крови доноров и больных COVID-19

Примечание. Доли функциональных лимфоцитов CD45⁺, CD3, CD4, CD8 (А); соотношение CD4/CD8 (Б); естественных киллеров CD16⁺CD56⁺ (В); CD19⁺HLA-DR⁺В-клеток (Е) в крови доноров (серые гистограммы) и больных (черные гистограммы). Доли наивных Т-клеток (T naïve, CCR7⁺CD62L⁺), Т-клеток центральной памяти (Tcm, CCR7⁺CD45RO⁺), Т-клеток эффекторов (Tem, CCR7⁺CD45RO⁺) проведены в окне CD3⁺ клеток (Г); дол апоптотических лимфоцитов (AnnexinV⁺, Д). Достоверные различия отмечены звездочками, где *, ** и *** обозначают уровни достоверности по t-критерию Стьюдента < 0,05; 0,01 и 0,001 соответственно.

Figure 2. Averaged data on the subpopulations of the peripheral blood lymphocytes from donors and COVID-19 patients
Note. The proportion of functional lymphocytes CD45⁺, CD3, CD4, CD8 (A); CD4/CD8 ratio (B); natural killer CD16⁺CD56⁺ (C); CD19⁺HLA-DR⁺B cells (F) in the blood of donors (gray histograms) and patients (black histograms). The shares of naïve T cells (T naïve, CCR7⁺CD62L⁺), central memory T cells (Tcm, CCR7⁺CD45RO⁺), effector T cells (Tem, CCR7⁺CD45RO⁺) were carried out in the CD3⁺ cell window (D); the shares of apoptotic lymphocytes (AnnexinV⁺, E). Significant differences are marked with asterisks, where *, ** and *** denote the levels of confidence according to the Student's t criterion < 0.05, 0.01 and 0.001, respectively.

эффекторные терминальные Т-клетки памяти не экспрессируют маркеров наивных Т-клеток CCR7 и CD62L, но экспрессируют маркеры памяти CD45, CD3, CD45RO (Tem) [13, 18]. Анализ субпопуляций Т-клеток памяти проведен с окне CD3⁺ Т-клеток. При COVID-19 погибают в первую очередь эффекторные Т-клетки (Tem), замещающиеся наивными (Tnaïve) и транзитными (Tcm) Т-клетками (рис. 2Г).

Приведенные на рисунках 1 и 2 данные соответствуют процентам от общего количества ЛЦ

периферической крови. С учетом значительного снижения (в 2-10 раз) доли CD45⁺ клеток абсолютное количество каждой из субпопуляций значительно меньше, чем в крови здоровых доноров.

Субпопуляционный состав CD45-лимфоцитов периферической крови больных COVID-19 и здоровых доноров

Большая доля клеток из пятна ЛЦ (рис. 1А, Д) не экспрессирует основной маркер CD45 (рис. 1Б, Е). Для анализа состава негативных по CD45 клеток выбирали регион CD45⁻ (рис. 3А, Д, пря-

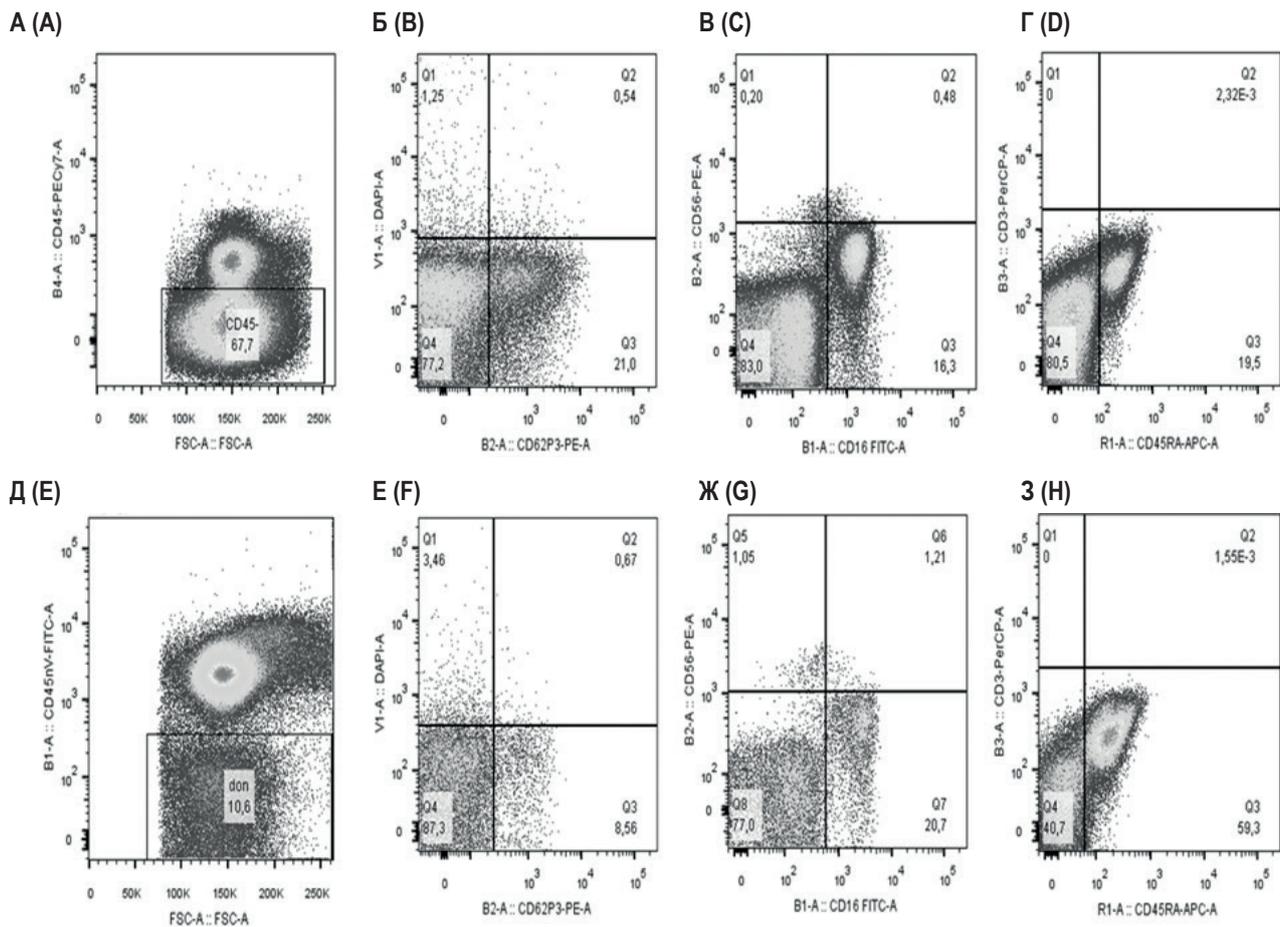


Рисунок 3. Анализ CD45-субпопуляций лимфоцитов в крови больных COVID-19 и здоровых доноров

Примечание. Анализ субпопуляций в регионе пятен лимфоцитов и CD45-клеток (А, Д, прямоугольники). Общий вид распределения по размеру и экспрессии CD45 (А, Д), экспрессии CD62P (Б, Е), CD16, CD56 (В, Ж), CD3, CD45RA (Г, З), клеток больных (А-Г) и доноров (Д-З). Приведены репрезентативные данные.

Figure 3. Analysis of CD45 lymphocyte subpopulations in the blood of COVID-19 patients and healthy donors

Note. Analysis of subpopulations in the region of lymphocytes and CD45 cells (A, E, rectangles). An overview of the size distribution and expression of CD45 (A, E), CD62L (B, F), CD16, CD56 (C, G), CD3, CD45RA (D, H), patient cells (A-D) and donors (E-H). Representative data are provided.

моугольник). У здоровых людей от 1 до 15% клеток находятся в этом окне, у больных COVID-19 в это окно попадает от 50 до 95%, на рисунке 3 68% морфологических ЛЦ находятся в этом окне (рис. 3А).

Цитометрический анализ показал, что клетки в этом окне экспрессируют различные маркеры лимфоцитов: натуральных киллеров CD16, CD56 (рис. 3В), Т-клеток CD3, CD45RA (рис. 3Г) и другие. Кроме маркеров ЛЦ данные клетки также экспрессируют маркер эндотелиальных клеток CD62P (рис. 3Б). Те же самые популяции выявляются и в крови здоровых доноров (рис. 3Д, Е, Ж, З). В крови доноров больше нефункциональных CD45-Т-клеток (рис. 3З) и меньше эндотелиальных (рис. 3Е), что показывает значительную ги-

бель не только лейкоцитов, но и сосудистых клеток при COVID-19.

Обсуждение

Одной из основных характеристик тяжести процесса при COVID-19, с нашей точки зрения, является циркуляция пула нефункциональных ЛЦ и эндотелиальных клеток в крови, а также, по-видимому, и нефункциональных нейтрофилов [1]. Анализ клинических данных показал, что только у 30% больных с тяжелой формой COVID-19 наблюдалось снижение абсолютного количества ЛЦ, причем преимущественно у мужчин (55%). У всех женщин количество ЛЦ находилось на нижней границе нормы, у одной больной абсолютное количество было значительно выше нормы (табл. 1, № 1), эта больная умерла.

Анализ экспрессии CD45 в окне ЛЦ показал, что у 64% мужчин и 78% женщин доля экспрессирующих CD45 ЛЦ составила от 2 до 12%. Соответственно все остальные клетки не являются функционально активными, не могут распознавать антиген и отвечать пролиферацией. Среди мужчин смертей не было, 2 из 9 женщин 40 и 69 лет умерли. Доля CD45⁺ ЛЦ у погибших женщин составила 3 и 11% соответственно. Несмотря на то, что все больные находились в реанимационном отделении и рассматривались как тяжелые, у 30% больных доля CD45⁺ ЛЦ была в норме или близко к норме (от 53 до 82% при норме 70-99%).

Субпопуляционный состав функциональных CD45⁺ ЛЦ больных COVID-19 в целом соответствовал норме: среди клеток присутствовали все основные популяции ЛЦ крови. Наблюдались минорные изменения в доли Т-клеток, в частности снижалась доля CD3 Т-клеток, увеличивалась доля наивных Т-клеток и натуральных киллеров; не было изменения доли В-клеток. При этом общее количество этих клеток снижалось в 10-50 раз у больных со сниженным количеством CD45⁺ ЛЦ.

Анализ фенотипа нефункциональных CD45⁺ ЛЦ показал, что ЛЦ теряют экспрессию CD45, но сохраняют некоторую сниженную экспрессию специфических маркеров. При этом эти клетки сохраняют жизнеспособность (не окрашиваются DAPI), хотя уровень апоптоза повышен в 2 раза. Аналогичные нефункциональные клетки определяются и в крови здоровых доноров. Различия между донорами и больными было в доле таких нефункциональных клетках. Среди доноров доля таких клеток колебалась в диапазоне 70-99%. Нельзя исключить, что у части доноров могла быть бессимптомная инфекция в легкой форме, поскольку кровь доноров собирали в период эпидемии.

Причина потери функциональной активности может быть связана с гемостазом сосудов. Ангиотензин-превращающий фермент (АСЕ) и его рецептор участвуют в регуляции артериального давления. Рецептор АСЕ экспрессируется на многих клетках, в том числе в большом количестве на клетках сосудистого эндотелия [17]. Попадание вируса с током воздуха в легкие приводит к связыванию вируса с клетками, экспрессирующими рецептор АСЕ, в том числе с клетками эндотелия.

В норме баланс сосудистого русла (гемостаз) поддерживается клетками эндотелия, белками плазмы крови, тромбоцитами и лейкоцитами, регулирующими про- и антикоагулянтные процессы, ведущие к накоплению тромбоцитов и фибрина в области очагового повреждения сосудов. Эндотелий синтезирует и экспрессирует молекулы, регулирующие гемостаз (фактор Вилле-

бранда, тканевой фактор, ингибитор активатора пламиногена 1-го типа и др.) [11]. Длительное воспаление во время тяжелой инфекции приводит к переходу гемостаза в протромботическое и антифибринолитическое состояние, что может привести к диссеминированному микрососудистому тромбозу, ишемии органов и синдрому полиорганной дисфункции, что часто наблюдается при тяжелых формах COVID-19 [15].

Связывание вируса с клетками эндотелия приводит к его активации и экспрессии молекул адгезии, к которым прикрепляются лейкоциты, позволяя им в конечном итоге проходить через сосудистую стенку в ткань – процесс, называемый диапедезом. На клетках эндотелия экспрессируются различные молекулы адгезии селектины (CD62E, CD62L и CD62P), интегрины (ICAM-1), молекула адгезии сосудистых клеток 1 (VCAM-1), обеспечивающие замедление тока клеток крови (тетеринг) и последующий диапедез лейкоцитов.

При активации эндотелия происходят два процесса: накопление прикрепленных лейкоцитов в местах экспрессии молекул адгезии и формирование микротромбов. При большом скоплении лейкоцитов и тромбоцитов (в первую очередь в капиллярах легких) часть клеток не может пройти в ткань, но уже находится в активированном состоянии, что неизбежно затем ведет к их постепенной элиминации в печени. Затемнение в легких по типу «матового стекла», отмеченное при COVID-19, наблюдается в таких зонах. Данный процесс происходит и в норме, удаляя нефункциональные клетки и замещая их наивными. При инфекции доля нефункциональных клеток резко возрастает, что сопровождается повышенным притоком наивных клеток, однако приток таких клеток ограничен заполненным кровеносным руслом живыми, но не функциональными ЛЦ. Можно предположить, что доля таких клеток пропорциональна вирусной нагрузке, наличию коморбидных заболеваний и состоянию печени, элиминирующей погибающие клетки.

Заключение

В данной работе показано, что клинический анализ крови не дает полную информацию по количеству функциональных Т-лимфоцитов, способных формировать противовирусный иммунитет. Дополнительный анализ доли CD45⁺ функционально иммунокомпетентных клеток позволяет выявить больных с тяжелой формой COVID-19, требующих особого внимания.

Список литературы / References

1. Borges L., Pithon-Curi T.C., Curi R., Hatanaka E. COVID-19 and neutrophils: the relationship between hyperinflammation and neutrophil extracellular traps. *Mediators Inflamm.*, 2020, Vol. 2020, 8829674. doi: 10.1155/2020/8829674.
2. Cao X. COVID-19: immunopathology and its implications for therapy. *Nat. Rev. Immunol.*, 2020, Vol. 20, pp. 269-270.
3. Chen H., Liu W., Wang Y., Liu D., Zhao L., Yu J. SARS-CoV-2 activates lung epithelial cell proinflammatory signaling and leads to immune dysregulation in COVID-19 patients. *EBioMedicine*, 2021, Vol. 70, 103500. doi: 10.1016/j.ebiom.2021.103500.
4. Chua R.L., Lukassen S., Trump S., Hennig B.P., Wendisch D., Pott F., Debnath O., Thürmann L., Kurth F., Völker M.T., Kazmierski J., Timmermann B., Twardziok S., Schneider S., Machleidt F., Müller-Redetzky H., Maier M., Krannich A., Schmidt S., Balzer F., Liebig J., Loske J., Suttrop N., Eils J., Ishaque N., Liebert U.G., von Kalle C., Hocke A., Witzentrath M., Goffinet C., Drosten C., Laudi S., Lehmann I., Conrad C., Sander L.E., Eils R. COVID-19 severity correlates with airway epithelium-immune cell interactions identified by single-cell analysis. *Nat. Biotechnol.*, 2020, Vol. 38, no. 8, pp. 970-979.
5. Desai D.M., Sap J., Silvennoinen O., Schlessinger J., Weiss A. The catalytic activity of the CD45 membrane-proximal phosphatase domain is required for TCR signaling and regulation. *EMBO J.*, 1994, Vol. 13, no. 17, pp. 4002-4010.
6. Ghanem M., Homps-Legrand M., Garnier M., Morer L., Goletto T., Frijia-Masson J., Wicky P.H., Jaquet P., Bancal C., Hurtado-Nedelec M., de Chaisemartin L., Jaillet M., Mailleux A., Quesnel C., Poté N., Debray M.P., de Montmollin E., Neukirch C., Borie R., Taillé C., Crestani B.; French COVID Cohort Study Group. Blood fibrocytes are associated with severity and prognosis in COVID-19 pneumonia. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.*, 2021, Vol. 321, no. 5, pp. L847-L858.
7. Grant R.A., Morales-Nebreda L., Markov N.S., Swaminathan S., Querrey M., Guzman E.R., Abbott D.A., Donnelly H.K., Donayre A., Goldberg I.A., Klug Z.M., Borkowski N., Lu Z., Kihshen H., Politanska Y., Sichizya L., Kang M., Shilatifard A., Qi C., Lomasney J.W., Argento A.C., Kruser J.M., Malsin E.S., Pickens C.O., Smith S.B., Walter J.M., Pawlowski A.E., Schneider D., Nannapaneni P., Abdala-Valencia H., Bharat A., Gottardi C.J., Budinger G.R.S., Misharin A.V., Singer B.D., Wunderink R.G.; NU SCRIPT Study Investigators. Circuits between infected macrophages and T cells in SARS-CoV-2 pneumonia. *Nature*, 2021, Vol. 590, no. 7847, pp. 635-641.
8. Hermiston M.L., Xu Z., Weiss A. CD45: A critical regulator of signaling thresholds in immune cells. *Annu. Rev. Immunol.*, 2003, Vol. 21, pp. 107-137.
9. Hermiston M.L., Zikherman J., Zhu J.W. CD45, CD148, and Lyp/Pep: Critical phosphatases regulating Src family kinase signaling networks in immune cells. *Immunol. Rev.*, 2009, Vol. 228, pp. 288-311.
10. Huang L., Shi Y., Gong B., Jiang L., Zhang Z., Liu X., Yang J., He Y., Jiang Z., Zhong L., Tang J., You C., Jiang Q., Long B., Zeng T., Luo M., Zeng F., Zeng F., Wang S., Yang X., Yang Z. Dynamic blood single-cell immune responses in patients with COVID-19. *Signal Transduct. Target. Ther.*, 2021, Vol. 6, no. 1, pp. 110. doi: 10.1038/s41392-021-00526-2.
11. Ince C., Mayeux P.R., Nguyen T., Gomez H., Kellum J.A., Ospina-Tascón G.A., Hernandez G., Murray P., de Backer D.; ADQI XIV Workgroup. The endothelium in sepsis. *Shock*, 2016, Vol. 45, no. 3, pp. 259-270.
12. Jin M., Shi N., Wang M., Shi C., Lu S., Chang Q., Sha S., Lin Y., Chen Y., Zhou H., Liang K., Huang X., Shi Y., Huang G. CD45: a critical regulator in immune cells to predict severe and non-severe COVID-19 patients. *Aging (Albany NY)*, 2020, Vol. 12, no. 20, pp. 19867-19879.
13. Klebanoff C.A., Gattinoni L., Torabi-Parizi P., Kerstann K., Cardones A.R., Finkelstein S.E., Palmer D.C., Antony P.A., Hwang S.T., Rosenberg S.A., Waldmann T.A., Restifo N.P. Central memory self/tumor-reactive CD8⁺ T cells confer superior antitumor immunity compared with effector memory T cells. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 2005, Vol. 102, no. 27, pp. 9571-9576.
14. Kreutmair S., Unger S., Núñez N.G., Ingelfinger F., Alberti C., de Feo D., Krishnarajah S., Kauffmann M., Friebel E., Babaei S., Gaborit B., Lutz M., Jurado N.P., Malek N.P., Goepel S., Rosenberger P., Häberle H.A., Ayoub I., Al-Hajj S., Nilsson J., Claassen M., Liblau R., Martin-Blondel G., Bitzer M., Roquilly A., Becher B. Distinct immunological signatures discriminate severe COVID-19 from non-SARS-CoV-2-driven critical pneumonia. *Immunity*, 2021, Vol. 54, no. 7, pp. 1578-1593.e5.
15. Miesbach W., Makris M. COVID-19: coagulopathy, risk of thrombosis, and the rationale for anticoagulation. *Clin. Appl. Thromb. Hemost.*, 2020, Vol. 26, 1076029620938149. doi: 10.1177/1076029620938149.
16. Palacios E.H., Weiss A. Function of the Src-family kinases, Lck and Fyn, in T-cell development and activation. *Oncogene*, 2004, Vol. 23, pp. 7990-8000.
17. Ryan U.S., Ryan J.W., Whitaker C., Chiu A. Localization of angiotensin converting enzyme (kininase II). II. Immunocytochemistry and immunofluorescence. *Tissue Cell*, 1976, Vol. 8, no. 1, pp. 125-145.
18. Sallusto F., Geginat J., Lanzavecchia A. Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance. *Annu. Rev. Immunol.*, 2004, Vol. 22, pp. 745-763.
19. Vanderbeke L., van Mol P., van Herck Y., de Smet F., Humblet-Baron S., Martinod K., Antoranz A., Arijs I., Boeckx B., Bosisio F.M., Casaer M., Dauwe D., de Wever W., Dooms C., Dreesen E., Emmaneel A., Filtjens J., Gouw M., Gunst J., Hermans G., Jansen S., Lagrou K., Liston A., Lorent N., Meersseman P., Mercier T., Neyts J.,

Odent J., Panovska D., Penttila P.A., Pollet E., Proost P., Qian J., Quintelier K., Raes J., Rex S., Saeys Y., Sprooten J., Tejpar S., Testelmans D., Thevissen K., van Buyten T., Vandenhoute J., van Gassen S., Velásquez Pereira L.C., Vos R., Weynand B., Wilmer A., Yserbyt J., Garg A.D., Matthys P., Wouters C., Lambrechts D., Wauters E., Wauters J. Monocyte-driven atypical cytokine storm and aberrant neutrophil activation as key mediators of COVID-19 disease severity. *Nat. Commun.*, 2021, Vol. 12, no. 1, 4117. doi: 10.1038/s41467-021-24360-w.

20. Winheim E., Rinke L., Lutz K., Reischer A., Leutbecher A., Wolfram L., Rausch L., Kranich J., Wratil P.R., Huber J.E., Baumjohann D., Rothenfusser S., Schubert B., Hilgendorff A., Hellmuth J.C., Scherer C., Muenchhoff M., von Bergwelt-Baildon M., Stark K., Straub T., Brocker T., Keppler O.T., Subklewe M., Krug A.B. Impaired function and delayed regeneration of dendritic cells in COVID-19. *PLoS Pathog.*, 2021, Vol. 17, no. 10, e1009742. doi: 10.1371/journal.ppat.1009742.

21. Zhao X.N., You Y., Cui X.M., Gao H.X., Wang G.L., Zhang S.B., Yao L., Duan L.J., Zhu K.L., Wang Y.L., Li L., Lu J.H., Wang H.B., Fan J.F., Zheng H.W., Dai E.H., Tian L.Y., Ma M.J. Single-cell immune profiling reveals distinct immune response in asymptomatic COVID-19 patients. *Signal Transduct. Target. Ther.*, 2021, Vol. 6, no. 1, 342. doi: 10.1038/s41392-021-00753-7.

Авторы:

Свирицкая Е.В. — к.б.н., старший научный сотрудник отдела иммунологии ФГБУН «Институт биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова» Российской академии наук; старший научный сотрудник ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Коновалова М.В. — к.б.н., научный сотрудник отдела иммунологии ФГБУН «Институт биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова» Российской академии наук, Москва, Россия

Authors:

Svirshchetskaya E.V., PhD (Biology), Senior Research Associate, Department of Immunology, Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences; Senior Research Associate, V. Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology, Moscow, Russian Federation

Konovalova M.V., PhD (Biology), Research Associate, Department of Immunology, Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

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

Пырегов А.В. — д.м.н., директор института анестезиологии-реаниматологии и трансфузиологии, заведующий кафедрой анестезиологии и реаниматологии ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Полтавцева Р.А. — к.б.н., ведущий научный сотрудник ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Sadykov V.F., Postgraduate Student, V. Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology, Moscow, Russian Federation

Pyregov A.V., PhD, MD (Medicine), Director of the Institute of Anesthesiology-Resuscitation and Transfusiology, Head of the Department of Anesthesiology and Resuscitation, V. Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology, Moscow, Russian Federation

Poltavtseva R.A., PhD (Biology), Leading Research Associate, V. Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology, Moscow, Russian Federation

Поступила 14.07.2022
Принята к печати 09.09.2022
Дата онлайн-публикации 18.11.2022

Received 14.07.2022
Accepted 09.09.2022
Date of publication online 18.11.2022

ВЗАИМОСВЯЗЬ ВИРУСНОЙ НАГРУЗКИ И ПОКАЗАТЕЛЕЙ КЛЕТОЧНОГО ЗВЕНА ИММУННОЙ СИСТЕМЫ У ПАЦИЕНТОВ С COVID-19 РАЗЛИЧНОЙ СТЕПЕНИ ТЯЖЕСТИ

Никитин Ю.В., Александрова Е.В., Криворучко А.Б., Мешкова М.Е.,
Минаева Л.В., Жданов К.В., Артамонов А.А., Козлов К.В.,
Иванов А.М., Мальцев О.В., Иванов К.С., Ляшенко Ю.И.,
Масалов Е.Б.

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

Резюме. Оценка уровня вирусной нагрузки в различных биологических образцах, взятых из дыхательных путей, может указывать на активную репликацию вируса и используется для мониторинга тяжелых респираторных вирусных инфекций. Изучение взаимосвязей вирусной нагрузки SARS-CoV-2 с лабораторными иммунологическими показателями является важным направлением поиска клинико-лабораторных маркеров COVID-19.

Цель – количественно оценить вирусную нагрузку у пациентов с COVID-19. Выявить взаимосвязь уровня вирусной нагрузки с изменениями показателей клеточного звена иммунной системы.

Проведено лабораторное обследование 74 пациентов с диагнозом COVID-19, которые были разделены на 3 группы по степени тяжести заболевания в соответствии с основными клиническими вариантами: с легким, со среднетяжелым и тяжелым течением. Определена общая вирусная нагрузка в клинических образцах – число копий РНК SARS-CoV-2 на 100 копий референсного гена RNaseP. Выполнена комплексная оценка клеточного звена иммунной системы, определена концентрация IL-6, С-реактивного белка в сыворотке крови.

Выявлена взаимосвязь развития тяжелого состояния у пациентов COVID-19 с уровнем вирусной нагрузки. Высокие уровни вирусной РНК в биологических образцах коррелируют с основными показателями Т-клеточного звена иммунной системы, ассоциированными с тяжестью течения заболевания. В подгруппе пациентов с высокой вирусной нагрузкой выявили сильные положительные корреляционные связи с относительным количеством цитотоксических лимфоцитов (CD3⁺CD8⁺),

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:

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

Образец цитирования:

Ю.В. Никитин, Е.В. Александрова, А.Б. Криворучко, М.Е. Мешкова, Л.В. Минаева, К.В. Жданов, А.А. Артамонов, К.В. Козлов, А.М. Иванов, О.В. Мальцев, К.С. Иванов, Ю.И. Ляшенко, Е.Б. Масалов «Взаимосвязь вирусной нагрузки и показателей клеточного звена иммунной системы у пациентов с COVID-19 различной степени тяжести» // Медицинская иммунология, 2023. Т. 25, № 1. С. 167-180. doi: 10.15789/1563-0625-IBV-2586

© Никитин Ю.В. и соавт., 2023
Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

Yu.V. Nikitin, E.V. Alexandrova, A.B. Krivoruchko, M.E. Meshkova, L.V. Minaeva, K.V. Zhdanov, A.A. Artamonov, K.V. Kozlov, A.M. Ivanov, O.V. Maltsev, K.S. Ivanov, Yu.I. Lyashenko, E.B. Masalov “Interrelations between viral load and cellular immunity in patients with COVID-19 of varying severity”, *Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2023, Vol. 25, no. 1, pp. 167-180.

doi: 10.15789/1563-0625-IBV-2586
© Nikitin Yu.V. et al., 2023
The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License
DOI: 10.15789/1563-0625-IBV-2586

активированных Т-лимфоцитов ($CD3^+HLA-DR^+$), а также абсолютным и относительным количеством активированных В-лимфоцитов и NK-клеток ($CD3^+CD25^+$).

Лабораторный мониторинг показателей клеточного звена иммунной системы в совокупности с оценкой уровня вирусной нагрузки позволит повысить эффективность ранней диагностики состояния пациентов с новой коронавирусной инфекцией. В качестве кандидатов в критерии благоприятного исхода инфекции, вызванной SARS-CoV-2, можно рассмотреть изменение уровней экспрессии маркеров активации на иммунокомпетентных клетках.

Ключевые слова: COVID-19, SARS-CoV-2, вирусная нагрузка, клеточный иммунитет, активированные лимфоциты, провоспалительные цитокины, полимеразная цепная реакция, проточная цитометрия

INTERRELATIONS BETWEEN VIRAL LOAD AND CELLULAR IMMUNITY IN PATIENTS WITH COVID-19 OF VARYING SEVERITY

Nikitin Yu.V., Alexandrova E.V., Krivoruchko A.B., Meshkova M.E., Minaeva L.V., Zhdanov K.V., Artamonov A.A., Kozlov K.V., Ivanov A.M., Maltsev O.V., Ivanov K.S., Lyashenko Yu.I., Masalov E.B.

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

Abstract. Assessment of viral load levels in various biological samples taken from the respiratory tract can be an indicator of an ongoing process of active viral replication and may be used to monitor severe respiratory viral infections. The study of the relationship between SARS-CoV-2 viral load and immunological laboratory parameters is an important step in the search for clinical markers of COVID-19.

The aim of this research was to quantify viral load in patients with COVID-19 and to identify the relationship between viral load and changes in the parameters of the cellular component of the immune system.

A laboratory examination was carried out on 74 patients diagnosed with COVID-19, they were divided into 3 groups based on the severity of the disease: mild, moderate, severe. Total viral load in clinical samples was determined by the number of SARS-CoV-2 RNA copies per 100 copies of the reference RNaseP gene. A comprehensive assessment of the cellular component of the immune system was performed using flow cytometry and direct monoclonal antibodies, and the IL-6, and C-reactive protein concentrations were determined.

We revealed a relationship between the development of serious clinical conditions in the patients with COVID-19, and the levels of viral load. High levels of viral RNA in biological samples correlate with main indicators of the T cell component of the immune system associated with disease severity. In a subgroup of patients with an extremely high viral load, strong positive correlations were found between the relative numbers of cytotoxic lymphocytes ($CD3^+CD8^+$), activated T lymphocytes ($CD3^+HLA-DR^+$), as well as absolute and relative numbers of activated B lymphocytes and NK cells ($CD3^+CD25^+$).

Laboratory monitoring of the cellular component of the immune system, along with the assessment of viral loads, should improve early assessment of clinical condition in the patients with COVID-19. Changes in expression levels of activation markers on immune cells can be potentially viewed as indicators of recovery during COVID-19.

Keywords: COVID-19, SARS-CoV-2, viral load, cellular immunity, activated lymphocytes, pro-inflammatory cytokines, polymerase chain reaction, flow cytometry

Введение

Измерение вирусной нагрузки (ВН) в различных биологических образцах, взятых из дыхательных путей, может указывать на активную репликацию вируса и используется для мониторинга тяжелых респираторных вирусных инфекций, включая клиническое прогрессирование и реакцию на лечение [13, 18, 24].

Для постановки диагноза и определения наличия SARS-CoV-2 в образцах мазка со слизистого зева широко применяется анализ методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (RT-PCR) в реальном времени [22]. РНК SARS-CoV-2 можно обнаружить в мазках из рото- и носоглотки, а также в мокроте, образцах ткани легких, периферической крови, сыворотке крови, образцах стула и т.д. [4, 5, 25, 26].

В настоящее время изучается взаимосвязь ВН SARS-CoV-2 с тяжестью заболевания и степенью контагиозности вируса для использования в качестве клинического и эпидемиологического маркера COVID-19. Многие исследователи ассоциируют количество РНК вируса, определенного по значениям порогового цикла (Ct) в мазках из рото- и носоглотки в начале болезни, с тяжестью клинического течения и летальным исходом у пациентов с COVID-19 [3, 12, 16, 17, 21, 26, 27].

По данным различных исследований, возрастающая концентрация РНК вируса может указывать на прогрессирование заболевания. Установлены прямые сильные корреляционные связи уровня вирусной нагрузки в плазме крови с концентрациями IL-10, IL-6, IL-15, СРБ, TNF α , миелопероксидазы, количеством нейтрофилов, а также обратные корреляции с насыщением крови кислородом и количеством лимфоцитов, моноцитов периферической крови (ПК) [3, 11, 10]. В свою очередь, иммуносупрессия, индуцированная высокой концентрацией IL-6, характеризуется снижением экспрессии человеческого лейкоцитарного антигена (HLA)-DR на иммунокомпетентных клетках [15], что приводит к нарушению формирования устойчивого Т-клеточного иммунного ответа, необходимого для контроля развития вирусной инфекции [7, 19].

Активная репликация вируса может быть одной из причин нарастающей лимфопении и моноцитопении у тяжелых пациентов с COVID-19 [1, 2], за счет цитопатических реакции и/или стимулирования миграции этих клеток к очагу инфекции в тканях [14].

Таким образом, оценка вирусной нагрузки в дыхательных путях, а также поиск взаимосвязей между этим показателем и тяжестью заболевания является актуальным и приобретает особую значимость для разработки стратегий борьбы с заболеванием и схем его лечения.

Цель исследования – количественно оценить вирусную нагрузку у пациентов с COVID-19. Выявить взаимосвязь уровня вирусной нагрузки с изменениями показателей клеточного звена иммунной системы.

Материалы и методы

Дизайн исследования – одноцентровое одномоментное нерандомизированное проспективное когортное исследование.

В исследование были включены данные лабораторного обследования 74 пациентов в возрасте 19-82 лет ($51 \pm 14,5$ лет); 15 женщин и 59 мужчин (20% и 80% соответственно), находившихся на лечении в клинике инфекционных болезней Военно-медицинской академии им. С.М. Кирова с подтвержденным диагнозом COVID-19. Все па-

циенты были разделены на три группы: с легким течением ($n = 2$), со среднетяжелым течением ($n = 60$, далее группа 1) и тяжелым течением заболевания ($n = 12$, далее группа 2). Вследствие малого количества наблюдений пациенты с легкой формой COVID-19 в дальнейший анализ включены не были.

Выявление РНК коронавируса SARS-CoV-2 в мазках из носоглотки и ротоглотки проводили при поступлении в клинику с применением наборов реагентов «РИБО-преп» (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии, Россия) и Detection Kit for 2019 Novel Coronavirus (2019-nCoV) RNA (PCR-Fluorescence Probing) (Da An Gene, КНР). В каждой исследуемой пробе одновременно определяли специфические фрагменты N-гена, ORF1ab-гена генома SARS-CoV-2 и эндогенного внутреннего контроля – мРНК человеческой рибонуклеазы Р (RNaseP). Термоциклирование и детекция флуоресцентного сигнала в режиме реального времени проводилась с использованием амплификатора «ДТ-Прайм» («ДНК-технология», Россия).

На определение абсолютного количества вирусных частиц в клинической пробе существенное влияние оказывает фактор вариации общего количества клеток-мишеней, поэтому для ретроспективной оценки вирусной нагрузки в исследуемых образцах мы провели процедуру нормирования данных по внутреннему контролю – RNaseP. Число копий мРНК RNaseP можно выразить как абсолютное количество на одну клетку человека, а при анализе данных ранее проведенных исследований с помощью набора Da An Gene установить прямое соотношение между исходным числом клеток в образце и значениями Ct. Используя этот «ген домашнего хозяйства» для стандартизации полученных данных мы полагали, что он экспрессируется во всех человеческих клетках на стабильном и постоянном уровне, поэтому для построения стандартной калибровочной кривой применяли образцы лейкоцитов периферической крови, полученные с помощью флуоресцентного клеточного сортировщика MoFlow Astrios EQ (Beckman Coulter, США) (рис. 1). Количество копий мРНК гена RNaseP оценивали путем сравнения значений Ct, полученных при исследовании клинических проб, со значениями Ct, определенных в серии десятикратных разведений стандартных образцов лейкоцитов человека.

Для определения исходного количества копий РНК-мишени N-gene SARS-CoV-2 проводили сравнение значений Ct, полученных при исследовании клинических проб, со значениями Ct калибровочной кривой, построенной на основе серии десятикратных разведений образцов контрольного материала SARS-CoV-2 Standard

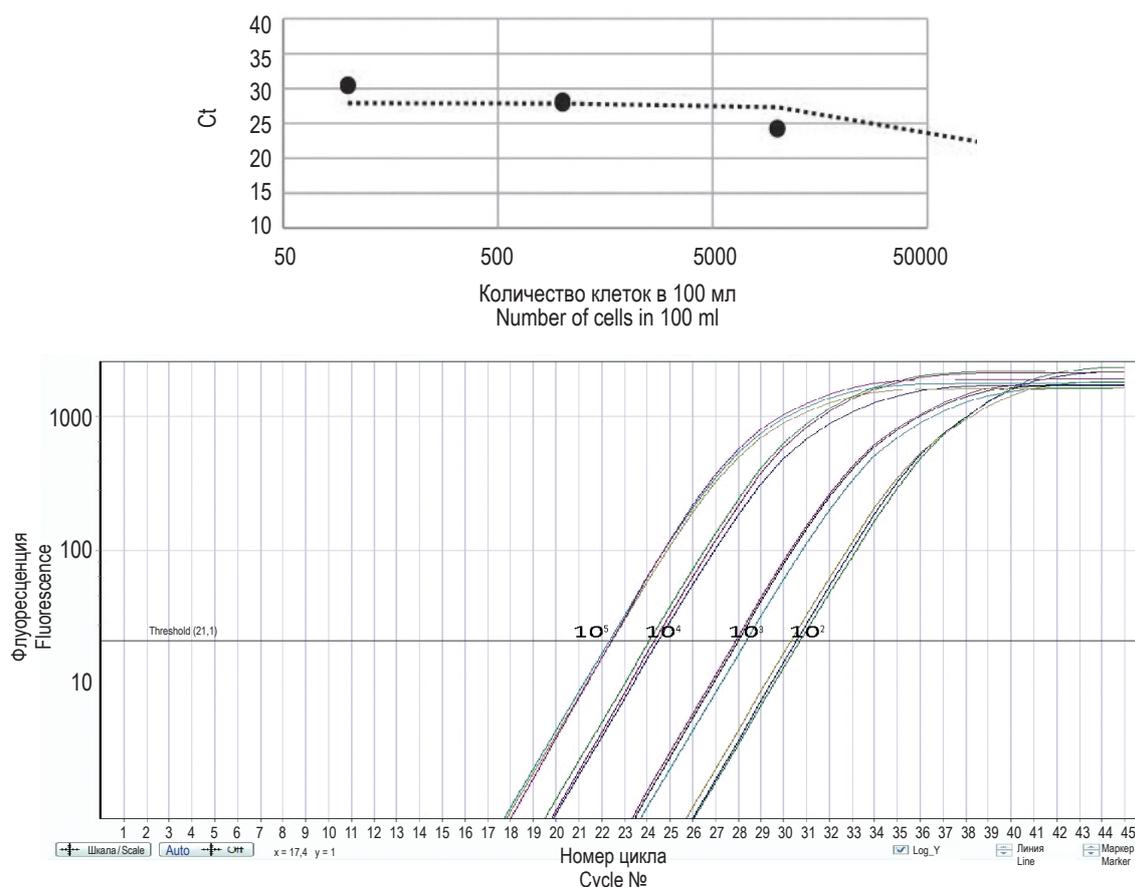


Рисунок 1. Группа данных 1. Стандартная кривая и значения пороговых циклов (Ct), полученных при амплификации кДНК RNaseP из лейкоцитов периферической крови в разной концентрации

Примечание. Использовали 3 повтора суспензии клеток концентрацией 100 000, 10 000, 1000, 100 клеток в 100 мкл транспортной среды. Факт отсутствия внутриэкспериментального отклонения (погрешности) подтверждается, соответственно способ создания суспензии, экстракции НК, обратной транскрипции и амплификации кДНК надежен и позволяет получать воспроизводимые количества РНК из определенного числа клеток.

Figure 1. Data group 1. Standard curve and values of threshold cycles (Ct) obtained by amplification of RNaseP cDNA from peripheral blood leukocytes at different concentrations

Note. We used 3 repetitions of the cell suspension at a concentration of 100 000, 10 000, 1000, 100 cells in 100 μ l of the transport medium.

The fact that there is no intra-experimental deviation (error) is confirmed, respectively, the method of creating a suspension, extracting NA, reverse transcription and amplification of cDNA is reliable and allows you to obtain reproducible amounts of RNA from a certain number of cells.

(Bio-Rad, США) (рис. 2 и 3). Данный стандартный контрольный материал представляет смесь синтетических РНК транскриптов 5 генных мишеней SARS-CoV-2 с концентрацией 200 000 копий в 1 мл.

Общую вирусную нагрузку в клиническом образце выражали числом копий РНК SARS-CoV-2 на 100 копий референсного гена RNaseP, по формуле:

$$NSARS-CoV-2 / NRNaseP \times 100,$$

где NSARS-CoV-2 – число копий РНК SARS-CoV-2, NRNaseP – число копий РНК человеческого RNaseP (расчетные единицы).

Иммунологическое исследование образцов крови включало в себя изучение основных показателей клеточного звена иммунитета. С це-

лью изучения врожденного и адаптивного звеньев иммунной системы выполнялись следующие исследования периферической крови (ПК): 1) определение абсолютного (10^9 /л) и относительного (%) количества клеток основных популяций лимфоцитов – Т-лимфоциты ($CD3^+CD19^-$), Т-хелперы/индукторы ($CD3^+CD4^+CD45^+$), Т-цитотоксические лимфоциты (Т-ЦТЛ) ($CD3^+CD8^+CD45^+$), истинные натуральные «киллеры» (NK-клетки) ($CD3-CD16^+56^+CD45^+$), В-лимфоциты ($CD19^+CD3^-$); 2) оценка клеточных субпопуляций, с изучением их функциональной активности – Т-лимфоциты, экспрессирующие маркеры NK-клеток (Т-NK-клетки) ($CD3^+CD56^+CD45^+$), NK-клетки, экспрессирующие альфа-цепь анти-

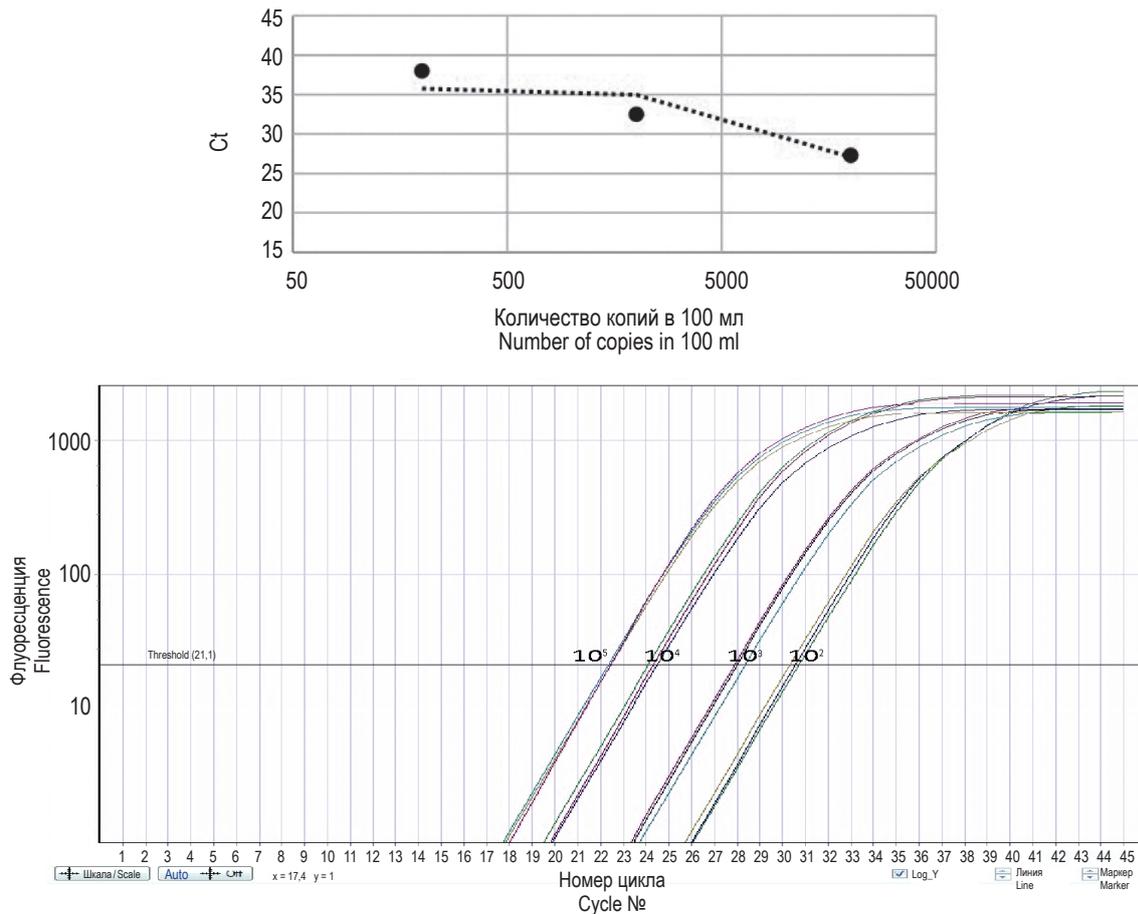


Рисунок 2. Группа данных 2. Стандартная кривая и значения пороговых циклов (Ct), полученных при амплификации кДНК N-gene стандарта SARS-CoV-2 Standard (Bio-Rad, США)

Примечание. Для построения стандартной калибровочной кривой были подготовлены образцы с концентрацией 20 000 копий, 2000 копий и 200 копий в 100 микролитрах транспортной среды.

Figure 2. Data group 2. Standard curve and values of threshold cycles (Ct) obtained by amplification of the N-gene cDNA of the SARS-CoV-2 Standard (Bio-Rad, USA)

Note. Samples were prepared at a concentration of 20 000 copies, 2000 copies and 200 copies in 100 microliters of transport medium to construct a standard calibration curve.

гена CD8 (CD3⁺CD8⁺CD45⁺), активированные В-лимфоциты (CD3⁺CD25⁺CD45⁺), активированные Т-лимфоциты (CD3⁺HLA-DR⁺CD45⁺) и активированные цитотоксические лимфоциты (CD8⁺HLA-DR⁺CD45⁺), В-лимфоциты и активированные НК-клетки (CD3⁺HLA-DR⁺CD45⁺), активированные Т-лимфоциты, экспрессирующие альфа-цепь рецептора IL-2 (CD3⁺CD25⁺CD45⁺), регуляторные Т-хелперные клетки (CD4⁺CD25^{bright}CD127^{neg}CD45⁺), выполняющие иммуносупрессорную функцию. Оценку количественного состава субпопуляций лимфоцитов в периферической крови проводили на проточном цитометре FC500 (Beckman Coulter, США) с использованием прямых моноклональных антител (МКА) CD45/CD14 для идентификации популяций лейкоцитов (по прямому (FSC) и боковому светорассеянию (SSC)), пятицветных комбинаций CD45/CD3/CD19/CD16⁺56/HLA-

DR, CD45/CD4/CD8/CD3/CD25, CD45/CD4/CD127/CD3/CD25 и изотипических контролей IgG1/IgG2 той же фирмы.

Для окрашивания проб для проточно-цитометрического анализа использовали следующую методику: брали 100 мкл гепаринизированной ПК, добавляли 10 мкл соответствующих МКА, перемешивали с помощью вортекса и инкубировали 15-20 мин при комнатной температуре в темноте. Затем добавляли в каждую пробирку по 1 мл лизирующего раствора OptilyseC (Beckman Coulter, США), перемешивали и инкубировали 10 мин. После отмывания фосфатным буфером (PBS) и центрифугирования (5 мин при 1500 об/мин), удаляли супернатант и добавляли в каждую пробирку по 0,5 мл раствора PBS. Полученный осадок ресуспендировали и проводили измерения на проточном цитометре.

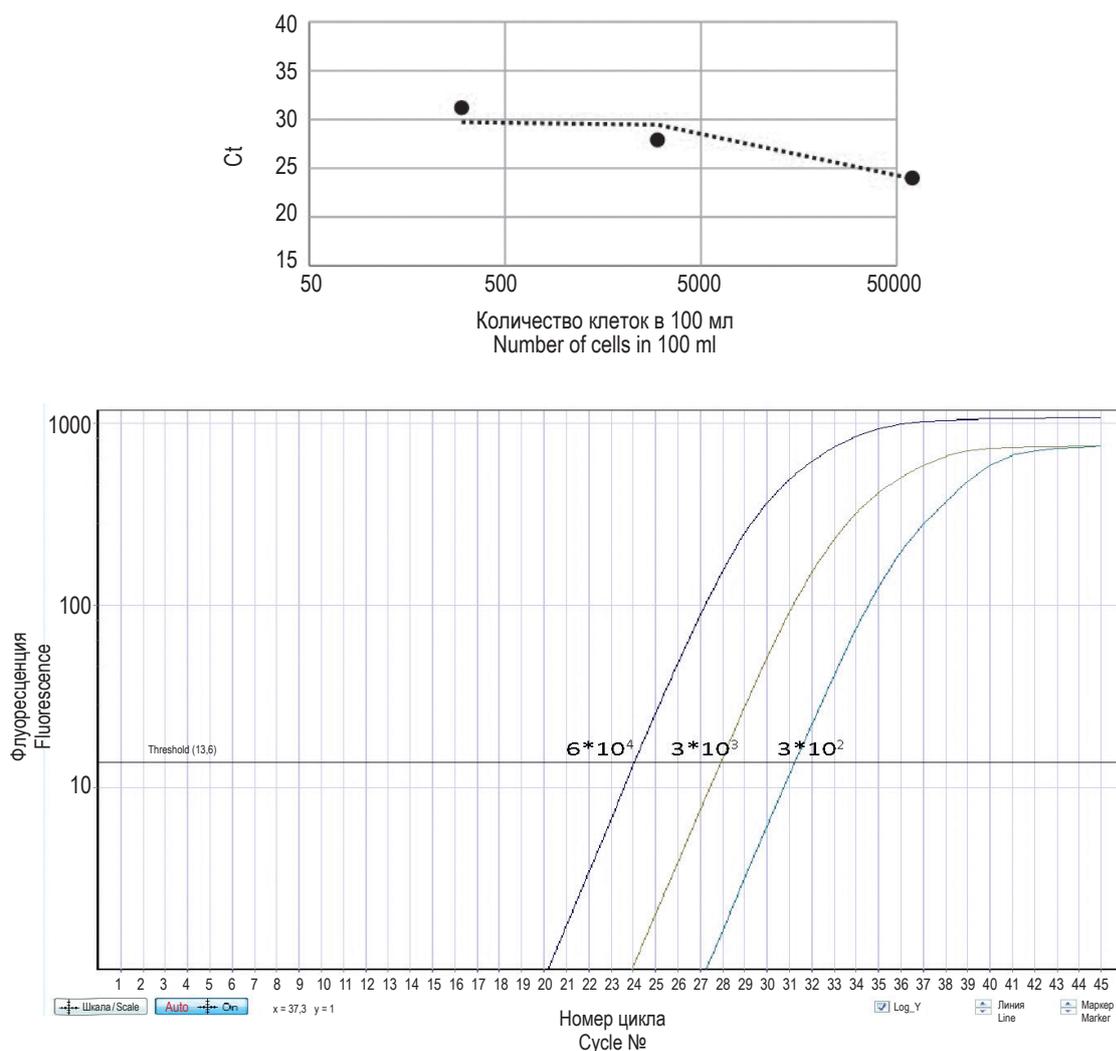


Рисунок 3. Группа данных 3. Стандартная кривая и значения пороговых циклов (Ct), полученных при амплификации кДНК RNaseP из лейкоцитов периферической крови в разной концентрации

Примечание. Для построения стандартной калибровочной кривой были подготовлены образцы с концентрацией 60 000 клеток, 3000 клеток и 300 клеток в 100 микролитрах транспортной среды.

Figure 3. Data group 3. Standard curve and values of threshold cycles (Ct) obtained by amplification of RNaseP cDNA from peripheral blood leukocytes at different concentrations

Note. Samples were prepared at 60 000 cells, 3000 cells, and 300 cells in 100 microliters of transport medium to construct a standard calibration curve.

Концентрацию С-реактивного белка (СРБ) определяли методом электрохемилюминесцентного иммуноанализа (Cobas 6000, Roche Diagnostics, Швейцария).

Концентрацию цитокинов ИЛ-6 в сыворотке крови определяли «сэндвич»-вариантом твердофазного иммуоферментного анализа с применением моно- и поликлональных антител с помощью тест-систем (АО «Вектор-Бест», Россия).

Полученные результаты статистически обрабатывали с помощью пакета программ Statistica (версия 10.0, StatSoft Inc., США) и MedCalc (версия 19.7.4, США). Приводимые параметры представлены в формате: Ме ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$), где

Ме – медиана, $Q_{0,25}$ и $Q_{0,75}$ – квартили. Анализ взаимосвязей между признаками проводили с использованием коэффициента ранговой корреляции Спирмена (r -коэффициент). Сравнительный анализ между группами выполняли с использованием рангового непараметрического метода U-критерия Манна–Уитни. Критический уровень значимости (p) при проверке статистических гипотез принимался $\leq 0,05$.

Результаты

Данные развернутого иммунологического обследования пациентов со среднетяжелым тече-

ТАБЛИЦА 1. СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА АБСОЛЮТНЫХ И ОТНОСИТЕЛЬНЫХ ЗНАЧЕНИЙ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ИММУННОГО СТАТУСА ПАЦИЕНТОВ ГРУПП 1 И 2, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

TABLE 1. COMPARATIVE CHARACTERISTICS OF THE ABSOLUTE AND RELATIVE VALUES OF THE PARAMETERS OF THE IMMUNE STATUS OF PATIENTS IN GROUPS 1 AND 2, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

Показатель Index	Референсные значения Reference values	Группа 1 Group 1	Группа 2 Group 2	p
Кол-во лейкоцитов, × 10 ⁹ /л Number of leukocytes, × 10 ⁹ /L	4,0-8,8	4,9 (3,7-6,3)	7,2 (5,2-9,4)	
Кол-во нейтрофилов, × 10 ⁹ /л Number of neutrophils, × 10 ⁹ /L	1,8-7,7	3,0 (2,1-4,0)	4,6 (3,1-7,8)	0,014
Кол-во лимфоцитов, % Number of lymphocytes, %	19,0-37,0	30,0 (21,9-37,8)	9,5 (4,0-16,3)	0,000037
Кол-во лимфоцитов, × 10 ⁹ /л Number of lymphocytes, × 10 ⁹ /L	1,2-2,5	1,4 (1,1-1,8)	0,6 (0,4-1,0)	0,000006
CD3 ⁺ T-лимфоциты, % CD3 ⁺ T lymphocytes, %	60,0-80,0	72,9 (67,6-78,4)	77,3 (50,6-81,5)	
CD3 ⁺ T-лимфоциты, × 10 ⁹ /л CD3 ⁺ T lymphocytes, × 10 ⁹ /L	0,8-2,2	0,98 (0,78-1,35)	0,44 (0,22-0,56)	0,000009
CD3 ⁺ CD4 ⁺ T-лимфоциты (хелперы/ индукторы), % CD3 ⁺ CD4 ⁺ T lymphocytes (helpers / inducers), %	30,0-50,0	43,7 (40,0-50,2)	47,5 (33,4-54,6)	
CD3 ⁺ CD4 ⁺ T-лимфоциты (хелперы/ индукторы), × 10 ⁹ /л (CD3 ⁺ CD4 ⁺ T lymphocytes (helpers / inducers), × 10 ⁹ /L	0,5-1,2	0,62 (0,48-0,79)	0,25 (0,15-0,35)	0,000047
CD3 ⁺ CD8 ⁺ T-лимфоциты (цитотоксические лимфоциты – Т-ЦТЛ), % (CD3 ⁺ CD8 ⁺ T lymphocytes (cytotoxic lymphocytes – T-CTL), %	20,0-30,0	23,9 (17,4-29,7)	22,9 (17,0-27,1)	0,033802
CD3 ⁺ CD8 ⁺ T-лимфоциты (цитотоксические лимфоциты – Т-ЦТЛ), × 10 ⁹ /л CD3 ⁺ CD8 ⁺ T lymphocytes (cytotoxic lymphocytes – T-CTL), × 10 ⁹ /L	0,3-0,9	0,33 (0,21-0,51)	0,16 (0,08-0,22)	0,000012
CD3 ⁺ CD56 ⁺ (Т-киллеры) Т-НК-клетки, % CD3 ⁺ CD56 ⁺ (T killers) T-NK cells, %	1,7-8,6	4,2 (2,0-6,3)	2,9 (2,4-7,5)	
CD3 ⁺ CD56 ⁺ (Т-киллеры) Т-НК-клетки, × 10 ⁹ /л CD3 ⁺ CD56 ⁺ (T-killers) T-NK cells, × 10 ⁹ /L	0,06-0,28	0,05 (0,03-0,09)	0,02 (0,01-0,04)	0,005847
CD4 ⁺ CD8 ⁺ дважды положительные Т-лимфоциты, % CD4 ⁺ CD8 ⁺ double positive T lymphocytes, %	0,0-2,0	0,5 (0,3-0,8)	0,6 (0,1-1,1)	
Соотношение CD3 ⁺ CD4 ⁺ /CD3 ⁺ CD8 ⁺ CD3 ⁺ CD4 ⁺ /CD3 ⁺ CD8 ⁺ ratio	1,2-2,5	1,9 (1,4-2,7)	2,1 (1,3-2,7)	
CD56 ⁺ HLA-DR ⁺ НК-клетки, экспрессирующие маркер HLA-DR, % CD56 ⁺ HLA-DR ⁺ NK cells expressing the HLA-DR marker, %	0,0-2,0	3,4 (1,7-6,0)	3,5 (2,3-4,2)	
CD3 ⁺ CD56 ⁺ истинные натуральные киллеры (НК-клетки), % CD3 ⁺ CD56 ⁺ true natural killers (NK cells), %	8,0-18,0	12,3 (7,5-16,1)	10,95 (7,4-15,9)	

Таблица 1 (окончание)
Table 1 (continued)

Показатель Index	Референсные значения Reference values	Группа 1 Group 1	Группа 2 Group 2	p
CD3⁺CD56⁺ истинные натуральные киллеры (NK-клетки), × 10⁹/л CD3 ⁺ CD56 ⁺ true natural killers (NK cells), × 10 ⁹ /L	0,12-0,40	0,17 (0,12-0,24)	0,09 (0,03-0,11)	0,032576
CD3⁺CD8⁺NK-клетки, экспрессирующие α-цепь антигена CD8, % CD3 ⁺ CD8 ⁺ NK cells expressing α-chain of CD8 antigen, %	5,0-19,0	4,3 (2,7-8,0)	4,8 (3,5-5,8)	
CD3⁺CD8⁺NK-клетки, экспрессирующие α-цепь антигена CD8, × 10⁹/л CD3 ⁺ CD8 ⁺ NK cells expressing α-chain of CD8 antigen, × 10 ⁹ /L	0,06-0,28	0,06 (0,04-0,09)	0,03 (0,02-0,05)	0,013729
CD19⁺В-лимфоциты, % CD19 ⁺ B lymphocytes, %	5,0-19,0	11,3 (8,0-15,0)	11,0 (7,6-16,8)	
CD19⁺В-лимфоциты, × 10⁹/л CD19 ⁺ B lymphocytes, × 10 ⁹ /L	0,10-0,50	0,15 (0,09-0,20)	0,07 (0,04-0,10)	0,000402
CD3⁺HLA-DR⁺ активированные Т-лимфоциты, % CD3 ⁺ HLA-DR ⁺ activated T lymphocytes, %	1,3-10,0	17,7 (13,0-23,4)	20,9 (9,8-27,0)	
CD3⁺HLA-DR⁺ активированные Т-лимфоциты, × 10⁹/л CD3 ⁺ HLA-DR ⁺ activated T lymphocytes, × 10 ⁹ /L	0,02-0,30	0,24 (0,17-0,31)	0,09 (0,06-0,20)	0,000769
CD3⁺HLA-DR⁺В-лимфоциты и активированные NK-клетки, % CD3 ⁺ HLA-DR ⁺ B lymphocytes and activated NK cells, %	5,0-20,0	14,9 (11,1-19,7)	16,1 (11,3-24,9)	
CD3⁺HLA-DR⁺В-лимфоциты и активированные NK-клетки, × 10⁹/л CD3 ⁺ HLA-DR ⁺ B lymphocytes and activated NK cells, × 10 ⁹ /L	0,04-0,50	0,19 (0,14-0,26)	0,1 (0,06-0,16)	0,000182
CD4⁺CD25^{bright}CD45⁺ регуляторные Т-хелперные клетки, % от всех Т-хелперов CD4 ⁺ CD25 ^{bright} CD45 ⁺ regulatory T helper cells, % of all T helpers	1,65-5,75	6,8 (5,6-8,6)	7,5 (5,9-10,6)	
CD3⁺CD25⁺Т-клетки, экспрессирующие α-цепь рецептора IL-2, % CD3 ⁺ CD25 ⁺ T cells expressing α-chain of IL-2 receptor IL-2, %	3,5-12,5	21,1 (16,8-25,9)	23,4 (17,1-26,2)	
CD3⁺CD25⁺Т-клетки, экспрессирующие α-цепь рецептора IL-2, × 10⁹/л CD3 ⁺ CD25 ⁺ T cells expressing α-chain of IL-2 receptor, × 10 ⁹ /L	0,06-0,35	0,3 (0,22-0,38)	0,16 (0,05-0,25)	0,000294
CD3⁺CD25⁺ активированные В-лимфоциты и NK-клетки, % CD3 ⁺ CD25 ⁺ activated B lymphocytes and NK cells, %	1,7-2,2	0,9 (0,6-1,3)	0,8 (0,6-1,1)	
CD3⁺CD25⁺ активированные В-лимфоциты и NK-клетки, × 10⁹/л CD3 ⁺ CD25 ⁺ activated B lymphocytes and NK cells, × 10 ⁹ /L	0,04-0,06	0,01 (0,007-0,020)	0,009 (0,03-0,01)	

ТАБЛИЦА 2. АБСОЛЮТНЫЕ ЗНАЧЕНИЯ МАРКЕРОВ АКТИВАЦИИ ЛИМФОЦИТОВ ПАЦИЕНТОВ ГРУПП 1 И 2 ($\times 10^9/\text{л}$, Me ($Q_{0,25}-Q_{0,75}$))

TABLE 2. ABSOLUTE VALUES OF LYMPHOCYTE ACTIVATION MARKERS IN PATIENTS OF GROUPS 1 AND 2 ($\times 10^9/\text{L}$, Me ($Q_{0,25}-Q_{0,75}$))

Показатель Index	Абсолютные значения Absolute values		p
	Группа 1 Group 1	Группа 2 Group 2	
Активированные Т-лимфоциты Activated T lymphocytes CD3 ⁺ HLA-DR ⁺	0,24 (0,17-0,31)	0,09 (0,06-0,20)	0,001
В-лимфоциты и активированные НК-клетки B lymphocytes and activated NK cells CD3 ⁺ HLA-DR ⁺	0,19 (0,14-0,26)	0,10 (0,06-0,16)	0,001
Активированные Т-лимфоциты, экспрессирующие α-цепь рецептора IL-2 Activated T lymphocytes expressing the α -chain of the IL-2 receptor CD3 ⁺ CD25 ⁺	0,3 (0,22-0,38)	0,16 (0,05-0,25)	0,001

нием и тяжелым течением представлены в таблице 1 и 2.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что в группе тяжелых пациентов расчетные показатели вирусной нагрузки были в 16,5 раз выше, чем у пациентов средней тяжести (табл. 3).

При оценке корреляционных связей наблюдались тенденции к снижению относительного количества цитотоксических Т-лимфоцитов

(Т-ЦТЛ) и абсолютного количества активированных CD3⁺ клеток с экспрессией маркера HLA-DR в периферической крови при более высокой вирусной нагрузке. Количество РНК вируса SARS-CoV-2 было достоверно ниже в образцах из носоглотки, взятых на 10-14-й день от момента появления симптомов, чем у пациентов, обследованных на первой неделе заболевания (табл. 4).

ТАБЛИЦА 3. ЗНАЧЕНИЯ ВН У ПАЦИЕНТОВ СО СРЕДНЕТЯЖЕЛЫМ И ТЯЖЕЛЫМ ТЕЧЕНИЕМ COVID-19

TABLE 3. VIRAL LOAD VALUES IN PATIENTS WITH MODERATE TO SEVERE COVID-19

Показатель Index	Me ($Q_{0,25}-Q_{0,75}$)		p
	Средней тяжести Moderate	Тяжелые Severe	
Вирусная нагрузка (расчетные единицы) Viral load	0,57 (0,03-11,94)	9,55 (0,66-17,44)	0,10

ТАБЛИЦА 4. КОРРЕЛЯЦИОННЫЕ СВЯЗИ ВН В КОГОРТЕ ПАЦИЕНТОВ (n = 74)

TABLE 4. CORRELATIONS OF VL IN A COHORT OF PATIENTS (n = 74)

Показатель Index	г-коэффициент Спирмена Spearman's r-coefficient p < 0,05
День болезни Day of illness	-0,38
CD3⁺CD8⁺Т-лимфоциты (цитотоксические лимфоциты – Т-ЦТЛ), % CD3 ⁺ CD8 ⁺ T lymphocytes (cytotoxic lymphocytes – T-CTL), %	-0,27
CD3⁺HLA-DR⁺ активированные Т-лимфоциты, $\times 10^9/\text{л}$ CD3 ⁺ HLA-DR ⁺ activated T lymphocytes, $\times 10^9/\text{L}$	-0,28

По результатам исследования выделили подгруппу пациентов ($n = 8$), у которых значения медианы ВН составляли 900 расч. ед., т. е. практически в 100 раз превышающие значения ВН у тяжелых больных. У данной группы основные значения показателей клеточного иммунитета, такие как абсолютное количество Т-лимфоцитов, CD3⁺Т-лимфоцитов и CD3⁺CD8⁺Т-лимфоцитов, связанные с риском развития тяжелого течения заболевания, были ниже референсных значений. Основные лабораторные показатели активности воспалительного процесса, используемые при принятии клинических решений (CRP и IL-6),

также выходили за границы референсного интервала (табл. 5).

В подгруппе пациентов с высокой ВН выявили сильные положительные корреляционные связи с относительным количеством цитотоксических лимфоцитов (CD3⁺CD8⁺), активированных Т-лимфоцитов (CD3⁺HLA-DR⁺), а также абсолютным и относительным содержанием активированных В-лимфоцитов и NK-клеток (CD3⁺CD25⁺). В то же время установили сильную отрицательную корреляцию между количеством РНК вируса и возрастом пациентов (табл. 6).

ТАБЛИЦА 5. ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ ПОДГРУППЫ ПАЦИЕНТОВ ($n = 8$)

TABLE 5. IMMUNOLOGICAL PARAMETERS OF A SUBGROUP OF PATIENTS ($n = 8$)

Показатель Index	Референсные значения Reference values	Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)
Кол-во лимфоцитов, $\times 10^9$ /л Number of lymphocytes, $\times 10^9$ /L	1,2-2,5	0,9 (0,73-1,60)
CD3 ⁺ Т-лимфоциты, $\times 10^9$ /л CD3 ⁺ T lymphocytes, $\times 10^9$ /L	0,8-2,2	0,6 (0,44-1,30)
CD3 ⁺ CD8 ⁺ Т-лимфоциты (цитотоксические лимфоциты – Т-ЦТЛ), $\times 10^9$ /л CD3 ⁺ CD8 ⁺ T lymphocytes (cytotoxic lymphocytes – T-CTL), $\times 10^9$ /L	0,3-0,9	0,3 (0,1-0,4)
CRP, мг/л CRP, mg/L	0,0-5,0	20,5 (9,0-53,0)
IL-6, пг/мл IL-6, pg/mL	0,0-10,0	16,9 (2,6-81,5)

ТАБЛИЦА 6. КОРРЕЛЯЦИОННЫЕ СВЯЗИ ВН ПОДГРУППЫ ПАЦИЕНТОВ ($n = 8$)

TABLE 6. CORRELATIONS OF VIRAL LOAD IN A SUBGROUP OF PATIENTS ($n = 8$)

Показатель Index	r-коэффициент Спирмена Spearman's r-coefficient $p < 0,05$
Возраст, лет Age, years	-0,79
CD3 ⁺ CD8 ⁺ Т-лимфоциты (цитотоксические лимфоциты – Т-ЦТЛ), % (CD3 ⁺ CD8 ⁺ T lymphocytes (cytotoxic lymphocytes – T-CTL), %	0,76
CD3 ⁺ HLA-DR ⁺ активированные Т-лимфоциты, % CD3 ⁺ HLA-DR ⁺ activated T lymphocytes, %	0,74
CD3 ⁺ CD25 ⁺ активированные В-лимфоциты и NK-клетки, % CD3 ⁺ CD25 ⁺ activated B lymphocytes and NK cells, %	0,74
CD3 ⁺ CD25 ⁺ активированные В-лимфоциты и NK-клетки, $\times 10^9$ /л CD3 ⁺ CD25 ⁺ activated B lymphocytes and NK cells, $\times 10^9$ /L	0,84

Обсуждение

Нами установлено, что ВН в образцах, взятых из верхних дыхательных путей у поступающих в стационар пациентов, имела обратную зависимость от сроков развития заболевания ($r = -0,38$). Данная тенденция подтверждается исследованиями, в которых пиковая нагрузка SARS-CoV-2 в образцах верхних дыхательных путей приходилась на ранние стадии заболевания [8, 27], а в образцах нижних дыхательных путей — примерно через две недели после появления симптомов [26]. Оценка ВН у пациентов с ОРДС показала, что пиковое выделение вируса в респираторных образцах происходит примерно через 10-12 дней с момента появления симптомов [6, 9, 26]. Выявленное снижение ВН в зависимости от сроков наблюдения может быть связано с уходом вируса в легкие, с последующим утяжелением заболевания.

Интерес к установлению взаимосвязи ВН с течением заболевания проявляют многие исследователи. Установлено, что количество вирусной РНК, обнаруженное в различных биологических образцах, было выше среди тяжелобольных пациентов, чем среди пациентов с легкой формой заболевания и бессимптомных носителей [23, 26]. В нашем исследовании наблюдалось ярко выраженное превышение значения медианы ВН (в 16,5 раза) в группе тяжелых пациентов. Сравнительный анализ ВН между группами со средней и тяжелой формами течения заболевания выявил различия на уровне статистической тенденции ($p = 0,1$), что по-видимому, связано с особенностями выборки пациентов, вошедших в исследование. Кроме того, снижение количества цитотоксических Т-лимфоцитов и активированных общих Т-клеток, ассоциированных с тяжестью течения заболевания, коррелировало с высокой ВН.

Представляются интересными данные литературы о наличии прямых корреляций между вирусной нагрузкой РНК в плазме с количеством нейтрофилов в крови тяжелобольных пациентов и предположение о неспособности контролировать репликацию вируса иммунной системой за счет нейтрофильно-опосредованных реакций в патогенезе тяжелого течения инфекции [3, 20].

В связи с вышесказанным особое внимание было уделено подгруппе из 8 пациентов, у которых ВН в образцах из верхних дыхательных путей приблизительно в 100 раз превышала ВН у остальных исследуемых. Следует отметить, что средний возраст больных этой группы был равен 48 годам (± 8 лет), у них не было выявлено зависимости уровня ВН от сроков развития инфекции, и заболевание завершилось благоприятным исходом. Кроме того, у этих пациентов на-

блюдалось снижение абсолютного числа целого ряда показателей клеточного звена адаптивной иммунной системы (лимфопения, $CD3^+$ лимфоциты, $CD3^+CD8^+$ Т-ЦТЛ) и повышение уровня маркеров воспалительных реакций (СРБ, IL-6), что по данным литературы может сопровождать иммунную дисфункцию при SARS-CoV-2 инфекции [19]. Характер изменения диагностических лабораторных критериев тяжести заболевания, таких как истощение Т-, В-лимфоцитарной клеточной популяции и NK-клеток в периферической крови, а также ассоциация тяжести инфекции с низкой экспрессией человеческого лейкоцитарного антигена (HLA-DR), опосредованной IL-6, подтверждаются данными литературы [7, 15]. В нашем исследовании были установлены сильные прямые корреляции ВН с относительным количеством Т-ЦТЛ и высоким относительным и абсолютным числом В-лимфоцитов и NK-клеток с экспрессией маркеров активации (HLA-DR, CD25). Выявленные изменения иммунологических показателей, даже на фоне чрезвычайно высокой ВН, могут соответствовать развитию эффективного ответа врожденной и адаптивной иммунной системы на вирусную инфекцию.

Заключение

Выявлена взаимосвязь развития тяжелого состояния у пациентов COVID-19 с уровнем ВН. Высокие уровни вирусной РНК в биологических образцах коррелируют с основными показателями Т-клеточного звена иммунной системы, ассоциированными с тяжестью течения заболевания.

Очевидно, что лабораторная диагностика иммунологических изменений имеет важное значение уже на этапе госпитализации пациентов в стационар. Поиск новых диагностических критериев регуляции иммунного ответа, безусловно, представляет научно-практический интерес. В качестве кандидатов в лабораторные маркеры благоприятного течения инфекции, вызванной SARS-CoV-2, можно рассматривать изменение уровня экспрессии рецепторов активации на иммунокомпетентных клетках.

Таким образом, мониторинг малых субпопуляций Т- и В-лимфоцитов и натуральных киллерных клеток, экспрессирующих маркеры активации HLA-DR и CD25, в совокупности с оценкой уровня вирусной нагрузки позволит повысить информативность и прогностическое значение ранней диагностики состояния пациентов с новой коронавирусной инфекцией.

Список литературы / References

1. Bao J, Li C., Zhang K., Kang H., Chen W., Gu B. Comparative analysis of laboratory indexes of severe and non-severe patients infected with COVID-19. *Clin. Chim. Acta*, 2020, Vol. 509, pp. 180-194.
2. Bermejo-Martin J.F., Almansa R., Menéndez R., Mendez R., Kelvin D.J., Torres A. Lymphopenic community acquired pneumonia as signature of severe COVID-19 infection. *J. Infect.*, 2020, Vol. 80, no. 5, pp. e23-e24.
3. Bermejo Martin J.F., González-Rivera M., Almansa R., Micheloud D., Tedim A.P., Domínguez-Gil M., Resino S., Martín-Fernández M., Ryan Murua P., Pérez-García F., Tamayo L., Lopez-Izquierdo R., Bustamante E., Aldecoa C., Gómez J.M., Rico-Feijoo J., Orduña A., Méndez R., Fernández Natal I., Megías G., González-Estecha M., Carriedo D., Doncel C., Jorge N., Ortega A., de la Fuente A., del Campo F., Fernández-Ratero J.A., Trapiello W., González-Jiménez P., Ruiz G., Kelvin A.A., Ostadgavahi A.T., Oneizat R., Ruiz L.M., Miguéns I., Gargallo E., Muñoz I., Pelegrin S., Martín S., Olivares P.G., Cedeno J.A., Albi T.R., Puertas C., Berezo J.Á., Renedo G., Herrán R., Bustamante-Munguira J., Enríquez P., Cicuendez R., Blanco J., Abadia J., Barquero J.G., Mamolar N., Blanca-López N., Valdivia L.J., Caso B.F., Mantecón M.Á., Motos A., Fernandez-Barat L., Ferrer R., Barbé F., Torres A., Menéndez R., Eiros J.M., Kelvin D.J. Viral RNA load in plasma is associated with critical illness and a dysregulated host response in COVID-19. *Crit. Care*, 2020, Vol. 24, no. 1, 691. doi:10.1186/s13054-020-03398-0.
4. Cevik M., Bamford C.G., Ho A. COVID-19 pandemic-a focused review for clinicians. *Clin. Microbiol. Infect.*, 2020, Vol. 26, no. 7, pp. 842-847.
5. Chen X., Zhao B., Qu Y., Chen Y., Xiong J., Feng Y., Men D., Huang Q., Liu Y., Yang B., Ding J., Li F. Detectable serum severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 viral load (RNAemia) is closely correlated with drastically elevated interleukin 6 level in critically ill patients with coronavirus disease 2019. *Clin. Infect. Dis.*, 2020, Vol. 71, no. 8, pp. 1937-1942.
6. Cheng P.K., Wong D.A., Tong L.K., Ip S.M., Lo A.C., Lau C.S., Yeung E.Y., Lim W.W. Viral shedding patterns of coronavirus in patients with probable severe acute respiratory syndrome. *Lancet*, 2004, Vol. 363, pp. 1699-1700.
7. Giamarellos-Bourboulis E.J., Netea M.G., Rovina N., Akinosoglou K., Antoniadou A., Antonakos N., Damoraki G., Gkavogianni T., Adami M.E., Katsaounou P., Ntaganou M., Kyriakopoulou M., Dimopoulos G., Koutsodimitropoulos I., Velissaris D., Koufargyris P., Karageorgos A., Katrini K., Lekakis V., Lupse M., Kotsaki A., Renieris G., Theodoulou D., Panou V., Koukaki E., Koulouris N., Gogos C., Koutsoukou A. Complex immune dysregulation in COVID-19 patients with severe respiratory failure. *Cell Host Microbe*, 2020, Vol. 27, no. 6, pp. 992-1000.e3.
8. He X., Lau E.H., Wu P., Deng X., Wang J., Hao X., Lau Y.C., Wong J.Y., Guan Y., Tan X., Mo X., Chen Y., Liao B., Chen W., Hu F., Zhang Q., Zhong M., Wu Y., Zhao L., Zhang F., Cowling B.J., Li F., Leung G.M. Temporal Dynamics in viral shedding and transmissibility of COVID-19. *Nat. Med.*, 2020, Vol. 26, no. 5, pp. 672-675.
9. Hung I.F., Cheng V.C., Wu A.K., Tang B.S., Chan K.H., Chu C.M., Wong M.M., Hui W.T., Poon L.L., Tse D.M., Chan K.S., Woo P.C., Lau S.K., Peiris J.S., Yuen K.Y. Viral loads in clinical specimens and SARS manifestations. *Emerg. Infect. Dis.*, 2004, Vol. 10, no. 9, pp. 1550-1557.
10. Laing A.G., Lorenc A., del Molino del Barrio I., Das A., Fish M., Monin L., Muñoz-Ruiz M., McKenzie D.R., Hayday T. S., Francos-Quijorna I., Kamdar S., Joseph M., Davies D., Davis R., Jennings A., Zlatareva I., Vantourout P., Wu Y., Sofra V., Cano F., Greco M., Theodoridis E., Freedman J.D., Gee S., Chan J.N.E., Ryan S., Bugallo-Blanco E., Peterson P., Kisand K., Haljasmägi L., Chadli L., Moingeon P., Martinez L., Merrick B., Bisnauthsing K., Brooks K., Ibrahim M.A.A., Mason J., Lopez Gomez F., Babalola K., Abdul-Jawad S., Cason J., Mant C., Seow J., Graham Carl., Doores K.J., Di Rosa F., Edgeworth J., Shankar-Hari M., Hayday A.C. Author Correction: A dynamic COVID-19 immune signature includes associations with poor prognosis. *Nat Med.*, 2020, Vol. 26, no. 12, 1951. doi: 10.1038/s41591-020-01186-5.
11. Leisman D.E., Ronner L., Pinotti R., Taylor M.D., Sinha P., Calfee C.S., Hirayama A.V., Mastroiani F., Turtle C.J., Harhay M.O., Legrand M., Deutschman C.S. Cytokine elevation in severe and critical COVID-19: a rapid systematic review, meta-analysis, and comparison with other inflammatory syndromes. *Lancet Respir. Med.*, 2020, Vol. 8, no. 12, pp. 1233-1244.
12. Magleby R., Westblade L.F., Trzebucki A., Simon M.S., Rajan M., Park J., Goyal P., Safford M.M., Satlin M.J. Impact of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Viral Load on Risk of Intubation and Mortality Among Hospitalized Patients With Coronavirus Disease 2019. *Clin. Infect. Dis.*, 2021, Vol. 73, no. 11, pp. e4197-e4205.
13. Memish Z.A., Al-Tawfiq J.A., Makhdoom H.Q., Assiri A., Alhakeem R.F., Albarrak A., Alsubaie S., Al-Rabeeh A.A., Hajomar W.H., Hussain R., Kheyami A.M., Almutairi A., Azhar E.I., Drosten C., Watson S.J., Kellam P., Cotten M., Zumla A. Respiratory tract samples, viral load, and genome fraction yield in patients with Middle East respiratory syndrome. *J. Infect. Dis.*, 2014, Vol. 210, no. 10, pp. 1590-1594.
14. Monneret G., Cour M., Viel S., Venet F., Argaud L. Coronavirus disease 2019 as a particular sepsis: a 2-week follow-up of standard immunological parameters in critically ill patients. *Intensive Care Med.*, 2020, Vol. 46, no. 9, pp. 1764-1765.
15. Ohno Y., Kitamura H., Takahashi N., Ohtake J., Kaneumi S., Sumida K., Homma S., Kawamura H., Minagawa N., Shibasaki S., Taketomi A. IL-6 down-regulates HLA class II expression and IL-12 production of human dendritic cells to impair activation of antigen-specific CD4(+) T cells. *Cancer Immunol. Immunother.*, 2016, Vol. 65, no. 2, pp. 193-204.

16. Pan Y., Zhang D., Yang P., Poon L.L.M., Wang Q. Viral load of SARS-CoV-2 in clinical samples. *Lancet Infect. Dis.*, 2020, Vol. 20, no. 4, pp. 411-412.
17. Peiris J.S.M., Chu C.M., Cheng V.C., Chan K.S., Hung I.F., Poon L.L., Law K.I., Tang B.S., Hon T.Y., Chan C.S., Chan K.H., Ng J.S., Zheng B.J., Ng W.L., Lai R.W., Guan Y., Yuen K Y., HKU/UCH SARS Study Group. Clinical progression and viral load in a community outbreak of coronavirus-associated SARS pneumonia: a prospective study. *Lancet*, 2003, Vol. 361, no. 9371, pp. 1767-1772.
18. Rainer T.H., Lee N., Ip M., Galvani A.P., Antonio G.E., Wong K.T., Chan D.P., Ng A.W., Shing K.K., Chau S.S., Mak P., Chan P.K., Ahuja A.T., Hui D.S., Sung J.J. Features discriminating SARS from other severe viral respiratory tract infections. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 2007, Vol. 26, no. 2, pp. 121-129.
19. Song C.Y., Xu J., He J.Q., Lu Y.Q. COVID-19 early warning score: a multi-parameter screening tool to identify highly suspected patients. *medRxiv*, 2020. doi: 10.1101/2020.03.05.20031906.
20. Venet F., Monneret G. Advances in the understanding and treatment of sepsis-induced immunosuppression. *Nat. Rev. Nephrol.*, 2018, Vol. 14, no. 2, pp. 121-137.
21. Veyer D., Kernéis S., Poulet G., Wack M., Robillard N., Taly V., L'Honneur A. S., Rozenberg F., Laurent-Puig P., Bélec L., Hadjadj J., Terrier B., Péré H. Highly Sensitive Quantification of Plasma Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 RNA Sheds Light on its Potential Clinical Value. *Clin. Infect. Dis.*, 2021, Vol. 73, no. 9, pp. e2890-e2897.
22. WHO. Laboratory testing for 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) in suspected human cases. Interim guidance, Jan 17, 2020. Available at: <https://www.who.int/publications-detail/laboratory-testing-for-2019-novelcoronavirus-in-suspected-human-cases-20200117> (accessed Feb 11, 2020).
23. Yuan Y., Wang H., Zhao J., Jing N., Xu J., Li W., Ma B., Zhang J., Li G., Wang S., Li Y., Wang Y., Fan E., Li L. Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Viral RNA Load Status and Antibody Distribution Among Patients and Asymptomatic Carriers in Central China. *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, 2021, Vol. 11, 559447. doi: 10.3389/fcimb.2021.559447.
24. Zaki A.M., van Boheemen S., Bestebroer T.M., Osterhaus A.D., Fouchier R.A. Isolation of a novel coronavirus from a man with pneumonia in Saudi Arabia. *N. Engl. J. Med.*, 2012, Vol. 367, pp. 1814-1820.
25. Zhang W., Du R.H., Li B., Zheng X.S., Yang X.L., Hu B., Wang Y.Y., Xiao G.F., Yan B., Shi Z.L., Zhou P. Molecular and serological investigation of 2019-nCoV infected patients: implication of multiple shedding routes. *Emerg. Microbes Infect.*, 2020, Vol. 9, no. 1, pp. 386-389.
26. Zheng S., Fan J., Yu F., Feng B., Lou B., Zou Q., Xie G., Lin S., Wang R., Yang X., Chen W., Wang Q., Zhang D., Liu Y., Gong R., Ma Z., Lu S., Xiao Y., Gu Y., Zhang J., Yao H., Xu K., Lu X., Wei G., Zhou J., Fang Q., Cai H., Qiu Y., Sheng J., Chen Y., Liang T. Viral load dynamics and disease severity in patients infected with SARS-CoV-2 in Zhejiang province, China, January-March 2020: retrospective cohort study. *BMJ*, 2020, Vol. 369, m1443. doi:10.1136/bmj.m1443.
27. Zou L., Ruan F., Huang M., Liang L., Huang H., Hong Z., Yu J., Kang M., Song Y., Xia J., Guo Q., Song T., He J., Yen H.-L., Peiris M., Wu J. SARS-CoV-2 viral load in upper respiratory specimens of infected patients. *N. Engl. J. Med.*, 2020, Vol. 382, pp. 1177-1179.

Авторы:

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

Александрова Е.В. — преподаватель кафедры клинической биохимии и лабораторной диагностики ФГБВОУ ВО «Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова», Санкт-Петербург, Россия

Криворучко А.Б. — к.м.н., доцент 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

Authors:

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

Alexandrova E.V., Lecturer, Department of Clinical Biochemistry and Laboratory Diagnostics, S.M. Kirov Military Medical Academy, St. Petersburg, Russian Federation

Krivoruchko A.B., PhD (Medicine), Associate Professor, 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

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

Жданов К.В. — д.м.н., профессор, член-корр. РАН, начальник кафедры инфекционных болезней ФГБВОУ ВО «Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова», Санкт-Петербург, Россия

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

Козлов К.В. — д.м.н., доцент 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

Мальцев О.В. — к.м.н., старший преподаватель кафедры инфекционных болезней (с курсом медицинской паразитологии и тропических заболеваний) ФГБВОУ ВО «Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова», Санкт-Петербург, Россия

Иванов К.С. — д.м.н., профессор, профессор кафедры инфекционных болезней (с курсом медицинской паразитологии и тропических заболеваний) ФГБВОУ ВО «Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова», Санкт-Петербург, Россия

Ляшенко Ю.И. — д.м.н., профессор, профессор кафедры инфекционных болезней (с курсом медицинской паразитологии и тропических заболеваний) ФГБВОУ ВО «Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова», Санкт-Петербург, Россия

Масалов Е.Б. — врач клиник инфекционных болезней ФГБВОУ ВО «Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова», Санкт-Петербург, Россия

Minaeva L.V., PhD (Medicine), Senior Lecturer, Department of Clinical Biochemistry and Laboratory Diagnostics, S.M. Kirov Military Medical Academy, St. Petersburg, Russian Federation

Zhdanov K.V., PhD, MD (Medicine), Professor, Corresponding Member, Russian Academy of Sciences, Head, Department of Infectious Diseases, S.M. Kirov Military Medical Academy, St. Petersburg, Russian Federation

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

Kozlov K.V., PhD, MD (Medicine), Associate Professor, 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

Maltsev O.V., PhD (Medicine), Senior Lecturer, Department of Infectious Diseases (with a course in Medical Parasitology and Tropical Diseases), S.M. Kirov Military Medical Academy, St. Petersburg, Russian Federation

Ivanov K.S., PhD, MD (Medicine), Professor, Department of Infectious Diseases (with a course in Medical Parasitology and Tropical Diseases), S.M. Kirov Military Medical Academy, St. Petersburg, Russian Federation

Lyashenko Yu.I., PhD, MD (Medicine), Professor, Department of Infectious Diseases (with a course in Medical Parasitology and Tropical Diseases), S.M. Kirov Military Medical Academy, St. Petersburg, Russian Federation

Masalov E.B., Clinical Infectiologist, S.M. Kirov Military Medical Academy, St. Petersburg, Russian Federation

Поступила 25.09.2022

Отправлена на доработку 28.10.2022

Принята к печати 08.11.2022

Received 25.09.2022

Revision received 28.10.2022

Accepted 08.11.2022

ОСОБЕННОСТИ ФОРМИРОВАНИЯ ПОСТВАКЦИНАЛЬНОГО ГУМОРАЛЬНОГО ИММУННОГО ОТВЕТА У ЛИЦ, ПЕРЕНЕСШИХ COVID-19 РАЗНОЙ СТЕПЕНИ ТЯЖЕСТИ

**Иванова И.А., Филиппенко А.В., Труфанова А.А., Омельченко Н.Д.,
Чемисова О.С., Носков А.К.**

ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора, г. Ростов-на-Дону, Россия

Резюме. Изучение гуморального иммунного ответа у лиц, перенесших COVID-19 и вакцинированных противокоронавирусными вакцинами, позволяет оценить формирование «гибридного» иммунитета, что способствует пониманию механизмов его формирования от эффекторной фазы до фазы иммунологической памяти. Мы оценили относительное и абсолютное содержание популяций и субпопуляций В-лимфоцитов, формирование гуморального иммунитета у перенесших COVID-19 разной степени тяжести и впоследствии вакцинированных «КовиВак» и «Спутник V».

В эксперименте принимали участие волонтеры (возраст $47,3 \pm 14,5$ года), переболевшие COVID-19 бессимптомно ($n = 32$), в средней степени тяжести ($n = 21$) и в тяжелой форме ($n = 12$), которые через 6-9 месяцев после выздоровления были привиты «КовиВак» и «Спутник V». Группы вакцинированных состояли из болевших: тяжело, привитых «КовиВак» ($n = 6$) и «Спутник V» ($n = 6$); в средней степени тяжести, привитых «КовиВак» ($n = 10$) и «Спутник V» ($n = 11$); бессимптомно, привитых «КовиВак» ($n = 10$) и «Спутник V» ($n = 22$).

У волонтеров определяли относительное и абсолютное количество В-лимфоцитов ($CD45^+CD19^+$), В1-лимфоцитов ($CD45^+CD5^+CD19^+CD27^-$), В2-лимфоцитов ($CD45^+CD19^+CD5^+CD27^-$), общей популяции В-клеток памяти ($CD45^+CD19^+CD5^+CD27^+$), непереключенных ($CD45^+CD19^+IgD^+CD27^+$) и переключенных ($CD45^+CD19^+IgD^+CD27^+$) В-клеток памяти, зрелых наивных В-лимфоцитов ($CD45^+CD19^+CD27^-IgD^+$), плазмобластов ($CD45^+CD19^+CD38^{+++}IgD^+CD27^+$), а также наличие иммуноглобулинов класса G к S(RBD)-белку SARS-CoV-2.

Выявлено, что у перенесших COVID-19 разной степени тяжести гуморальный иммунитет сохраняется до девяти месяцев. Наибольшее количество волонтеров, имеющих антитела к S-белку SARS-CoV-2, было зарегистрировано в группе тяжелопереболевших, а через месяц после вакцинации «Спутник V» и до конца эксперимента все обследованные этой группы стали серопозитивны. Через 4-5 месяцев после введения этой вакцины у всех болевших бессимптомно и в средней форме присутствовали специфические иммуноглобулины. Все волонтеры, получившие «КовиВак», имели

Адрес для переписки:

*Иванова Инна Александровна
ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный
институт» Роспотребнадзора
344002, Россия, г. Ростов-на-Дону,
ул. Максима Горького, 117/40.
Тел.: 8 (863) 240-91-22.
Факс: 8 (863) 267-02-23.
E-mail: ivanova_ia@antiplague.ru*

Address for correspondence:

*Inna A. Ivanova
Rostov-on-Don Anti-Plague Institute
117/40 Maxim Gorky St
Rostov-on-Don
344002 Russian Federation
Phone: +7 (863) 240-91-22.
Fax: +7 (863) 267-02-23.
E-mail: ivanova_ia@antiplague.ru*

Образец цитирования:

*И.А. Иванова, А.В. Филиппенко, А.А. Труфанова,
Н.Д. Омельченко, О.С. Чемисова, А.К. Носков
«Особенности формирования поствакцинального
гуморального иммунного ответа у лиц, перенесших
COVID-19 разной степени тяжести» // Медицинская
иммунология, 2023. Т. 25, № 1. С. 181-192.
doi: 10.15789/1563-0625-FOP-2585*

© Иванова И.А. и соавт., 2023
Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

*I.A. Ivanova, A.V. Filippenko, A.A. Trufanova,
N.D. Omelchenko, O.S. Chemisova, A.K. Noskov
“Features of post-vaccination humoral immune response in the persons
who underwent COVID-19 of various severity”, Medical
Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2023,
Vol. 25, no. 1, pp. 181-192.
doi: 10.15789/1563-0625-FOP-2585*

© Ivanova I.A. et al., 2023
The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License
DOI: 10.15789/1563-0625-FOP-2585

антитела к S-белку возбудителя COVID-19 от начала и до конца исследования. Вакцинация, особенно «КовиВак», способствовала наибольшему увеличению относительного и абсолютного количества В-лимфоцитов памяти у болевших бессимптомно. Менее выраженные изменения в содержании В-лимфоцитов у перенесших COVID-19 тяжело и в средней форме, возможно, связаны с более высоким уровнем этих клеток до введения вакцин. Обнаружена положительная корреляция между количеством В-клеток памяти и наличием иммуноглобулинов к S-белку SARS-CoV-2 у всех обследованных.

Ключевые слова: гуморальный иммунитет, SARS-CoV-2, вакцины, популяции В-лимфоцитов, В-лимфоциты памяти, иммуноглобулины

FEATURES OF POST-VACCINATION HUMORAL IMMUNE RESPONSE IN THE PERSONS WHO UNDERWENT COVID-19 OF VARIOUS SEVERITY

Ivanova I.A., Filippenko A.V., Trufanova A.A., Omelchenko N.D., Chemisova O.S., Noskov A.K.

Rostov-on-Don Anti-Plague Institute, Rostov-on-Don, Russian Federation

Abstract. The studies on humoral immune response in the individuals who have undergone COVID-19 and vaccinated with anti-COVID vaccines allows us to assess the development of “hybrid” immunity, which contributes to understanding the mechanisms of its formation from the effector phase to the step of immunological memory. We assessed the relative and absolute contents of B cell populations and subpopulations, development of humoral immunity in the patients who suffered with COVID-19 of varying severity being thereafter vaccinated with “KoviVak” and “Sputnik V”. The study involved volunteers (age 47.3 ± 14.5 years) who bore COVID-19 asymptotically ($n = 32$), at moderate severity ($n = 21$), or had severe form of the disease ($n = 12$), then being vaccinated with “KoviVak” and “Sputnik V” 6-9 months after their recovery. The groups of vaccinated persons consisted of those who bore severe disease being vaccinated with “KoviVak” ($n = 6$) or “Sputnik V” ($n = 6$); moderate cases, vaccinated with “KoviVak” ($n = 10$) and “Sputnik V” ($n = 11$); asymptomatic cases vaccinated with “KoviVak” ($n = 10$) and “Sputnik V” ($n = 22$). We have determined relative and absolute numbers of B lymphocytes ($CD45^+CD19^+$), B1 lymphocytes ($CD45^+CD5^+CD19^-CD27^-$), B2 lymphocytes ($CD45^+CD19^+CD5^-CD27^-$), total population of memory B cells ($CD45^+CD19^+CD5^-CD27^+$), non-switched ($CD45^+CD19^+IgD^+CD27^+$), and switched ($CD45^+CD19^+IgD^-CD27^+$) memory B cells; mature naive B lymphocytes ($CD45^+CD19^+CD27^-IgD^+$), plasmoblasts ($CD45^+CD19^+CD38^{+++}IgD^-CD27^+$), as well as presence of IgG to S(RBD)-SARS-CoV-2 protein.

We have found that the humoral immunity among survivors of COVID-19 of varying severity is expressed for up to nine months. The largest number of volunteers who raised antibodies to SARS-CoV-2 S-protein was registered in the group of seriously ill patients. As soon as 1 month after “Sputnik V” vaccination and until the end of the observation, all the examined subjects in this group became seropositive. 4-5 months after injection of this vaccine, specific immunoglobulins were present in all patients who had asymptomatic or average-severity infection. All volunteers who received “KoviVak” had antibodies to the COVID-19 viral S protein from the beginning to the end of the study. Vaccination, especially with “KoviVak”, contributed to the highest increase, both in relative and absolute numbers of memory B lymphocytes in asymptomatic patients. Less pronounced changes in the content of B lymphocytes in COVID-19 patients who had severe and moderate clinical course may be associated with higher levels of these cells prior to injection of the vaccines. A positive correlation was found between the number of memory B cells and presence of immunoglobulins to the S protein SARS-CoV-2 in all examined patients.

Keywords: humoral immunity, SARS-CoV-2, vaccines, B lymphocytes populations, memory B lymphocytes, immunoglobulins

Введение

Динамика и напряженность иммунного ответа у лиц, перенесших новую коронавирусную инфекцию, в настоящее время активно изучаются. У пациентов с COVID-19 достаточно быстро происходит индукция В- и Т-клеточных реакций

при заражении, а через несколько недель после выздоровления регистрируется формирование антиген-специфических В- и Т-клеток памяти [7, 8].

Популяция В-клеток играет главную роль в обеспечении гуморального иммунного ответа, основная функция которого — заставить плазма-

тические клетки вырабатывать нейтрализующие антитела. Хотя гуморальный иммунитет не является основным эффекторным механизмом при вирусных инфекциях, он играет важную роль в устранении возбудителя COVID-19 [13], а наличие и количество специфических иммуноглобулинов может быть использовано в качестве маркеров напряженности как постинфекционного, так и поствакцинального противоковидного иммунитета [14].

Показано, что SARS-CoV-2 вызывает устойчивый В-клеточный ответ, о чем свидетельствует быстрая продукция специфических иммуноглобулинов (Ig) в течение нескольких дней после заражения. При острой инфекции появляются IgM, обеспечивающие первую линию обороны от вируса, затем продуцируются высокоаффинные IgG, опосредующие долговременную противовирусную защиту. Продукция IgM начинается уже через 3 дня после заражения, достигая своего пика к третьей неделе, а IgG были выявлены в сыворотке заболевших уже через 4 дня после заражения, максимальное их количество было зарегистрировано через три недели после инфицирования [1]. Однако, по результатам проведенных исследований, примерно у 10-15% выздоравливающих IgG к SARS-CoV-2 не синтезировались, что может быть связано либо с ложноположительными результатами ПЦР, либо наличием у некоторых пациентов иммунных барьеров, которые препятствуют захвату антигена и формированию гуморального иммунного ответа [6, 9].

В то же время титры антител могут быть не единственным определяющим фактором для оценки успеха формирования гуморального иммунитета против COVID-19. В-клетки памяти, образовавшиеся во время первичной инфекции, способны быстро реагировать на повторное заражение, образуя плазматические клетки, которые синтезируют иммуноглобулины, обеспечивая долгосрочную защиту [2, 10]. Причем при вторичном иммунном ответе реакция В-клеток памяти более быстрая и эффективная, чем при первичном, обеспечивающаяся особой транскрипционной программой, позволяющей им длительно циркулировать в организме без Т-клеточной помощи и антигена, вызвавшего их образование, и быстро отвечать на его повторное введение [3].

По наличию того или иного набора клеточных маркеров на мембране можно судить о происхождении и функциональном состоянии В-лимфоцита. Для В-клеток памяти человека характерно наличие маркера CD27. Помимо различий в происхождении, эти клетки также отличаются уровнями экспрессии CD38, CD21, CD24, CD19, CD25 и CD45 [3].

Мембранный антиген CD19 является основным маркером для типирования периферических В-лимфоцитов человека. По степени экспрессии других поверхностных молекул различают несколько субпопуляций В-клеток. Одна из используемых в настоящее время классификаций В-клеток основана на определении уровней экспрессии IgD и CD27⁺ [11]. Согласно этой классификации В-клетки памяти (CD19⁺CD27⁺) делятся на непереключенные (CD19⁺IgD⁺CD27⁺) и переключенные (CD19⁺IgD⁻CD27⁺) клетки. У наивных В-клеток отсутствует антиген CD27⁺(CD19⁺IgD⁺CD27⁻). В-клетки на разных этапах также отличаются экспрессией CD38⁺ в сочетании с IgD и CD10/CD24. Незрелые и транзиторные В-клетки (CD19⁺IgD⁺CD10⁺CD24⁺⁺CD38⁺⁺CD27⁻) характеризуются средней степенью экспрессии CD38⁺. Высокая экспрессия этого маркера проявляется у плазмочитов и плазмобластов (CD38⁺⁺⁺IgD⁻CD27⁺CD20⁻) [5].

При COVID-19 величина и продолжительность иммунного ответа, в том числе и гуморального, напрямую зависит от антигенной нагрузки и гетерогенности между отдельными лицами во всех иммунных реакциях на SARS-CoV-2. Показано, что количество S- и RBD-специфичных В-клеток памяти увеличивается в тяжелых случаях инфекции, по сравнению с легким ее течением, что подчеркивает важность антигенной нагрузки в силе гуморальных реакций [16].

Детальное изучение гуморального иммунного ответа у лиц, перенесших COVID-19 разной степени тяжести, может дать ответы об этапах его формирования от эффекторной фазы до фазы иммунологической памяти [7]. Исследование гуморального звена иммунитета у таких пациентов, вакцинированных противоковидными вакцинами, позволит оценить формирование и напряженность «гибридного» иммунитета.

Целью работы явилась оценка популяций и субпопуляций В-лимфоцитов, формирования гуморального иммунного ответа у лиц, перенесших COVID-19 разной степени тяжести и впоследствии вакцинированных «КовиВак» и «Спутник V».

Материалы и методы

Обследовано 65 переболевших новой коронавирусной инфекцией, средний возраст обследуемых составил 47,3±14,5 года. Волонтеров распределили на три группы по степени тяжести перенесенной инфекции: бессимптомно – 32 человека (9 мужчин, 23 женщины); средней степени тяжести – 21 человек (7 мужчин, 14 женщин); в тяжелой форме – 12 человек (3 мужчины, 9 женщин). Бессимптомное течение заболевания подтверждалось положительным тестом ПЦР при

отсутствии клинических симптомов. У волонтеров со средней степенью тяжести инфекции, при положительном тесте ПЦР, присутствовали симптомы ОРВИ без поражения легких. В группу с тяжелым течением заболевания относили пациентов с положительным тестом ПЦР и поражением легких 30 и более %. Группу контроля составили 8 здоровых человек (женщины) (ПЦР-тест отрицательный, специфические антитела отсутствовали, без признаков ОРВИ) в возрасте $35,5 \pm 3,46$ лет. По прошествии 6-9 месяцев после выздоровления волонтеры были привиты противокоронавирусными вакцинами: «КовиВак» (ФГБНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН», Россия) и «Спутник V» (ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи», Россия). Группы вакцинированных распределились следующим образом: тяжелопереболевшие – привитые «КовиВак» (6 человек, из них 5 женщин, 1 мужчина), «Спутник V» (6 человек, из них 4 женщины, 2 мужчины); средней степени тяжести – привитые «КовиВак» (10 человек, из них 7 женщин, 3 мужчины) и «Спутник V» (11 человек, из них 7 женщин, 4 мужчины); бессимптомно – привитые «КовиВак» (10 человек, из них 7 женщин, 3 мужчины) и «Спутник V» (22 человека, из них 16 женщин, 6 мужчин).

От всех участвующих в исследовании получено добровольное информированное согласие на участие в эксперименте. Взятие крови осуществляли путем пункции локтевой вены в утренние часы натощак. Для иммунофенотипирования кровь забирали в пробирку VACUTAINER (BD), содержащую динатриевую соль ЭДТА.

Определяли относительное и абсолютное количество В-лимфоцитов ($CD45^+CD19^+$), В1-лимфоцитов ($CD45^+CD5^+CD19^-CD27^-$), В2-лимфоцитов ($CD45^+CD19^+CD5^-CD27^-$), общей популяции В-клеток памяти ($CD45^+CD19^+CD5^-CD27^+$), непереключенных ($CD45^+CD19^+IgD^+CD27^+$) и переключенных ($CD45^+CD19^+IgD^-CD27^+$) В-клеток памяти, зрелых наивных В-лимфоцитов ($CD45^+CD19^+CD27^-IgD^+$), плазмобластов ($CD45^+CD19^+CD38^{+++}IgD^-CD27^+$).

Для подсчета процентного содержания клеток цельную кровь лизировали раствором OPTILYSE С (Beckman Coulter, США) и окрашивали моноклональными антителами $CD45^+ -KrO/CD19^+ -A-AF750/CD27^+ -PC7/CD5^+ECD/CD38^+ -APC-A700$ и $IgD -FITC$ (Beckman Coulter, США). Цитофлюорометрию осуществляли на проточном цитофлюориметре Navios™ (Beckman Coulter, США), оценивали не менее 10 тыс. событий.

Определяли общее число лейкоцитов (WBC) по формуле:

$$WBC = a \times 50 \times 10^6 / л,$$

где а – число подсчитанных в камере Горяева лейкоцитов.

Расчет абсолютного количества В-лимфоцитов проводили по формуле: $WBC \times (\%) / 100$.

Статистическая обработка полученных результатов осуществлялась с использованием пакета прикладных программ Statistica 8.0 (StatSoft Inc., 2007). Определяли среднее арифметическое значение \pm стандартное квадратичное отклонение. Достоверность различий между показателями независимых выборок оценивали по непараметрическому критерию Манна–Уитни. Проводили сравнение совокупностей по качественным признакам с помощью критерия Фишера, корреляционный анализ – с использованием коэффициента корреляции Спирмена (r). При интерпретации для оценки силы связи использовали шкалу Чеддока, согласно которой: слабая – от 0,1 до 0,3; умеренная – от 0,3 до 0,5; заметная – от 0,5 до 0,7; высокая – от 0,7 до 0,9; весьма высокая (сильная) – от 0,9 до 1,0. Отличия считали значимыми при $p < 0,05$.

Гуморальный иммунный ответ регистрировали, выявляя антитела класса IgG с помощью тест-системы «SARS-CoV-2RBD-ИФА-Гамалеи» (ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России).

Результаты

Проведена оценка количественного и качественного состава В-лимфоцитов у перенесших новую коронавирусную инфекцию разной степени тяжести. При определении относительного и абсолютного количества В-клеток ($CD45^+CD19^+$) и В2-лимфоцитов ($CD45^+CD19^+CD5^-CD27^-$) у волонтеров из опытных групп через 6-9 месяцев после выздоровления не выявлено достоверного отличия от этих показателей в контроле (табл. 1).

Достоверное увеличение, по сравнению с контрольной группой и с группой болевших бессимптомно обнаружено при анализе относительного и абсолютного числа В1-клеток ($CD45^+CD19^+CD5^+CD27^-$) и относительного количества зрелых наивных В-лимфоцитов ($CD45^+CD19^+CD27^-IgD^+$) у волонтеров, перенесших COVID-19 тяжело или в средней форме. Также у всех переболевших регистрировалось повышенное, по сравнению с контрольной группой, процентное и абсолютное содержание плазмобластов ($CD45^+CD19^+CD38^{+++}IgD^-CD27^+$). Следует отметить, что эти показатели статистически не отличались у волонтеров из опытных групп.

При иммунофенотипировании В-клеток памяти установлено, что относительное и абсолютное количество В-лимфоцитов памяти ($CD45^+CD19^+CD5^-CD27^+$) у всех обследованных их опытных групп значительно превосходит таковые у здоровых лиц. Особенно увеличено относительное число этих клеток у волонтеров, пере-

ТАБЛИЦА 1. СОДЕРЖАНИЕ СУБПОПУЛЯЦИЙ В-ЛИМФОЦИТОВ В КРОВИ ВОЛОНТЕРОВ, ПЕРЕНЕСШИХ COVID-19 РАЗНОЙ СТЕПЕНИ ТЯЖЕСТИ, ЧЕРЕЗ 6-9 МЕСЯЦЕВ ПОСЛЕ ВЫЗДОРОВЛЕНИЯ

TABLE 1. CONTENT OF B LYMPHOCYTE SUBPOPULATIONS IN THE BLOOD OF VOLUNTEERS WHO UNDERWENT COVID-19 OF VARYING SEVERITY, 6-9 MONTHS AFTER RECOVERY

Популяции Populations	Контрольная группа Control group		Переболевшие / Sick					
			бессимптомно asymptomatic (n = 32)		средней степени medium (n = 21)		тяжело severe (n = 12)	
	%	($\times 10^9$)/л ($\times 10^9$)/L	%	($\times 10^9$)/л ($\times 10^9$)/L	%	($\times 10^9$)/л ($\times 10^9$)/L	%	($\times 10^9$)/л ($\times 10^9$)/L
В-лимфоциты B lymphocytes (CD45 ⁺ CD19 ⁺)	9,0±1,7	0,19±0,09	10,50±0,71	0,154±0,160	11,8±2,5	0,22±0,15	10,5±1,9	0,18±0,12
В1-клетки B1 cells (CD45 ⁺ CD19 ⁺ CD5 ⁺ CD27 ⁻)	2,1±0,3	0,040±0,004	2,5±0,7	0,049±0,005	3,63±0,20	0,070±0,005	3,17±0,10	0,054±0,003
В2-клетки B2 cells (CD45 ⁺ CD19 ⁺ CD5 ⁺ CD27 ⁻)	6,6±1,4	0,11±0,04	8,0±1,4	0,113±0,030	7,30±2,96	0,13±0,06	7,7±1,7	0,13±0,01
В-клетки памяти B memory cells (CD45 ⁺ CD19 ⁺ CD5 ⁺ CD27 ⁺)	15,3±1,2	0,32±0,10	25,5±2,8	0,63±0,10	33,9±2,3	0,61±0,10	37,2±5,2	0,64±0,11
В-клетки памяти неперключенные B memory cells unswitched (CD45 ⁺ CD19 ⁺ IgD ⁺ CD27 ⁺)	5,4±1,7	0,010±0,005	10,5±0,7	0,15±0,05	12,0±1,2	0,21±0,01	20,8±2,5	0,370±0,045
В-клетки памяти перключенные B memory cells switched (CD45 ⁺ CD19 ⁺ IgD ⁺ CD27 ⁻)	10,8±1,5	0,02±0,01	14,5±1,1	0,21±0,09	22,5±1,0	0,50±0,07	17,8±1,2	0,30±0,02
Зрелые наивные В-лимфоциты Mature naive B lymphocytes (CD45 ⁺ CD19 ⁺ CD27 ⁻ IgD ⁺)	18,0±1,2	0,38±0,04	16,0±2,0	0,23±0,02	29,4±3,3	0,53±0,08	34,5±1,9	0,6±0,1
Плазмобласты Plasmoblasts (CD45 ⁺ CD19 ⁺ CD38 ⁺⁺⁺ IgD ⁻ CD27 ⁺)	0,1±0,05	0,001±0,002	2,5±0,7	0,040±0,013	2,3±0,4	0,04±0,02	2,5±0,8	0,020±0,004

Примечание. * – достоверное отличие от нормы (p < 0,05), ** – достоверное отличие от показателя в других группах (p < 0,05).

Note. *, significant difference from the norm (p < 0.05); **, significant difference from the indicator in other groups (p < 0.05).

ТАБЛИЦА 2. СОДЕРЖАНИЕ СУБПОПУЛЯЦИЙ В-ЛИМФОЦИТОВ В КРОВИ ВОЛОНТЕРОВ, ПЕРЕНЕСШИХ COVID-19 РАЗНОЙ СТЕПЕНИ ТЯЖЕСТИ ЧЕРЕЗ МЕСЯЦ ПОСЛЕ ВАКЦИНАЦИИ

TABLE 2. CONTENT OF B LYMPHOCYTE SUBPOPULATIONS IN THE BLOOD OF VOLUNTEERS WHO UNDERWENT COVID-19 OF VARYING SEVERITY A MONTH AFTER VACCINATION

Популяции Populations	Спутник V / Sputnik V						КовиВак / KoviVak					
	бессимптомно asymptomatic (n = 22)		средней степени medium (n = 11)		тяжело severe (n = 6)		бессимптомно asymptomatic (n = 10)		средней степени medium (n = 10)		тяжело severe (n = 6)	
	%	($\times 10^9$)/л ($\times 10^9$)/L	%	($\times 10^9$)/л ($\times 10^9$)/L	%	($\times 10^9$)/л ($\times 10^9$)/L	%	($\times 10^9$)/л ($\times 10^9$)/L	%	($\times 10^9$)/л ($\times 10^9$)/L	%	($\times 10^9$)/л ($\times 10^9$)/L
В-лимфоциты B lymphocytes (CD45 ⁺ CD19 ⁺)	8,0±1,2	0,14±0,05	10,4±4,7	0,18±0,08	8,7±2,1	0,13±0,07	9,5±3,5	0,210±0,065	11,4±2,8	0,21±0,12	8,5±0,7	0,1±0,07
В1-клетки B1 cells (CD45 ⁺ CD19 ⁺ CD5 ⁺ CD27 ⁻)	3,0±1,2	0,05±0,03	3,9±2,4	0,07±0,05	2,9±1,3	0,05±0,03	2,5±0,7	0,040±0,003	4,1±1,7	0,08±0,05	2,5±0,7	0,04±0,007
В2-клетки B2 cells (CD45 ⁺ CD19 ⁺ CD5 ⁺ CD27 ⁻)	5,5±1,3	0,10±0,04	6,5±2,9	0,11±0,05	5,8±1,1	0,15±0,1	7,5±3,5	0,160±0,007	7,1±3,5	0,12±0,06	5,0±1,4	0,14±0,04
В-клетки памяти B memory cells (CD45 ⁺ CD19 ⁺ CD5 ⁺ CD27 ⁺)	35,0±2,9	0,62±0,1	32,8±1,9	0,55±0,02	33,9±1,4	0,59±0,06	48,5±3,6	1,06±0,16	28,6±2,4	0,58±0,03	34,5±0,07	0,63±0,04
В-клетки памяти непереключенные B memory cells unswitched (CD45 ⁺ CD19 ⁺ IgD ⁺ CD27 ⁺)	17,3±1,7	0,29±0,01	11,7±1,4	0,19±0,01	12,2±1,5	0,26±0,01	20,5±2,0	0,47±0,03	10,9±1,3	0,25±0,01	15,5±0,7	0,29±0,02
В-клетки памяти переключенные B memory cells switched (CD45 ⁺ CD19 ⁺ IgD ⁻ CD27 ⁺)	17,0±1,5	0,43±0,11	20,6±1,5	0,33±0,14	21,4±1,0	0,30±0,18	28,0±1,4	0,65±0,01	17,0±2,4	0,32±0,15	19,5±0,7	0,31±0,07
Зрелые наивные В-лимфоциты Mature naive B lymphocytes (CD45 ⁺ CD19 ⁺ CD27 ⁻ IgD ⁺)	27,3±2,3	0,54±0,06	30,5±2,2	0,53±0,03	29,2±4,4	0,52±0,02	32,5±1,2	0,68±0,03	31,9±2,7	0,56±0,02	39,5±0,8	0,87±0,01
Плазмобласты Plasmoblasts (CD45 ⁺ CD19 ⁺ CD38 ⁺⁺⁺ IgD ⁻ CD27 ⁻)	3,0±1,4	0,05±0,04	2,3±0,9	0,04±0,02	1,9±0,6	0,030±0,008	1,5±0,7	0,034±0,02	1,9±1,1	0,04±0,02	2,5±0,4	0,030±0,007

Примечание. * – достоверное отличие от нормы (p < 0,05), ** – достоверное отличие от показателя до вакцинации (p < 0,05), *** – достоверное отличие от показателя внутри каждой группы вакцинированных (p < 0,05).

Note. *, significant difference from the norm (p < 0.05); **, significant difference from the indicator before vaccination (p < 0.05); ***, significant difference from the indicator within each group of vaccinated (p < 0.05).

ТАБЛИЦА 3. СОДЕРЖАНИЕ СУБПОПУЛЯЦИЙ В-ЛИМФОЦИТОВ В КРОВИ ВОЛОНТЕРОВ, ПЕРЕНЕСШИХ COVID-19 РАЗНОЙ СТЕПЕНИ ТЯЖЕСТИ ЧЕРЕЗ 4-5 МЕСЯЦЕВ ПОСЛЕ ВАКЦИНАЦИИ

TABLE 3. CONTENT OF B LYMPHOCYTE SUBPOPULATIONS IN THE BLOOD OF VOLUNTEERS WHO UNDERWENT COVID-19 OF VARYING SEVERITY 4-5 MONTHS AFTER VACCINATION

Популяции Populations	Спутник V / Sputnik V						КовиВак / KoviVak					
	бессимптомно asymptomatic (n = 22)		средней степени medium (n = 11)		тяжело severe (n = 6)		бессимптомно asymptomatic (n = 10)		средней степени medium (n = 10)		тяжело severe (n = 6)	
	%	($\times 10^9$)/л ($\times 10^9$)/L	%	($\times 10^9$)/л ($\times 10^9$)/L	%	($\times 10^9$)/л ($\times 10^9$)/L	%	($\times 10^9$)/л ($\times 10^9$)/L	%	($\times 10^9$)/л ($\times 10^9$)/L	%	($\times 10^9$)/л ($\times 10^9$)/L
В-лимфоциты B lymphocytes (CD45 ⁺ CD19 ⁺)	10,2±3,7	0,17±0,08	11,8±4,7	0,23±0,11	8,9±3,0	0,16±0,07	9,5±6,4	0,12±0,05	12,5±5,6	0,23±0,10	16,5±3,5	0,35±0,16
В1-клетки B1 cells (CD45 ⁺ CD19 ⁺ CD5 ⁺ CD27 ⁻)	3,3±1,7	0,05±0,03	3,4±1,8	0,07±0,04	2,8±1,6	0,05±0,04	1,5±0,7	0,030±0,004	4,0±1,8	0,07±0,03	6,5±1,5	0,15±0,01
В2-клетки B2 cells (CD45 ⁺ CD19 ⁺ CD5 ⁺ CD27 ⁺)	7,1±2,7	0,17±0,06	8,6±3,2	0,19±0,08	6,5±2,4	0,12±0,05	8,0±5,7	0,10±0,05	8,6±4,0	0,16±0,07	10,0±0,7	0,28±0,04
В-клетки памяти B memory cells (CD45 ⁺ CD19 ⁺ CD5 ⁺ CD27 ⁺)	32,2±1,3	0,57±0,15	34,5±1,7	0,73±0,04	33,4±1,2	0,61±0,20	49,0±3,3	0,94±0,12	35,0±6,2	0,65±0,13	18,0±2,7	0,38±0,03
В-клетки памяти непереключенные B memory cells unswitched (CD45 ⁺ CD19 ⁺ IgD ⁺ CD27 ⁺)	14,7±2,7	0,23±0,15	14,9±2,9	0,30±0,15	13,7±2,0	0,25±0,03	22,5±2,0	0,40±0,08	16,9±1,4	0,32±0,02	10,0±1,4	0,20±0,03
В-клетки памяти переключенные B memory cells switched (CD45 ⁺ CD19 ⁺ IgD ⁺ CD27 ⁻)	17,9±3,2	0,29±0,16	19,6±3,7	0,39±0,13	20,4±1,2	0,37±0,15	26,5±0,7	0,42±0,11	18,6±2,6	0,33±0,13	7,5±2,0	0,15±0,07
Зрелые наивные В-лимфоциты Mature naive B lymphocytes (CD45 ⁺ CD19 ⁺ CD27 ⁻ IgD ⁺)	29,2±1,3	0,46±0,19	33,8±2,9	0,60±0,06	29,5±5,1	0,54±0,16	28,0±2,1	0,39±0,20	29,3±9,0	0,53±0,15	32,5±1,8	0,72±0,03
Плазмобласты Plasmoblasts (CD45 ⁺ CD19 ⁺ CD38 ⁺⁺⁺ IgD ⁻ CD27 ⁺)	1,4±0,5	0,020±0,001	1,6±0,7	0,03±0,002	2,2±1,7	0,04±0,04	2,5±0,7	0,033±0,001	1,7±0,8	0,030±0,013	1,5±0,7	0,002±0,001

Примечание. * – достоверное отличие от показателя через месяц после вакцинации (p < 0,05), ** – достоверное отличие от показателя внутри каждой группы вакцинированных (p < 0,05).

Note. * , significant difference from the indicator a month after vaccination (p < 0.05); ** , significant difference from the indicator within each group of vaccinated (p < 0.05).

ТАБЛИЦА 4. НАЛИЧИЕ АНТИТЕЛ КЛАССА IgG У ПЕРЕНЕСШИХ COVID-19 РАЗНОЙ СТЕПЕНИ ТЯЖЕСТИ

TABLE 4. PRESENCE OF IgG ANTIBODIES IN PATIENTS WITH COVID-19 OF VARYING SEVERITY

Форма перенесенного заболевания Form of the transferred disease	Волонтеры (%), имеющие IgG-антитела к S-белку SARS-CoV-2 через: Volunteers (%) having IgG antibodies to S protein SARS-CoV-2 via:				
	6-9 месяцев после болезни 6-9 months after the illness	вакцинация «Спутник V» vaccination "Sputnik V" (n = 39)		вакцинация «КовиВак» vaccination "KoviVak" (n = 26)	
		месяц month	4-5 месяцев 4-5 months	месяц month	4-5 месяцев 4-5 months
Тяжелая Severe	91,7* ** (n = 11)	100* (n = 6)	100 (n = 6)	100 (n = 6)	100 (n = 6)
Средняя Medium	76,2 (n = 16)	90,9** (n = 10)	100** (n = 11)	100 (n = 10)	100 (n = 10)
Бессимптомная Asymptomatic	78,1 (n = 25)	81,8 (n = 18)	100** (n = 22)	100 (n = 10)	100 (n = 10)

Примечание. * – достоверное отличие от показателя в эти сроки в других группах ($p < 0,05$), ** – достоверное отличие показателя в разные сроки в рамках одной группы переболевших ($p < 0,05$).

Note. *, significant difference from the indicator in these terms in other groups ($p < 0.05$); **, significant difference in the indicator in different terms within the same group of patients ($p < 0.05$).

болевших тяжело или в средней степени тяжести, в отличие от болевших бессимптомно. У всех перенесших COVID-19 выявлено увеличение, относительно здоровых лиц, процентного содержания и абсолютного количества непереключенных ($CD45^+CD19^+IgD^+CD27^+$) и переключенных ($CD45^+CD19^+IgD^-CD27^+$) В-клеток памяти. Причем у переболевших тяжело зарегистрировано достоверное увеличение, относительно волонтеров из других опытных групп, В-клеток памяти с фенотипом $CD45^+CD19^+IgD^+CD27^+$ (непереключенных), а у болевших в средней форме – с фенотипом $CD45^+CD19^+IgD^-CD27^+$ (переключенных).

Через месяц после последней дозы у волонтеров опытных групп, вакцинированных «Спутник V» и «КовиВак», общее количество В-лимфоцитов, а также число В1- и В2-клеток не изменилось по сравнению с показателями до вакцинации (табл. 2) и не отличалось от таковых у группы здоровых лиц.

У всех переболевших и получивших противокоронавирусные вакцины было зарегистрировано увеличение, по сравнению с контролем, относительного и абсолютного числа В-лимфоцитов памяти, переключенных и непереключенных В-клеток памяти, зрелых наивных В-лимфоцитов и плазмобластов.

Наибольшее число В-клеток памяти было выявлено нами у болевших бессимптомно, особенно после вакцинации «КовиВак». У вакцинированных «Спутник V» волонтеров этой группы увеличение В-клеток памяти было обусловлено повы-

шением числа непереключенных В-лимфоцитов памяти, в то время как у получивших «КовиВак» наблюдалось увеличение относительного и абсолютного числа как переключенных, так и непереключенных В-клеток памяти. У волонтеров всех опытных групп на фоне вакцинации наблюдалось увеличение количества зрелых наивных В-лимфоцитов, но особенно значительно этот показатель повышался у переболевших тяжело и впоследствии вакцинированных «КовиВак».

Через 4-5 месяцев после проведенной вакцинации было зарегистрировано достоверное по сравнению с предыдущими сроками исследования увеличение общего количества В-лимфоцитов, а также В1- и В2-клеток у волонтеров, перенесших COVID-19 в тяжелой форме и вакцинированных «КовиВак» (табл. 3). У этой группы обследованных выявлено достоверное снижение, по сравнению с показателями, полученными через месяц после вакцинации, относительного и абсолютного содержания В-лимфоцитов памяти, переключенных и непереключенных В-клеток памяти и зрелых наивных В-лимфоцитов.

У волонтеров, переболевших в средней форме, после вакцинации «КовиВак» зарегистрировано незначительное, по сравнению с предыдущим исследованием, увеличение В-клеток памяти с фенотипом $CD45^+CD19^+IgD^+CD27^+$ (непереключенных). Остальные показатели достоверно не отличались от полученных через месяц после вакцинации обеими вакцинами.

При изучении формирования и длительности сохранения специфических иммуноглобулинов у обследованных выявлено, что наибольшее количество волонтеров, имеющих антитела к S-белку SARS-CoV-2 сохраняется в группе тяжело переболевших (табл. 4). Через месяц после введения второй дозы «Спутник V» все обследованные из этой группы были серопозитивны, такая же тенденция сохранялась до конца исследования. Достоверное увеличение количества волонтеров с гуморальным иммунитетом к возбудителю новой коронавирусной инфекции было зарегистрировано нами среди переболевших в средней форме уже через месяц после вакцинации «Спутник V», через 4-5 месяцев их количество увеличилось до 100%. В группе переболевших COVID-19 бессимптомно статистически достоверное увеличение числа лиц с IgG достигалось только к концу срока наблюдения. Следует отметить, что все волонтеры, привитые «КовиВак», имели антитела к S-белку SARS-CoV-2 от начала и до конца эксперимента.

Результаты проведенного корреляционного анализа свидетельствуют о наличии положительной корреляции между количеством В-клеток памяти и наличием IgG-антител к S-белку SARS-CoV-2 у всех групп обследованных. Ранговая корреляция Спирмена (r) составила 0,566 и выявила заметную прямую связь для этих признаков ($p < 0,05$).

Обсуждение

Основа защитного иммунитета после инфекций включает выработку антиген-специфического ответа антител и генерацию адаптивного иммунного ответа памяти, опосредуемого В- и Т-клетками [16]. Многочисленные исследования, посвященные развитию и оценке напряженности гуморального иммунитета и формирования В-клеток памяти после заражения COVID-19, проводятся во всем мире. Однако оценка так называемого «гибридного» (постинфекционного и поствакцинального) иммунитета требует дальнейшего изучения. Особенно интересны и важны исследования по продолжительности гуморального поствакцинального иммунного ответа у переболевших новую коронавирусную инфекцию разной степени тяжести, так как от антигенной нагрузки, наряду с индивидуальными особенностями, зависит интенсивность и продолжительность гуморального иммунного ответа к возбудителю новой коронавирусной инфекции [16]. Выявлена статистически значимая корреляция между тяжестью COVID-19 и концентрациями IgG-антител (как в целом, так и по подклассам). Показано, что уровни антител выше у пациентов с тяжелой клинической картиной [15]. Согласно другим данным, наличие анти-N и анти-RBD/S1

иммуноглобулинов не зависит от возраста, пола, групп крови, клинической симптоматики и тяжести перенесенного заболевания [17]. В то же время опубликованы результаты исследований, согласно которым у выздоравливающих пациентов с бессимптомным COVID-19 уровни IgG-антител к SARS-CoV-2 были такими же, как у пациентов с симптомами, и их снижение с течением времени было одинаковым в обеих группах [6].

Результаты наших исследований показали, что у волонтеров, перенесших COVID-19, даже через 6-9 месяцев после выздоровления статистически достоверно выше, по сравнению с контролем, количество В-клеток памяти ($CD45^+CD19^+CD5^-CD27^+$), переключенных ($CD45^+CD19^+IgD^-CD27^+$) и непереключенных ($CD45^+CD19^+IgD^+CD27^+$) В-лимфоцитов памяти, зрелых наивных лимфоцитов ($CD45^+CD19^+CD27^-IgD^+$), плазмобластов ($CD45^+CD19^+CD38^{+++}IgD^-CD27^+$). Особенно увеличено число этих клеток, за исключением плазмобластов, у волонтеров, переболевших тяжело или в средней степени. Также у волонтеров этих групп выше относительное и абсолютное количество В1-клеток ($CD45^+CD19^+CD5^+CD27^-$).

Через месяц после вакцинации статистически достоверное увеличение В-клеток памяти зарегистрировано нами у переболевших бессимптомно, особенно после вакцинации «КовиВак», обусловленное в этой группе увеличением относительного и абсолютного числа как переключенных, так и непереключенных В-клеток памяти. У вакцинированных «Спутник V» волонтеров, переболевших бессимптомно, увеличение В-клеток памяти было связано с повышением числа непереключенных В-лимфоцитов памяти. Также на фоне вакцинации у всех обследованных наблюдалось увеличение зрелых наивных В-лимфоцитов, но особенно у переболевших тяжело и вакцинированных «КовиВак».

В конце наблюдения у волонтеров, перенесших COVID-19 в тяжелой форме и вакцинированных «КовиВак», общее количество В-лимфоцитов, а также В1- и В2-клеток достоверно увеличилось, по сравнению с предыдущими сроками исследования, а относительное и абсолютное число В-лимфоцитов памяти, переключенных и непереключенных В-клеток памяти и зрелых наивных В-лимфоцитов – достоверно снизилось. Следует отметить, что снижение популяций В-лимфоцитов памяти не приводило к уменьшению числа волонтеров, имеющих антитела к возбудителю COVID-19. Увеличение В-клеток памяти с фенотипом $CD45^+CD19^+IgD^+CD27^+$ (непереключенных) у переболевших в средней форме и вакцинированных «КовиВак» было незначительным, хотя и достоверным ($p < 0,05$).

Также в группе тяжелопереболевших зарегистрирован наибольший процент волонтеров, имеющих антитела к S-белку SARS-CoV-2 во все сроки исследования. Среди болевших в средней форме достоверное увеличение количества лиц с гуморальным иммунитетом к возбудителю новой коронавирусной инфекции наблюдалось через месяц после вакцинации «Спутник V», в группе перенесших COVID-19 бессимптомно – к концу срока наблюдения. Следует отметить, что все обследованные, привитые «КовиВак», имели антитела к S-белку SARS-CoV-2 от начала и до конца эксперимента.

Заключение

Таким образом, у перенесших COVID-19 разной степени тяжести, но особенно у болевших тяжело, формируется достаточно напряженный гуморальный иммунный ответ, сохраняющийся до девяти месяцев. Полученные нами результаты согласуются с данными других авторов [4, 12, 16]. Введение вакцин, особенно «КовиВак», приво-

дит к увеличению числа волонтеров, имеющих специфические антитела к S-белку возбудителя новой коронавирусной инфекции. Вакцинация, в наибольшей степени «КовиВак», способствует повышению относительного и абсолютного содержания популяций В-лимфоцитов памяти у болевших бессимптомно. Менее выраженные изменения в содержании популяций В-лимфоцитов после вакцинации у волонтеров, перенесших COVID-19 тяжело и в средней форме, возможно, связаны с более высоким уровнем этих клеток у переболевших до введения вакцин. В отличие от других авторов [6], нами обнаружена положительная корреляция между количеством В-клеток памяти и наличием IgG-антител к S-белку SARS-CoV-2 у всех групп обследованных.

Полученные в результате проведенного исследования данные могут быть полезны для понимания механизмов формирования поствакцинального гуморального иммунного ответа у переболевших COVID-19, а также для определения сроков вакцинации у этих лиц, с учетом тяжести перенесенной инфекции.

Список литературы / References

1. Абакушина Е.В. Иммунологические аспекты коронавирусной болезни, вызванной SARS-CoV-2 // Гены и Клетки, 2020. Т. 15, № 3. С. 14-21. [Abakushina E.V. Immunological aspects of coronavirus disease caused by SARS-CoV-2. *Geny i Kletki = Genes and Cells*, 2020, Vol. 15, no. 3, pp. 14-21. (In Russ.)]
2. Биличенко Т.Н. Факторы риска, иммунологические механизмы и биологические маркеры тяжелой течения COVID-19 (обзор исследований) // Русский медицинский журнал, 2021. № 5. С. 237-244. [Belichenko T.N. Risk factors, immunological mechanisms and biological markers of severe COVID-19 (research review). *Russkiy meditsinskiy zhurnal = Russian Medical Journal*, 2021, no. 5, pp. 237-244. (In Russ.)]
3. Лушова А.А., Жеремян Э.А., Астахова Е.А., Спиридонова А.Б., Бязрова М.Г., Филатов А.В. Субпопуляции В-лимфоцитов: функции и молекулярные маркеры // Иммунология, 2019. Т. 40, № 6. С. 63-76. [Lushova A.A., Eremyan E.A., Astakhova E.A., Spiridonova A.B., Byazrova M.G., Filatov A.V. B-lymphocyte subpopulations: functions and molecular markers. *Immunologiya = Immunologiya*, 2019, Vol. 40, no. 6, pp. 63-76. (In Russ.)]
4. Платонова Т.А., Голубкова А.А., Карбовнича Е.А., Смирнова С.С. Особенности формирования гуморального иммунитета у лиц с различными клиническими проявлениями COVID-19 // Эпидемиология и вакцинопрофилактика, 2021. Т. 20, № 1. С. 20-25. [Platonova T.A., Golubkova A.A., Karbovnichaya E.A., Smirnova S.S. Features of the formation of humoral immunity in individuals with various clinical manifestations of COVID-19. *Epidemiologiya i vaktsinoprofilaktika = Epidemiology and Vaccinal Prevention*, 2021, Vol. 20, no. 1, pp. 20-25. (In Russ.)]
5. Супоницкая Е.В., Алексанкин А.П., Александрова Е.Н., Авдеева А.С., Панафилина Т.А., Верижников Ж.Г., Насонов Е.Л. Определение субпопуляций В-лимфоцитов периферической крови методом проточной цитофлуорометрии у здоровых лиц и больных ревматическими заболеваниями // Клиническая лабораторная диагностика, 2015. № 6. С. 30-33. [Suponitskaya E.V., Aleksankin A.P., Alexandrova E.N., Avdeeva A.S., Panafidina T.A., Verizhnikova Zh.G., Nasonov E.L. Determination of peripheral blood B-lymphocyte subpopulations by flow cytometry in healthy individuals and patients with rheumatic diseases. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika = Russian Clinical Laboratory Diagnostics*, 2015, no. 6, pp. 30-33. (In Russ.)]
6. Achiron A., Gurevich M., Falb R., Dreyer-Alster S., Sonis P., Mandel M. SARS-CoV-2 antibody dynamics and B-cell memory response over time in COVID-19 convalescent subjects. *Clin. Microbiol. Infect.*, 2021, Vol. 27, no. 9, pp 1349.e1-1349. e6.
7. Ahluwalia P., Vaibhav K., Ahluwalia M., Mondal A.K., Sahajpal N., Rojiani A.M., Kolhe R. Infection and immune memory: variables in robust protection by Vaccines Against SARS-CoV-2. *Front. Immunol.*, 2021, Vol. 12, 660019. doi: 10.3389/fimmu.2021.660019.
8. Anand S.P., Prévost J., Nayrac M., Beaudoin-Bussièrès G., Benlarbi M., Gasser R., Brassard N., Laumaëa A., Gong S.Y., Bourassa C., Brunet-Ratnasingham E., Medjahed H., Gendron-Lepage G., Goyette G., Gokool L., Morrisseau C., Bégin P., Martel-Laferrière V., Tremblay C., Richard J., Bazin R., Duerr R., Kaufmann D.E., Finzi A.

Longitudinal analysis of humoral immunity against SARS-CoV-2 Spike in convalescent individuals up to 8 months post-symptom onset. *Cell Rep. Med.*, 2021, Vol. 5, 100290. doi: 10.1016/j.xcrm.2021.100290.

9. Byazrova M.G., Kulemzin S.V., Astakhova E.A., Belovezhets T.N., Efimov G.A., Chikaev A.N., Kolotygin I.O., Gorchakov A.A., Taranin A.V., Filatov A.V. Memory B cells induced by Sputnik V vaccination produce SARS-CoV-2 neutralizing antibodies upon *ex vivo* restimulation. *Front. Immunol.*, 2022, Vol. 13, 840707. doi: 10.3389/fimmu.2022.840707.

10. Çölkesen F., Kurt E.K., Vatansev H., Korkmaz C., Çölkesen F., Yücel F., Yıldız E., Evcen R., Aykan F.S., Kılınç M., Aytekin G., Feyzioglu B., Doğan M., Arslan Ş., Teke T., Keleş S., Reisli İ. Memory B cells and serum immunoglobulins are associated with disease severity and mortality in patients with COVID-19. *Postgrad. Med. J.*, 2022, *postgradmedj-2021-140540*. doi: 10.1136/postgradmedj-2021-140540.

11. Duchamp M., Sterlin D., Diabate A., Uring-Lambert B., Guérin-El Khourouj V., Le Mauff B., Monnier D., Malcus C., Labalette M., Picard C. B-cell subpopulations in children: national reference values. *Immun. Inflamm. Dis.*, 2014, Vol. 2, no. 3, pp 131-140.

12. Gerhards C., Thiaucourt M., Kittel M., Becker C., Ast V., Hetjens M., Neumaier M., Haselmann V. Longitudinal assessment of anti-SARS-CoV-2 antibody dynamics and clinical features following convalescence from a COVID-19 infection. *J. Infect. Dis.*, 2021, Vol. 107, pp. 221-227.

13. He B., Liu S., Wang Y., Xu M., Cai W., Liu J., Bai W., Ye S., Ma Y., Hu H., Meng H., Sun T., Li Y., Luo H., Shi M., Du X., Zhao W., Chen S., Yang J., Zhu H., Jie Y., Yang Y., Guo D., Wang Q., Liu Y., Yan H., Wang M., Chen Y.-Q. Rapid isolation and immune profiling of SARS-CoV-2 specific memory B cell in convalescent COVID-19 patients via LIBRA. *Signal Transduct. Target. Ther.*, 2021, Vol. 6, no. 1, 195. doi: 10.1038/s41392-021-00610-7.

14. Isho B., Abe K.T., Zuo M., Jamal A.J., Rathod B., Wang J.H., Li Z., Chao G., Rojas O.L., Bang Y.M., Pu A., Christie-Holmes N., Gervais C., Ceccarelli D., Samavarchi-Tehrani P., Guvenc F., Budyłowski P., Li A., Paterson A., Yun Yue F., Marin L.M., Caldwell L., Wrana J.L., Colwill K., Sicheri F., Mubareka S., Gray-Owen S.D., Drews S.J., Siqueira W.L., Barrios-Rodiles M., Ostrowski M., Rini J.M., Durocher Y., McGeer A.J., Gommerman J.L., Gingras A.-C. Persistence of serum and saliva antibody responses to SARS-CoV-2 spike antigens in COVID-19 patients. *Sci. Immunol.*, 2020, Vol. 5, no. 52, eabe5511. doi: 10.1126/sciimmunol.abe5511.

15. Korobova Z.R., Zueva E.V., Arsentieva N.A., Batsunov O.K., Liubimova N.E., Khamitova I.V., Kuznetsova R.N., Rubinstein A.A., Savin T.V., Stanevich O.V., Kulikov A.N., Pevtsov D.E., Totolian A.A. Changes in anti-SARS-CoV-2 IgG subclasses over time and in association with disease severity. *Viruses*, 2022, Vol. 14, 941. doi: 10.3390/v14050941.

16. Siggins M.K., Thwaites R.S., Openshaw P.J. Durability of immunity to SARS-CoV-2 and other respiratory viruses. *Trends Microbiol.*, 2021, Vol. 29, no. 7, pp. 648-662.

17. Zhang F., Gan R., Zhen Z., Hu X., Li X., Zhou F., Liu Y., Chen C., Xie S., Zhang B., Wu X., Huang Z. Adaptive immune responses to SARS-CoV-2 infection in severe versus mild individuals. *Signal Transduct. Target. Ther.*, 2020, Vol. 5, no. 1, 156. doi: 10.1038/s41392-020-00263-y.

Авторы:

Иванова И.А. — к.б.н., ведущий научный сотрудник, врио заведующей лабораторией иммунологии ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора, г. Ростов-на-Дону, Россия

Филиппенко А.В. — младший научный сотрудник лаборатории иммунологии ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора, г. Ростов-на-Дону, Россия

Труфанова А.А. — младший научный сотрудник лаборатории иммунологии ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора, г. Ростов-на-Дону, Россия

Authors:

Ivanova I.A., PhD (Biology), Leading Research Associate, Acting Head, Laboratory of Immunology, Rostov-on-Don Anti-Plague Institute, Rostov-on-Don, Russian Federation

Filippenko A.V., Junior Research Associate, Laboratory of Immunology, Rostov-on-Don Anti-Plague Institute, Rostov-on-Don, Russian Federation

Trufanova A.A., Junior Research Associate, Laboratory of Immunology, Rostov-on-Don Anti-Plague Institute, Rostov-on-Don, Russian Federation

Омельченко Н.Д. — к.м.н., старший научный сотрудник лаборатории иммунологии ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора, г. Ростов-на-Дону, Россия

Чемисова О.С. — и.о. заведующей лабораторией «Коллекция патогенных микроорганизмов» ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора, г. Ростов-на-Дону, Россия

Носков А.К. — директор ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора, г. Ростов-на-Дону, Россия

Omelchenko N.D., PhD (Medicine), Senior Research Associate, Laboratory of Immunology, Rostov-on-Don Anti-Plague Institute, Rostov-on-Don, Russian Federation

Chemisova O.S., Acting Head, Laboratory of the Pathogenic Microorganisms Collection, Rostov-on-Don Anti-Plague Institute, Rostov-on-Don, Russian Federation

Noskov A.K., Director, Rostov-on-Don Anti-Plague Institute, Rostov-on-Don, Russian Federation

Поступила 29.09.2022

Отправлена на доработку 02.10.2022

Принята к печати 08.11.2022

Дата онлайн-публикации 14.11.2022

Received 29.09.2022

Revision received 02.10.2022

Accepted 08.11.2022

Date of publication online 14.11.2022

ДОСТИЖЕНИЕ МАКСИМАЛЬНОГО КОЛЛЕКТИВНОГО ИММУНИТЕТА SARS-CoV-2 СРЕДИ НАСЕЛЕНИЯ ТАДЖИКИСТАНА К МАРТУ 2022 ГОДА

**Попова А.Ю.¹, Смирнов В.С.², Егорова С.А.², Абдуллозода Д.А.³,
Рузиев М.М.⁴, Миличкина А.М.², Иванов В.А.², Вохидов С.Д.⁴,
Рамзи Э.С.², Муллоджанова М.М.⁴, Дрозд И.В.², Холова Б.Т.⁴,
Краснов А.А.², Джафаров Н.Д.³, Жимбаева О.Б.², Губанова А.В.²,
Разумовская А.П.², Дробышевская В.Г.², Тотолян Арег А.²**

¹ Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Москва, Россия

² ФБУН «Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера», Санкт-Петербург, Россия

³ Министерство здравоохранения и социальной защиты населения Таджикистана, г. Душанбе, Республика Таджикистан

⁴ ГУ «Таджикский научно-исследовательский институт профилактической медицины» Министерства здравоохранения и социальной защиты населения Республики Таджикистан, г. Душанбе, Республика Таджикистан

Резюме. Несмотря на все усилия мирового сообщества, пандемия COVID-19 остается одним из главных эпидемиологических вызовов современности. Даже при широком распространении инфекция может иметь определенные локальные особенности, обусловленные социальными, географическими и климатическими факторами. Задача – изучить коллективный иммунитет к SARS-CoV-2 у населения Республики Таджикистан.

Проведено поперечное рандомизированное исследование коллективного иммунитета по программе, разработанной Роспотребнадзором и Санкт-Петербургским институтом Пастера с учетом рекомендаций ВОЗ. Проведение исследования одобрили комитеты по этике соответствующих организаций: Министерства здравоохранения и социальной защиты населения Республики Таджикистан; и Санкт-Петербургский институт Пастера (Россия). По результатам анкетирования было отобрано 4022 человека, что составляет 0,15% (95% ДИ: 0,14-0,15) от общей популяции, рандомизированной

Адрес для переписки:

Смирнов Вячеслав Сергеевич
ФБУН «Научно-исследовательский институт
эпидемиологии и микробиологии имени Пастера»
197101, Россия, Санкт-Петербург, ул. Мира, 14.
Тел.: 8 (911) 948-59-22.
E-mail: vssmi@mail.ru

Address for correspondence:

Vyacheslav S. Smirnov
Saint Petersburg Pasteur Institute
14 Mira St
St. Petersburg
197101 Russian Federation
Phone: +7 (911) 948-59-22.
E-mail: vssmi@mail.ru

Образец цитирования:

А.Ю. Попова, В.С. Смирнов, С.А. Егорова, Д.А. Абдуллозода, М.М. Рузиев, А.М. Миличкина, В.А. Иванов, С.Д. Вохидов, Э.С. Рамзи, М.М. Муллоджанова, И.В. Дрозд, Б.Т. Холова, А.А. Краснов, Н.Д. Джафаров, О.Б. Жимбаева, А.В. Губанова, А.П. Разумовская, В.Г. Дробышевская, Арег А. Тотолян «Достижение максимального коллективного иммунитета SARS-CoV-2 среди населения Таджикистана к марту 2022 года» // Медицинская иммунология, 2023. Т. 25, № 1. С. 193-214. doi: 10.15789/1563-0625-AOM-2630

© Попова А.Ю. и соавт., 2023

Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

A.Yu. Popova, V.S. Smirnov, S.A. Egorova, J.A. Abdullozoda, M.M. Ruziev, A.M. Milichkina, V.A. Ivanov, S.D. Vokhidov, E.S. Ramsay, M.M. Mullodzhanova, I.V. Drozd, B.T. Kholova, A.A. Krasnov, N.D. Jafarov, O.B. Zhimbayeva, A.V. Gubanova, A.P. Razumovskaya, V.G. Drobyshevskaya, Areg A. Totolian "Achievement of maximal SARS-CoV-2 collective immunity among the Tajik population by march 2022", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2023, Vol. 25, no. 1, pp. 193-214. doi: 10.15789/1563-0625-AOM-2630

© Popova A.Yu. et al., 2023

The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License

DOI: 10.15789/1563-0625-AOM-2630

по возрасту и региону. В последующем лабораторном анализе приняли участие 3682 человека. Распределение и количественное содержание антител (АТ) к вирусному нуклеокапсиду (N Ag) и рецепторсвязывающему домену (RBD Ag) определяли методом ИФА. При опросе 69,7% (95% ДИ: 68,2-71,2) когорты добровольцев указали на вакцинацию против SARS-CoV-2 в анамнезе. Наиболее часто использовались векторные вакцины (50,6%; 95% ДИ: 48,7-52,5), на втором месте – цельновирионные инактивированные препараты (23,0%; 95% ДИ: 21,4-26,6) и мРНК-вакцины – на третьем месте (21,0%; 95% ДИ: 19,4-22,6).

В когорте (n = 3682) было 27,5% мужчин и 72,5% женщин. Общая серопревалентность составила 98,5% (95% ДИ: 97,7-99,2) у мужчин и 99,4% (95% ДИ: 99,0-99,6) у женщин (различия статистически незначимы). Общая серопревалентность в когорте составила 99,2% (95% ДИ: 98,8-99,4) и колебалась от 97,2% до 100% в некоторых подгруппах. Бессимптомная серопозитивность во всей когорте составила 98,4% (95% ДИ: 97,6-99,1). В результате программы обязательной вакцинации, внедренной в Таджикистане в рамках Проекта экстренной помощи в связи с COVID-19, уровень коллективного иммунитета среди вакцинированных лиц достиг 99,5% (95% ДИ: 99,1-99,7), что аналогично уровню, достигнутому в когорте в целом.

Эпидемическая ситуация, сложившаяся в Таджикистане к середине марта 2022 г., характеризовалась практически абсолютным уровнем коллективного иммунитета, о чем свидетельствует отсутствие выявленных манифестных случаев заболевания COVID-19 с конца февраля (2022).

Ключевые слова: SARS-CoV-2, COVID-19, Республика Таджикистан, население, коллективный иммунитет, бессимптомное течение, вакцинация

ACHIEVEMENT OF MAXIMAL SARS-CoV-2 COLLECTIVE IMMUNITY AMONG THE TAJIK POPULATION BY MARCH 2022

Popova A.Yu.^a, Smirnov V.S.^b, Egorova S.A.^b, Abdullozoda J.A.^c,
Ruziev M.M.^d, Milichkina A.M.^b, Ivanov V.A.^b, Vokhidov S.D.^d,
Ramsay E.S.^b, Mullodzhanova M.M.^d, Drozd I.V.^b, Kholova B.T.^d,
Krasnov A.A.^b, Jafarov N.D.^c, Zhimbayeva O.B.^b, Gubanova A.V.^b,
Razumovskaya A.P.^b, Drobyshevskaya V.G.^b, Totolian Areg A.^b

^a Federal Service for Supervision of Consumer Rights Protection and Human Welfare, Moscow, Russian Federation

^b Saint Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation

^c Tajik Ministry of Health and Social Protection, Dushanbe, Republic of Tajikistan

^d Tajik Research Institute of Preventive Medicine, Dushanbe, Republic of Tajikistan

Abstract. Despite all efforts of the world community, the COVID-19 pandemic remains one of the main epidemiological challenges of our time. Even with its widespread distribution, the infection may have certain local features due to social, geographic, and climatic factors. Objective: to study collective immunity to SARS-CoV-2 in the population of the Republic of Tajikistan.

A cross-sectional, randomized study of herd immunity was carried out according to a program developed by Rospotrebnadzor and the St. Petersburg Pasteur Institute, taking into account WHO recommendations. The ethics committees of the corresponding entities approved the study: Tajik Ministry of Health and Social Protection; and the St. Petersburg Pasteur Institute (Russia). Based on questionnaire results, 4,022 people were selected, representing 0.15% (95% CI: 0.14-0.15) of the total population randomized by age and region. In subsequent laboratory analysis, 3682 people took part. The distribution and quantitative content of antibodies (Abs) to viral nucleocapsid (N Ag) and receptor binding domain (RBD Ag) were determined by ELISA. When questioned, a history of SARS-CoV-2 vaccination was indicated by 69.7% (95% CI: 68.2-71.2) of the volunteer cohort. Vector vaccines were most frequently used (50.6%; 95% CI: 48.7-52.5), with whole-virion inactivated preparations in second place (23.0%; 95% CI: 21.4-26.6) and mRNA vaccines in third place (21.0%; 95% CI: 19.4-22.6).

The cohort (n = 3682) featured 27.5% men and 72.5% women. The overall seroprevalence was 98.5% (95% CI: 97.7-99.2) in men and 99.4% (95% CI: 99.0-99.6) in women (differences statistically insignificant). Overall seroprevalence in the cohort was 99.2% (95% CI: 98.8-99.4) and ranged from 97.2 to 100% in certain subgroups. Asymptomatic seropositivity in the whole cohort was 98.4% (95% CI: 97.6-99.1). As a result of a mandatory vaccination program introduced in Tajikistan under a COVID-19 Emergency Project, the level of herd immunity among vaccinated individuals reached 99.5% (95% CI: 99.1-99.7), which is similar to the level reached in the cohort as a whole.

The epidemic situation that developed in Tajikistan by mid-March 2022 was characterized by an almost absolute level of herd immunity, as evidenced by an absence of detected overt COVID-19 cases since the end of February (2022).

Keywords: SARS-CoV-2, COVID-19, Republic of Tajikistan, population, herd immunity, asymptomatic course, vaccination

Introduction

Since the unwelcome arrival of the global COVID-19 pandemic, many scientific papers have been published describing its nuances and progression. Many countries have featured similar dynamics and outcomes, but there have been exceptions. One of them, The Republic of Tajikistan, has featured unique characteristics worth noting. This text focuses on the uniquely high level of collective immunity reached there, including analysis of antibody dynamics in its subpopulations.

As of March 18, 2022, it has caused 467,384,850 infections [18], representing 58,654 per 1 million global population. Among them, 2,697,741 people have died from COVID-19, or 0.58% of all infected individuals. One of the states that managed to reduce COVID-19 incidence in the ex-Soviet region was the Republic of Tajikistan (RT). According to official data, the last case in the RT was registered on February 21, 2022, although COVID-19 cases were detected in all neighboring states during this period of time: 238 in Uzbekistan (8th week of 2022); 24 in Kyrgyzstan; and 1068 in Kazakhstan [12]. Understandably, such disparate outcomes raise interesting questions.

The RT is a Central Asian country located between 36°40' -41°05' North latitude and 67°31' -75°14' East longitude. The Republic borders: Uzbekistan from the west; Kyrgyzstan from the north; China from the east; and Afghanistan from the south. About 93% of the Republic's territory is occupied by the highlands of the Pamir-Alay system and the gravelly deserts of the eastern Pamirs. The RT has no access to the sea, resulting in a sharply continental climate with high air dryness [16]. This may be a factor that increases the risk of environmental SARS-CoV-2 spread [25] since it is believed that certain winter conditions (low air humidity, temperature) likely promote the active circulation of respiratory viruses in the autumn-winter period [15]. However, this factor is likely to be insignificant in the RT since the majority of the population lives in mountain valleys with a high annual number of frost-free days (210-250). There

is little precipitation (mostly from November to March), while average temperatures in the valleys are from -2 to +2 °C in the winter and from +19 to +27 °C in the summer [4]. The climatic conditions in the RT in relation to the epidemic process can generally be characterized as neutral.

The RT features high population growth [32, 35]. As of the end of 2021, the population was 9,857,502 people, with more than 73% being rural residents. Only 27% of the population lives in cities. The overall population density was 69.2 km⁻². In large settlements, population densities range from 273 to 982 km⁻². The largest cities are Dushanbe (pop. 880,800), Khujand (pop. 183,356), Kulob (pop. 95,200), Bokhtar (pop. 75,359), and Istaravshan (pop. 63,500). Other cities have populations below 50,000. When describing the population, it is worth noting that, more than 1 million Tajik citizens have migrated outside the country, mainly to Russia [35].

All these features certainly influence the epidemiological situation in the country. The generally low density of the predominantly agricultural population, as well as significant labor migration (egress), have likely attenuated COVID-19 spread. However, it seems the main factor that positively influenced the pandemic, nevertheless, should be recognized as the implementation by Tajik authorities of the Emergency COVID-19 Project, consistently implemented with the active support of the World Bank [7].

According to international databases [12, 18], 17784 or 1804 COVID-19 cases per million population were registered in the RT during the entire pandemic period. The incidence dynamics included three waves of different intensity, followed by pauses wherein there were no new cases or they could not be detected (Figure 1).

Starting on 04/05/2020, the first outbreak continued until the first ten days of January 2021. The maximum number of patients was identified on week 21, 2021 (209 cases). The second peak occurred from June to September (2021) and was significantly smaller than the first. Its maximum level was noted

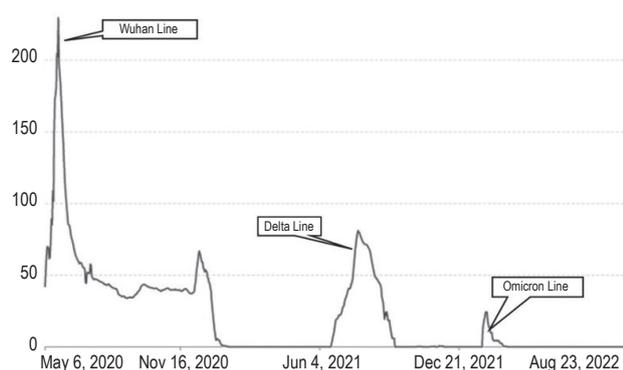


Figure 1. Dynamics of COVID-19 incidence in the Tajik population for the entire observation period (as of 21/08/2022) [12, 18]

Note. Y-axis: number of cases, calculated as an average over 7 days of observation. X-axis: date of registration (beginning 04/05/2020, last 23/08/2022).

on the 26th week of 2021, amounting to 79 registered patients. All dates in this text use the format DD/MM/YY (day, month, and year). The third and final peak (the smallest in terms of case numbers) was detected from 22/01/22-16/02/2022, with a maximum of only 24 cases (29/01/2022). Since February 21, 2022, no new cases of overt COVID-19 have been recorded.

To effectively combat COVID-19, Tajik authorities introduced mandatory COVID-19 vaccination among citizens over 18 years of age (starting on June 27, 2021). Initially, the AstraZeneca vaccine from India and CoronaVac from Cinovac (China) were used [27]. According to the official Tajik Ministry of Health data (<https://stat.tj/storage//1.01.2022.pdf>), 5,596,907 people (58.9%) were eligible for vaccination. Of the eligible, 86.0% completed vaccination. Vaccines created on all four platforms were used in the RT (Table 1).

Here, we briefly summarize the features of these vaccine design groups. The vector vaccines AZD1222 (based on ChAdOx1, Oxford-AstraZeneca) and Gam-COVID-Vac (Gamaleya Research Institute) feature S protein genes inserted into an adenoviral vector. Both vaccines induce the synthesis of antibodies (Abs) to the complete S protein and induce strong immune protection against many or all SARS-CoV-2 variants [30]. Messenger RNA vaccines, including mRNA-1273 (Moderna) and BNT162b2 (Pfizer-BioNTech), contain messenger RNA of the S protein antigen, which induces strong humoral immune responses against reference and mutant viral variants [11]. The whole-virion vaccines (WVV) CoronaVac, and CoviVac have 100% homology with S protein. It is believed that the immunogenicity of vaccines is about 86% overall, and the formation of a full-fledged immune response against SARS-CoV-2 may require the introduction of booster doses [13]. A peptide vaccine, EpiVacCorona, was produced by the ‘Vector’ State Scientific Center for Virology and Biotechnology (Russia) [29]. It was used only in isolated cases; data for it were omitted due to non-representative sampling.

The aforementioned programs and preparations, alongside immunity from natural infections, clearly formed favorable conditions leading to cessation of overt COVID-19 incidence in the period from February to August 2022. In addition, one cannot exclude the additional influence of climatic, demographic, and immunological factors. Jointly, they may have supported the achievement of a high level of herd immunity. The purpose of this cross-sectional, randomized study was to analyze the structure and features of the herd immunity to COVID-19 formed in the Tajik population.

TABLE 1. STRUCTURE OF COVID-19 VACCINATION IN THE TAJIK POPULATION (AS OF 18/03/2022)

Vaccine	Individuals vaccinated		
	one dose	two doses	third dose (booster)
mRNA-1273 (Moderna)	1,263,915	1,114,216	299,333
BNT162b2 (Pfizer)	318,396	304,839	73,064
AZD1222 (Oxford/AstraZeneca)	1,125,058	1,008,461	184,448
Gam-COVID-Vac (Sputnik V)	48,654	47,596	0
CoronaVac (Sinovac)	2,387,804	2,335,468	345,657
overall	5,143,827	4,810,580	902,502
share of overall population	52.0%	48.7%	9.1%
share of eligible group*	91.9%	86.0%	16.1%

Note. *, persons who had no contraindications to vaccination.

Materials and methods

Methodology for the formation of the volunteer cohort

The study was organized and conducted as part of scientific cooperation between countries of Eastern Europe, Transcaucasia and Central Asia to assess population immunity to novel coronavirus infection in accordance with: Rospotrebnadzor order (No. 512, dated 09/09/2021) on "Implementation Procedure for Russian Government Decree" (No. 1658-r, dated 18/06/2021); and order of the Tajik Ministry of Health and Social Protection (No. 164, dated 4/03/2022). Organization and research were carried out by the Saint Petersburg Pasteur Institute and the Tajik Research Institute of Preventive Medicine (Tajik Ministry of Health and Social Protection).

A cross-sectional, randomized cohort study of herd immunity was conducted from March 14 to 18, 2022 according to a program developed by the Federal Service for Supervision of Consumer Rights Protection and Human Welfare with the participation of the Saint Petersburg Pasteur Institute, taking into account WHO recommendations [20, 34]. The scheme and organization of the study have been described earlier [19, 20].

Three days before the start of the study, an extensive explanatory campaign was conducted (on TV, mass media, social networks) about the start of free testing for the presence of Abs to SARS-CoV-2, with an internet link for completing the survey. Volunteers wishing to take part in the study applied via an internet link, filled out a questionnaire (Table 1S, see Supplementary data), and submitted it to the cloud service. Received questionnaires were subjected to algorithmic analysis to determine satisfaction of inclusion criteria.

According to questionnaires received, a total of 4,022 people expressed their desire to participate. If the candidate met the criteria, he/she received a letter to their indicated e-mail address with a unique ID number and an invitation to choose (via the internet) a convenient point and time for blood collection. Grounds for non-inclusion in the study were: the refusal of subsequent laboratory testing; or the presence of manifest COVID-19 at the time of questionnaire completion. In the cloud resource, the number of participants was registered, with simultaneous logging of distribution by age and place of residence. When maximum levels were reached, registration of incoming questionnaires was terminated. In this case, the individual received a rejection letter. This approach made it possible to effectively form a volunteer cohort randomized by age and regional characteristics. In

the end, 340 people declined to participate. Thus, the final volunteer cohort size was 3,682 people.

Each volunteer, or their legal representative (in the case of child participation), was acquainted with the goals and conditions of the upcoming study and signed an informed consent. The study was organized in accordance with the provisions of the Declaration of Helsinki and approved by the ethics committee of the Tajik Ministry of Health and Social Protection (protocol No. N2, dated 21/02/2022); and the ethics committee of Saint Petersburg Pasteur Institute (protocol No. 64, dated 26/05/2020).

Characteristics of the volunteer cohort

Studies of SARS-CoV-2 seroprevalence in the Tajik population were carried out in ten areas, including three cities (Dushanbe, Khujand, Bokhtar) and seven districts (Vahdat, Hisor, Istaravshan, Isfara, Kulob, Panjakent, Tursunzade). According to climatic, geographic, and demographic principles, areas contributing to the volunteer cohort can be conditionally divided into 4 regions: (1) in the northwest region is the Panjakent district in the Sughd region, located in the Zeravshan river valley. The population of the city and adjacent settlements amounted to 304,200, of which 14% were urban and 86% rural. (2) The Dushanbe agglomeration, located in central Tajikistan in the Hisor valley, combines the capital Dushanbe city and three districts (Vahdat, Hisor, Tursunzade). The total population was 1,928,700, among which 57.6% were urban and 42.4% rural. (3) In the northeast is the Khujand agglomeration (part of the Sughd region). Residents of Khujand city, Isfara district, and Istaravshan district participated in the program. The total population of the agglomeration was 759,800 people, of which 41.8% were urban and 58.2% rural. (4) In the southwest is the Khatlon region, which was represented by two areas in the study, Bokhtar city and Kulob district, with a total population of 341,100 people, of which 66.8% were urban and 33.2% were rural.

Due to sparse population and logistical difficulties in obtaining/transporting peripheral blood samples in the Gorno-Badakhshan Autonomous Region (located in the Pamir-Alay Mountain system), the formation of a volunteer cohort was not carried out there. In total, 3,333,800 people (33.9% of the national population) live in the ten listed Tajik areas which contributed volunteers to the study. From this number, in accordance with the de Moivre-Laplace limit theorem [3], a representative volunteer cohort was formed: 3,682 people, or 0.11% of all residents of these areas. Urban and rural population shares were 51% and 49%, respectively. Participant representation averaged 0.11% of the population of the cities included in the study, ranging from 0.03% (Hisor district) to

0.14% (Dushanbe city) (Table 2S, see Supplementary data).

After exclusion of eight non-valid samples, the number of volunteers included in the analyzed cohort was 3,674. Of them, 359 people (9.8%; 95% CI: 8.9-10.8) had a history of a verified clinical form of COVID-19. The volunteer cohort was represented by seven age groups: 1-17; 18-29; 30-39; 40-49; 50-59; 60-69; and ≥ 70 . Taking into account previously identified aspects of the formation of immunity in children [21], the group '1-17 years old' was further divided into 3 subgroups (1-6, 7-13, 14-17 y. o.) (Table 3S, see Supplementary data).

The general cohort included representatives of most Tajik professional groups (Table 4S, see Supplementary data). The largest share of participants was from medical professionals (40.3%; 95% CI: 38.7-41.9). The smallest was from the military (0.3%; 95% CI: 0.1-0.5) and the Arts (0.1%; 95% CI 0.03-0.3). Agricultural workers represented only 0.5% (95% CI: 0.3-0.5). However, these figures do not reflect the real contribution of the rural population. Some of them, having one or more specialties, were included in other professional groups.

Organization of laboratory research

At the appointed time, volunteers visited the collection point, where a medical worker took a 3 mL peripheral venous blood sample using vacutainers containing EDTA. Samples were centrifuged to separate plasma from cellular elements. Plasma were transferred into plastic tubes and stored until analysis (≤ 24 hrs) at 4 °C. Antibodies to the nucleocapsid (Nc) antigen (Ag) and S protein receptor binding domain (RBD) were quantified by ELISA using the appropriate test systems as previously described [19]. Analysis results were expressed as BAU/mL.

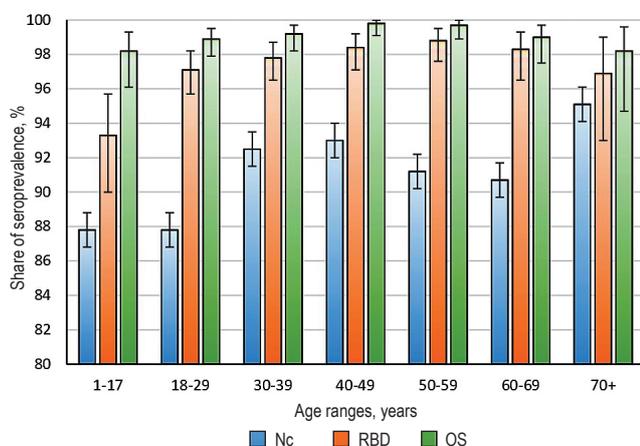


Figure 2. Distribution of seropositivity (Nc, RBD, OS) by age group. Black vertical lines are 95% confidence intervals
Note. Numerical data are given in Table 5S.

Statistical analysis

Population seroprevalence was assessed according to three parameters: the share of individuals with detectable serum Nc Abs; the share of individuals with detectable serum RBD Abs; and the share of individuals containing any of these Abs, or their combination (overall seropositivity, OS). Statistical data analysis was performed using Microsoft Excel 2010. Mean values and confidence intervals of shares were calculated by the method of A. Wald and J. Wolfowitz [33] with the correction of A. Agresti and B.A. Coull [1]. Spearman's rank correlation, multivariate regression, and multivariate analyses were performed using Statistica version 12 (StatSoft). For other statistical calculations not mentioned in this section, we used Statistica version 12. Unless otherwise indicated, $p \leq 0.05$ was used as the threshold of statistical significance. Illustrations were made in Excel 2010 or Statistica version 12.

Results

Gender distribution of SARS-CoV-2 seroprevalence

The cohort of 3,674 included 1,010 men and 2,664 women. The gender ratio was 1:2.6, specifically: 27.5% (95% CI: 26.1-29.0) males and 72.5% (95% CI: 71.0-73.9) females. By serological analysis, men showed the following pattern: SARS-CoV-2 OS 98.5% (95% CI: 97.7-99.2); Nc Abs 90.1% (95% CI: 88.2-91.9); and RBD Abs 96.7% (95% CI: 95.6-97.8). Seroprevalence in women was (insignificantly) higher than in men: OS 99.4% (95% CI: 99.0-99.6); Nc Abs 91.1% (95% CI: 90.0-92.2); and RBD Abs 97.8% (95% CI: 97.2-98.3).

Age distribution of SARS-CoV-2 seroprevalence

Analysis of seroprevalence (Nc, RBD, OS) in different age groups was performed (Figure 2, Table 5S, see Supplementary data). High seropositivity was noted in all age groups, albeit with some peculiarities. Nc Abs seroprevalence was the lowest (compared to RBD, OS) in the age groups 1-17 years and 18-29 years. This difference was significant compared to other age groups ($p < 0.001$), except for the 70+ group (Figure 2).

A different distribution was found with RBD Abs analysis. Seroprevalence among those aged 1-17 and 18-29 years was again low compared to other groups. However, the difference was less noticeable, reaching significance only among children aged 1-17 y. o. ($p < 0.001$).

Overall seropositivity was the highest category, reaching 99.2% (95% CI: 98.8-99.4). In the age groups 40-49 and 50-59 years, the upper limit of the confidence interval reached 100%.

Thus, the level of collective immunity, at least among the examined volunteers, reached a maximum

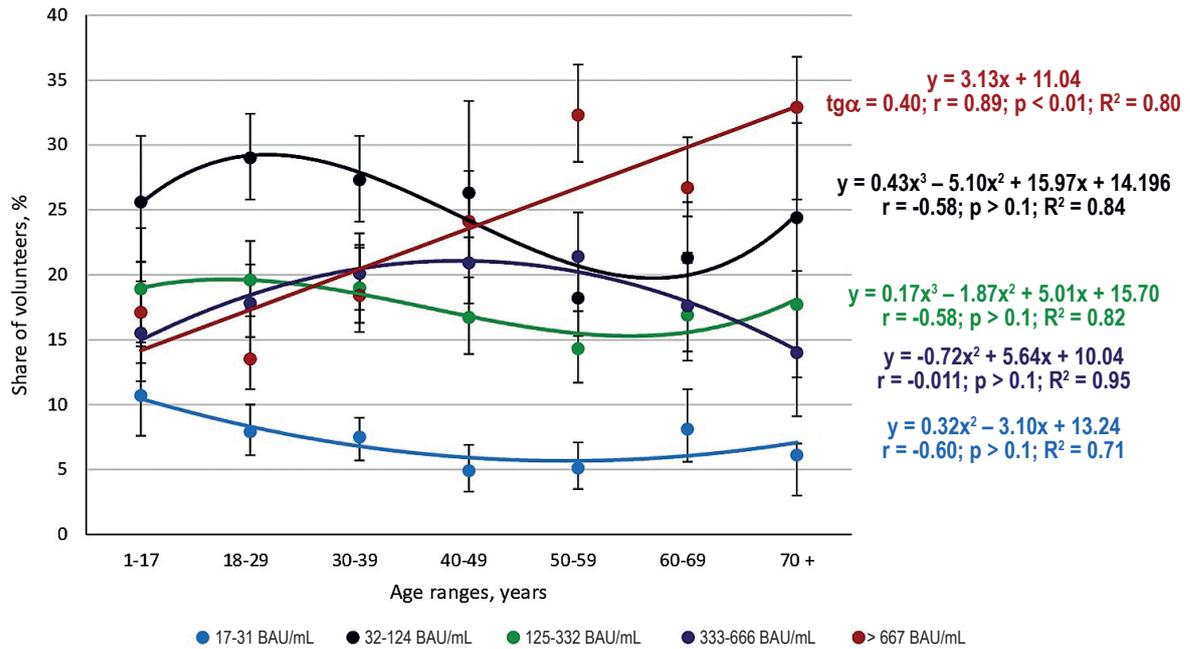


Figure 3. Quantitative distribution of plasma Nc Abs among volunteers of all age groups

Note. Legend: Plasma Abs ranges are expressed as BAU/mL. Colored curves are trend lines for each Abs range. Regression equations, coefficients (rank correlation, determination), significance of differences (p), and angular coefficient (tgα) are shown on the right, highlighted in the color of the corresponding range. Vertical black lines are 95% confidence intervals. For numerical data, see Table 6S.

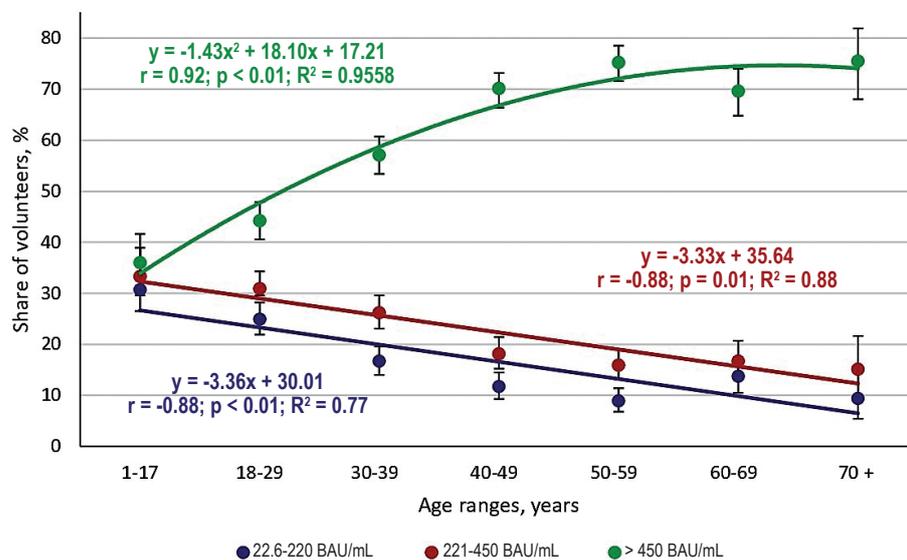


Figure 4. Quantitative distribution of plasma RBD Abs among volunteers of all age groups

Note. Legend: Plasma Abs ranges are expressed as BAU/mL. Colored curves are trend lines for each Abs range. Regression equations and coefficients (rank correlation, determination) are highlighted in the color of the corresponding range. Vertical black lines are 95% confidence intervals; p is the statistical significance of differences. For numerical data, see Table 7S.

value. This fully corresponded with the zero incidence in the Tajik population (end of February 2022 to August 2022) noted above (Figure 1). To analyze the structure of seroprevalence, the shares of volunteers with quantifiable levels of Abs to Nc and RBD was determined (Figures 3, 4).

Volunteers were distributed over five Nc Abs ranges (BAU/mL): 17-31; 32-124; 125-332; 333-666; and ≥ 667 (Figure 3, Table 6S, see Supplementary data). Among volunteers with minimal Nc Abs levels (17-31 BAU/mL), a slight downward trend was observed. The smallest share of volunteers in this group was

found among those aged 40-49 years (4.8%; 95% CI: 3.2-6.7); the largest was among children aged 1-17 years (10.7%; 95% CI: 7.6-14.5). The differences were significant ($p < 0.001$), but the rank correlation coefficient of the distribution over all age intervals was insignificant at -0.60 ($p > 0.1$). The regression curve was a 2nd order polynomial with a determination coefficient $R^2 = 0.71$, described by the equation $y = 0.32x^2 - 3.10x$

A different distribution was noted among volunteers with Nc Abs levels in the range 32-124 BAU/mL. The corresponding regression curve was S-shaped with a peak in the 18-29 age group (29.0%; 95% CI: 25.8-32.4) and a valley in the 50-59 age group (18.1%; 95% CI: 15.2-21.2). The rank correlation coefficient was $r = -0.58$ ($p > 0.1$). The regression curve corresponded to a 3rd order polynomial with a determination coefficient $R^2 = 0.84$, described by the equation $y = 0.43x^3 - 5.10x^2 + 15.97x + 14.196$.

A similar distribution, only with less pronounced curvature, was noted among volunteers with Nc Abs levels in the range 125-332 BAU/mL. As in the previous group, the largest proportion of seropositive volunteers was noted in the age group 18-29 years (19.5%; 95% CI: 16.7-22.4), and the minimum was found among those aged 50-59 years (14.3%; 95% CI: 11.7-17.3). The noted differences were insignificant ($p > 0.05$), as was the rank correlation coefficient value ($r = -0.58$; $p > 0.1$). The regression curve was a 3rd order polynomial with a determination coefficient $R^2 = 0.82$, described by the equation $y = -0.17x^3 + 1.86x^2 + 5.01x + 15.7$.

The form of the regression curve in the group with Abs in the range 333-666 BAU/mL changed to a 2nd order polynomial, while the signs of the coefficients in the regression equation (a, b) changed to opposite relative equations for the group 13-31 BAU/mL. The rank correlation coefficient, as in other groups, remained insignificant ($r = -0.11$; $p > 0.1$). The regression curve, with coefficient of determination $R^2 = 0.95$, was described by the equation $y = 1.72x^2 + 5.64x + 10.04$. With maximum Nc Abs levels (> 667 BAU/mL), the regression became linear with a determination coefficient $R^2 = 0.8$, described by the equation $y = 3.13x + 11.04$. At the same time, the rank correlation coefficient was 0.89 and significant ($p < 0.01$). The regression curve shows that: the lowest seroprevalence was typical for the age groups 1-17 and 18-29 years; and the maximum was seen among those aged 70+ years (Figure 3, Table 6S).

When analyzing the quantitative distribution of RBD Abs among volunteers of different ages, the results were grouped into three ranges: 22.6-220; 221-450; and > 450 BAU/mL (Figure 4, Table 7S, see Supplementary data).

The smallest shares of seropositivity were noted among volunteers with RBD Abs levels in the range 22.6-220 BAU/mL. The relationship between volunteer age and RBD Abs levels was satisfactorily described by the linear regression equation $y = 3.36x + 30.01$, with a coefficient of determination of 0.77. It is interesting that, as with Nc Abs, the largest proportion of seropositive individuals was noted in the age groups 1-17 and 18-29 years. The smallest was seen among those aged ≥ 40 years. The proportion of Nc seropositive individuals was largely uncorrelated with age (rank correlation coefficient significance $p > 0.05$). Regarding the distribution of RBD seropositive individuals, the correlation coefficient was -0.88 and significant ($p < 0.01$).

A similar relationship was found in the group of individuals with RBD Abs levels of 220-450 BAU/mL. Only the numerical values of the coefficients a and b changed, and the coefficient of determination increased to 0.88. The main trend remained unchanged: a lower proportion of seropositive individuals in the age ranges 1-17 and 70+ years. This lower proportion was significant with a rank correlation coefficient of $r = -0.93$ ($p < 0.001$).

Achievement of the maximum RBD Abs level (> 450 BAU/mL) was accompanied by a trend change from negative to positive. The linear regression transformed into a 2nd order polynomial ($y = -1.43x^2 + 18.10x + 17.21$), and the coefficient of determination increased to 0.92. The trend change was not accidental. The rank correlation coefficient changed sign, and its value was 0.96 ($p < 0.01$). Interestingly, a similar transformation was seen when analyzing the distribution of Nc Abs seropositivity in the > 667 BAU/mL group (Figure 3).

Quantitative analysis of the age distribution of Nc and RBD Abs showed similar dynamics. Interestingly, the results are unlike a study of seroprevalence in Russian regions in the early stages of the COVID-19 pandemic, wherein the highest Abs levels were noted in children aged 1-17 years [13]. In the RT, a high level of herd immunity was established from the end February, with no registration of overt forms of COVID-19. The lowest level of seropositivity was observed among the child population. Among volunteers over 60 years of age, it was identified: a lower share of individuals with low Abs levels; and a significantly higher share of individuals with the maximum levels of all measured Abs. This is likely due to geographical, professional, or other factors.

Volunteer seroprevalence in different Tajik geographic regions

The study of herd immunity was carried out mainly in the western regions of the RT. In the northwest, it was Panjakent district with a population of 304,200.

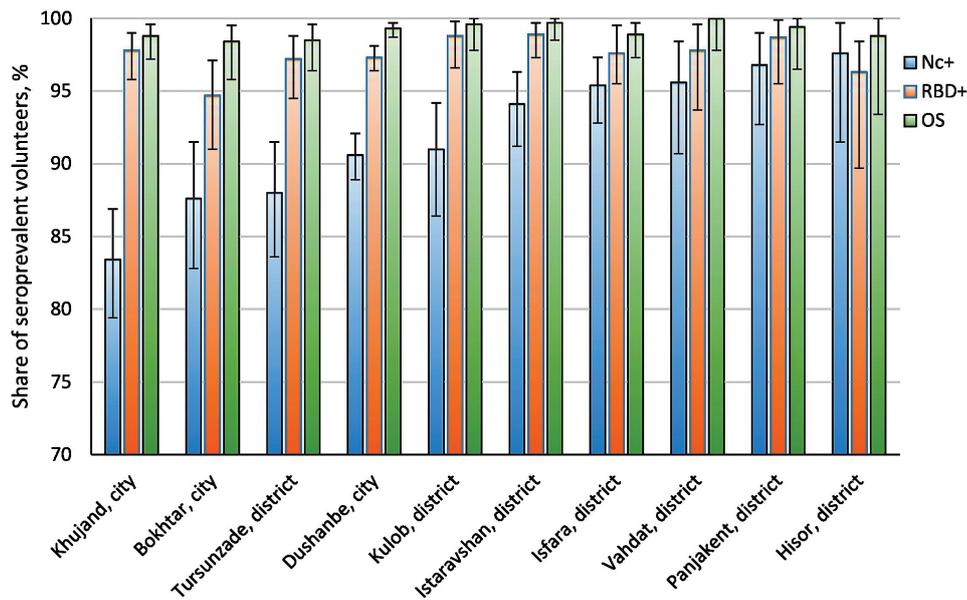


Figure 5. Distribution of seropositivity (Nc, RBD, OS) by place of residence

Note. The legend is shown in the upper right. Black vertical lines are 95% confidence intervals.

The central region was represented by Dushanbe city and three districts (Vahdat, Hisor, Tursunzade) with a total population of 1,611,400. In the north, the study was carried out in the city of Khujand and two districts (Istaravshan, Isfara) with a population of 759,800. In the southwest, volunteers from Bokhtar city and the Kulob district participated in the project. The total population of the regions included in the program was 3,333,800 (1,600,600 urban, 1,733,200 rural). In total, 3,674 individuals took part in the program in these regions, of which 3,644 (99.2%; 95% CI: 98.8–99.4) were found to have Abs to SARS-CoV-2. It is necessary to note certain differences in the structure of Nc and RBD Abs seropositivity (Figure 5, Table 8S, see Supplementary data).

The smallest proportion of volunteers seropositive for Nc was noted in Khujand city. The largest was noted in the Panjakent and Hisor districts. An attempt to group seropositive volunteers on a regional basis was not successful. For example, the Istaravshan and Isfara districts had a significantly higher proportion of Nc seropositive individuals than Khujand city (located in the same geographic region). A similar situation was noted in the Dushanbe agglomeration (Dushanbe city, Tursunzade dist., Vahdat dist., Hisor dist.). Determination of the proportion of RBD seropositive individuals showed an almost uniform level, varying in a narrow confidence interval, of 97.5% (95% CI: 97.0–98.0). The proportion of OS persons was even higher, 99.2% (95% CI: 98.8–99.4).

Correspondence analysis was performed assessing seroprevalence and regions (Figure 6). Such regions as

the Hisor, Panjakent, Vahdat, and Isfara featured a high degree of association with seropositivity. Relatively low correspondence was noted with the Khujand region. The total chi-square of the correspondence analysis was 60.7488 ($p < 0.0001$)

The results may indicate regional features of herd immunity. These may have formed under the influence of certain socioeconomic conditions or in connection with the level of development in the region. Most of the cohort lived in areas located in intermountain valleys with favorable climatic conditions. We were not able

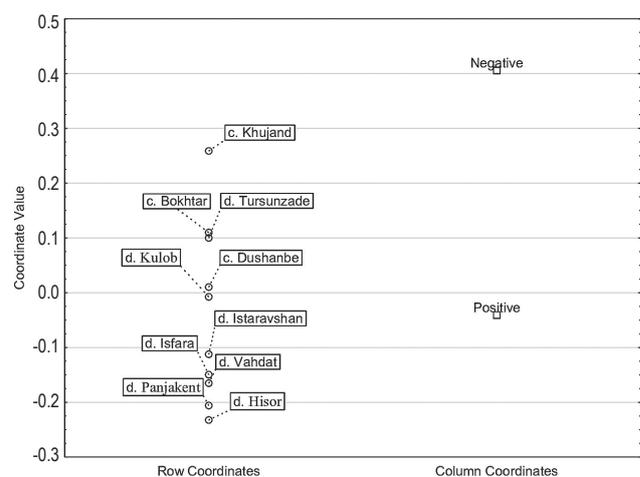


Figure 6. Regional distribution of seroprevalence frequency

Note. c, city; d, district; Positive, positive SARS-CoV-2 Abs test; Negative, negative SARS-CoV-2 Abs test. The figure shows the regions located in the conditional space on the same level with the category corresponding to the positive test result.

to establish any impact of climatic/geographic factors on seroprevalence.

Effect of occupation on cohort seroprevalence

Occupation is another potential factor influencing SARS-CoV-2 seropositivity levels. In processing questionnaires, seventeen professional groups were identified. Six of them featured less than thirty individuals. Hence, some professional groups were

combined (Figure 7). Civil servants and military personnel were combined into one group. Workers in industry, agriculture, and transport were combined into another group. Other groupings were: preschool children combined with schoolchildren; and scientists combined with creative workers (the Arts). In result, the total number of professional groups was reduced to twelve. The resulting sample was ranked from

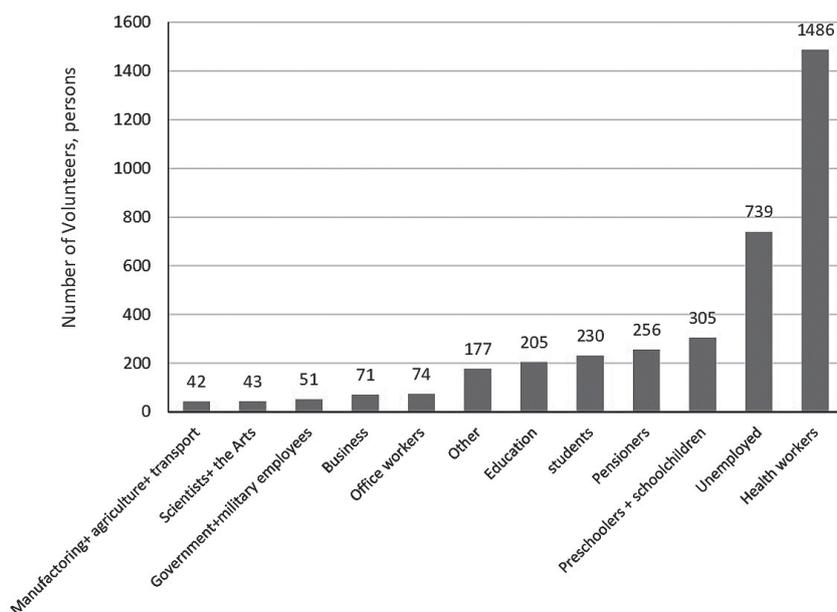


Figure 7. Distribution of volunteers by occupation

Note. Groups with small sample sizes were combined ('government and military employees', 'workers in industry, agriculture and transport', 'children of preschool and school age', 'scientists and the Arts').

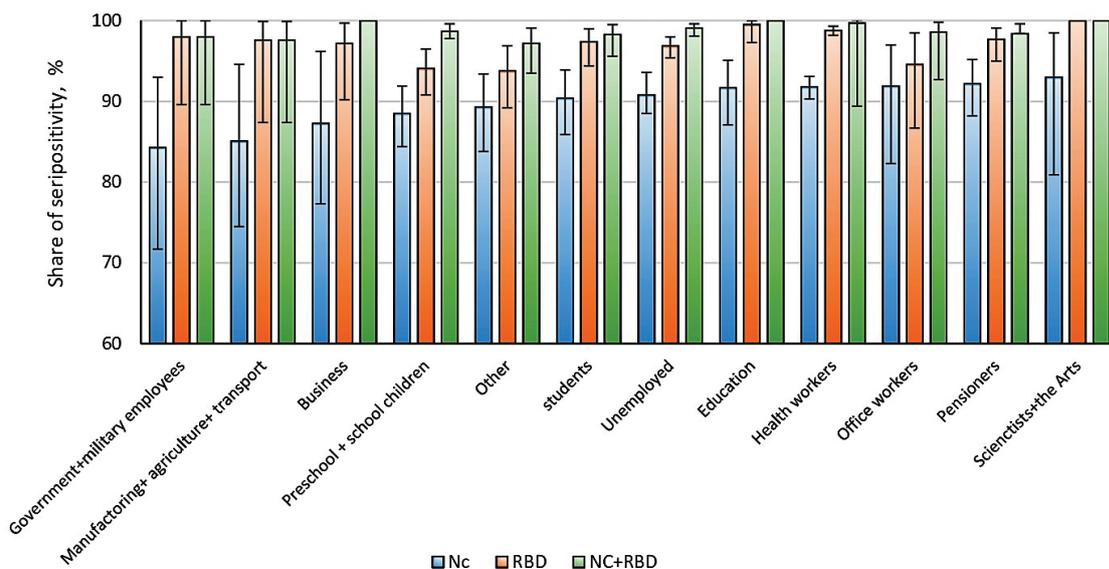


Figure 8. Distribution of seropositive individuals (Nc, RBD, OS) by occupation

Note. As for Figure 7. Black vertical bars are confidence intervals.

minimum to maximum proportion Nc seropositive. This made it possible to more clearly show the real volunteer distribution by occupation, taking into account group (Figure 7).

The presented data indicate a significant variation in the number of volunteers in each sample. The maximum number were employed in healthcare, followed by persons unemployed at the time of the survey. The minimum number of participants belonged to three combined groups: 'industry, agriculture, transport'; 'scientists and the Arts'; and 'civil service and the military employees'.

When analyzing the ranked series for Nc seroprevalence, the order was slightly different than with RBD. The minimum level of seroprevalence was noted in the groups 'government + military employees' and 'manufacturing + agriculture + transport'. The highest level was among 'scientists+the Arts' (Figure 8, Table 9S, see Supplementary data). The largest group, healthcare workers, with a score of 91.8% (95% CI: 90.3-93.1) is located between education workers and office workers. In this context, cohort RBD seroprevalence averaged 97.5% (95% CI: 97.0-98.0), and the share OS almost reached its limit (99.2%; 95% CI: 98.8-99.4). As expected, there were no significant differences in the last two groups.

Correspondence analysis (Figure 9) assessing SARS-CoV-2 seroprevalence and field of professional activity did not reveal any association between the parameter 'presence of antibodies' and field of activity. The total chi-square of the performed correspondence analysis was 15.7416 ($p < 0.4712$).

The results likely reflect an important factor. The continuous mass vaccination approach adopted by Tajik authorities led to almost absolute seroprevalence (exceeding 90% in the population without contraindications to immunization). In result, distinctions between professional groups that may have existed at an earlier stage inevitably blurred. An example would be the noticeable, yet insignificant, dependence of Nc seropositivity on professional activity.

Seroprevalence pattern with asymptomatic infection

As noted, the cohort featured quite high seroprevalence (Nc, RBD, OS), regardless of age, place of residence, or professional affiliation (Figure 2, 5, 8). The most likely cause is the mass vaccination program mentioned. However, this is not the only reason, given the low incidence rate throughout the pandemic (Figure 1). It is possible that portions of the population experienced asymptomatic infection, leading to production of associated Abs (notably anti-Nc). This possibility has been repeatedly shown earlier [22, 23, 24, 31]. An additional factor, characteristic of the RT, is large families with several

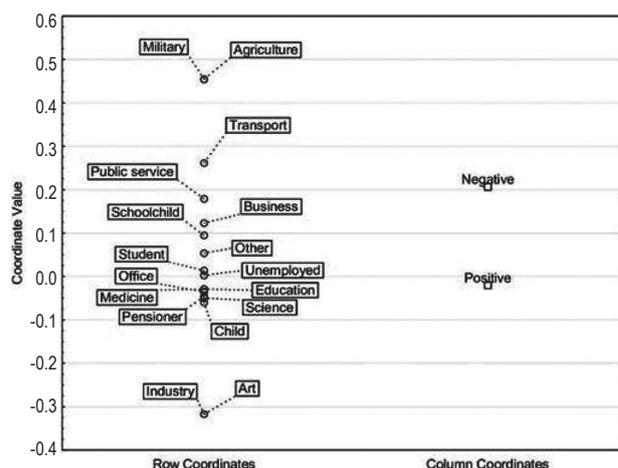


Figure 9. Distribution of seroprevalence by occupation

Note. Positive, positive SARS-CoV-2 Abs test; Negative, negative SARS-CoV-2 Abs test. The figure shows the occupation located in the conditional space on the same level with the category corresponding to the positive test result.

children of different ages. In such conditions, infection often occurs in a latent or asymptomatic form. Due to high viral transmissibility, infection can spread from a sick child to other family members, conferring asymptomatic infection [8, 14]. As part of this study, the proportion of individuals without any history of manifest COVID-19 was assessed in a group of Nc⁺ unvaccinated volunteers (n = 998). These were classified as those with a likely history of asymptomatic infection (Figure 10).

The largest proportion of volunteers with a likely history of asymptomatic infection was found among children aged 1-17 years (97.1%; 95% CI: 94.5-98.8), those aged 18-29 (97.7%; 95% CI: 94.3-99.4), and those aged 70⁺ (100%). In all these groups, the differences from the mean were significant ($p < 0.05$). The smallest share of asymptomatic individuals was found in the group 40-49 years old (88.2%; 95% CI: 79.8-94.0). Unfortunately, the authors cannot offer a logical explanation for the identified differences. It can only be assumed that the high frequency of asymptomatic infection among children is associated with the aforementioned increased resistance of this group to COVID-19 [14]. Among those aged 70⁺, it can be explained, to some extent, by closer contact with children [20]. However, these assumptions require further research, and they do not explain the higher proportion of asymptomatic individuals in the 18-29 age group.

The role of vaccination in herd immunity formation

After analyzing the structure of volunteer seropositivity (Nc, RBD) according to social factors (age, region, profession), we assessed the impact of

TABLE 2. SEROPOSITIVITY FOR Nc AND RBD ANTIBODIES IN THE ENTIRE COHORT (n = 3674)

		Nc Abs status, n, % (95% CI)		Total, n, % (95% CI)
		Nc ⁺	Nc ⁻	
RBD Ab status	RBD ⁺	3279 89.2 (88.2-90.2)	305 8.3 (7.5-9.2)	3584 97.5 (97.0-98.0)
	RBD ⁻	60 1.7 (1.3-2.1)	30 0.8 (0.6-1.2)	90 2.4 (1.9-3.0)
	total	3339 90.9 (90.0-91.8)	335 9.1 (8.2-10.1)	3674 (100)

the various vaccines on seroprevalence. Initially, the level of collective immunity (Nc, RBD) of the entire cohort was determined, regardless of cause (Table 2). The results showed that the proportion of seropositive volunteers in the entire cohort was 99.1% (95% CI: 98.8-99.4).

The largest group was individuals who had both tested Abs (Nc⁺RBD⁺, 'double positive'), reaching 89.2% (95% CI: 88.2-90.2) in the entire cohort. RBD monopositivity was 8.3% (95% CI: 7.4-9.2), and Nc monopositivity was only 1.7% (95% CI: 1.3-2.1). Such high seroprevalence inevitably raises questions about the phenomenon's causes and structure.

As noted, in accordance with the Emergency COVID-19 Project [7], the Tajik Ministry of Health and Social Development launched a mandatory vaccination program on June 26, 2021. By March 18, 2022, the proportion of individuals who had received two immunizations had reached all 48.7% of the population without medical contraindications. For one reason or another, 52.3% remained unvaccinated. It is logical to expect lower seroprevalence in the

unvaccinated portion of the population, which were inevitably in the examined cohort. However, the data refutes this initial hypothesis (Table 3).

In the cohort of 3674 people, 1113 were not vaccinated (30.3%; 95% CI: 28.8-31.8). Among them, the proportion double seropositive (Nc⁺RBD⁺) was 85.8% (95% CI: 83.6-87.7). The proportion RBD monopositive was significantly lower (8.8%; 95% CI: 7.2-10.6), and the proportion of Nc monopositive was minimal (3.9%; 95% CI: 2.8-5.2). In other words, the seropositivity frequency among unvaccinated volunteers was almost the same as that of the overall cohort (Table 3). These data require further explanation. The most logical assumption may be that asymptomatic infections are widespread in the Tajik population, with some influence from convalescents, although their share was only 10.8% (95% CI: 9.8-11.9).

The most important factor in the collective immunity of the Tajik population is specific vaccination. The range of vaccines was quite wide and included preparations created on all major platforms

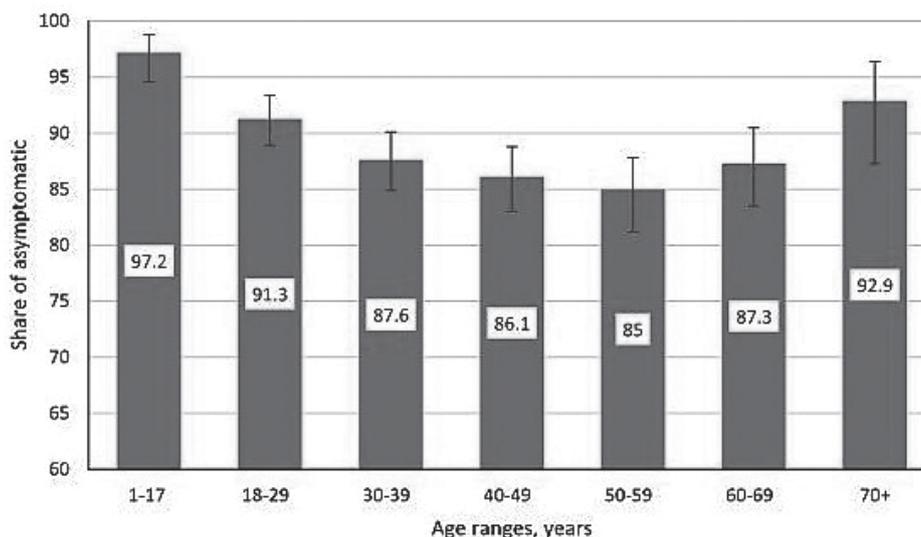


Figure 10. Distribution of volunteers with asymptomatic COVID-19 by age (in the group of unvaccinated volunteers seropositive for Nc Abs)

Note. Black vertical lines are confidence intervals.

(Table 1). Some vaccines, however, were used relatively widely, while others were used only among small groups (Figure 11).

The most frequently used vector vaccine was AZD1222, better known as AZD 1222, with a share of 49.2% (95% CI: 47.2-51.1). Less widely used was the CoronaVac (25.2%; 95% CI: 23.5-26.9). The mRNA-1273 and BNT162b2 vaccines were utilized about 4.5-fold less frequently than AZD1222. These four vaccines accounted for 95.3% of immunized individuals. The remaining five preparations accounted for only 3.9%. In 0.8% of cases, the volunteer could not name the preparation used (Figure 11, indicated as ‘unknown’). Two vaccines produced in Russia (Sputnik V, Sputnik Light) were combined under the common name Gam-COVID-Vac. Mass immunization, as expected, led to the formation of a high level of humoral immunity (Table 4).

The data obtained mainly corresponded with the structure of herd immunity of the entire volunteer cohort (Table 2). The largest number of vaccinated volunteers contained both serum Abs (‘double positive’, Nc⁺RBD⁺); their share was 90.8% (95% CI: 89.6-91.8). The proportion of RBD monopositive individuals was 11-fold lower (8.1%; 95% CI: 7.0-9.2), and the proportion of Nc monopositive individuals was only 0.7% (95% CI: 0.4-1.1). Differences between seropositivity levels in the entire cohort (Table 3) and among vaccinated individuals (Table 4) were not statistically significant.

As noted above, a total of eight different vaccines created on four platforms were used in the process of mass vaccination (Table 5). Vaccines from different platforms can have different compositions and, obviously, effectiveness. Therefore, we initially analyzed possible differences in volunteer seroprevalence based on the platforms used for vaccine production (Tables 6-8).

Out of 1,296 volunteers who had received vector vaccines, 90.3% (95% CI: 88.5-91.8) were double positive (Nc⁺RBD⁺) (Table 6). Those monopositive for RBD represented 8.9% (7.4-10.6), and those monopositive for Nc represented only 0.3% (95%

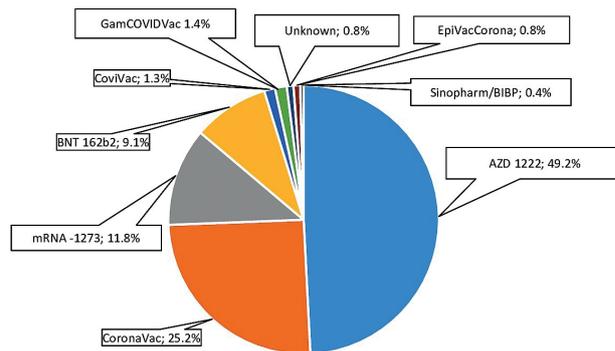


Figure 11. Range of preparations used to vaccinate volunteers

CI: 0.08-0.8). The results were not significantly different from the level of herd immunity in the cohort (Table 2).

Among those immunized with WVV, similar results were obtained (Table 7). The proportion double positive (Nc⁺RBD⁺) was 93.2% (95% CI: 91.0-94.9). The proportion RBD monopositive was lower (4.5%; 95% CI: 3.1-6.3) compared with that following use of vector vaccines (Table 6). The differences were significant (p < 0.001). In contrast, the proportion monopositive for Nc was 1.6% (95% CI: 0.8-2.8). The differences were significant (compared to immunization with vector vaccines) at p < 0.001. It can be assumed that the higher ‘monopositive for Nc’ values when using whole-virion inactivated vaccines is associated with the presence of Nc antigens in their composition.

The third platform group, mRNA-based vaccines, included two preparations: mRNA-1273 and BNT162b2 (Table 8). Analysis drew attention to the smaller share of Nc⁺RBD⁺ volunteers. The decrease is noticeable, although not significant relative to total seroprevalence in vaccinated volunteers (Table 4).

Analysis to assess the structure of seroprevalence in response to whole-virion vaccines is simply for reference since WVVs contain a full range of antigenic determinants. From this point perspective, it is more

TABLE 3. HUMORAL IMMUNE RESPONSE OF UNVACCINATED VOLUNTEERS (n = 1113)

		Nc Abs status, n, % (95% CI)		Total, n, % (95% CI)
		Nc ⁺	Nc ⁻	
RBD Abs status	RBD ⁺	955 85.8 (83.6-87.7)	98 8.8 (7.2-10.6)	1053 94.6 (93.1-95.8)
	RBD ⁻	43 3.9 (2.8-5.2)	17 1.5 (0.9-2.4)	60 5.4 (4.1-6.9)
	total	998 89.7 (87.7-91.4)	115 10.3 (8.6-12.3)	1113 (100)

TABLE 4. HUMORAL IMMUNE RESPONSE IN THOSE VACCINATED AGAINST COVID-19 (n = 2540)

		Nc Abs status, n, % (95% CI)		Total, n, % (95% CI)
		Nc ⁺	Nc ⁻	
RBD Abs status	RBD ⁺	2305 90.8 (89.6-91.8)	205 8.1 (7.0-9.2)	2510 98.8 (98.3-99.2)
	RBD ⁻	17 0.7 (0.4-1.1)	13 0.6 (0.3-0.9)	30 1.2 (0.8-1.7)
	total	2322 91.4 (90.3-92.5)	218 8.6 (7.5-9.7)	2540 (100)

Note. Unknown vaccine data excluded.

TABLE 5. STRUCTURE OF VACCINES USED FOR VOLUNTEER IMMUNIZATION

Platform	Vaccine	Individuals vaccinated	Vaccination subtotals	
			n	% (95% CI)
vector	AZD1222	1260	1296	50.6 (48.7-52.5)
	Gam-COVID-Vac	36		
inactivated whole-virion	CoronaVac	644	688	26.9 (25.2-28.6)
	CoviVac	34		
	Sinopharm/BIBP	10		
mRNA	mRNA-1273	302	536	20.9 (19.4-22.6)
	BNT162b2	234		
peptide	EpiVacCorona	20	20	0.8 (0.5-1.2)
unknown*		21	21	0.8 (0.5-1.3)
	Total	2561	2561	100

Note. *, volunteers were unable to indicate the type of vaccine they received.

TABLE 6. STRUCTURE OF SARS-CoV-2 Abs SEROPREVALENCE AMONG VOLUNTEERS IMMUNIZED WITH VECTOR VACCINES (n = 1296)

		Nc Abs status n, % (95% CI)		Total, n, % (95% CI)
		Nc ⁺	Nc ⁻	
RBD Abs status	RBD ⁺	1170 90.3 (88.5-91.8)	115 8.9 (7.4-10.6)	1285 99.2 (89.5-99.6)
	RBD ⁻	4 0.3 (0.08-0.8)	7 0.5 (0.2-1.1)	11 0.8 (0.4-1.5)
	total	1174 90.6 (88.9-92.1)	122 9.4 (7.9-11.1)	1296 (100)

TABLE 7. STRUCTURE OF SARS-CoV-2 Abs SEROPREVALENCE AMONG VOLUNTEERS IMMUNIZED WITH WVV (n = 688)

		Nc Abs status n, % (95% CI)		Total, n, % (95% CI)
		Nc ⁺	Nc ⁻	
RBD Abs status	RBD ⁺	641 93.2 (91.0-94.9)	31 4.5 (3.1-6.3)	672 97.7 (96.2-98.7)
	RBD ⁻	11 1.6 (0.8-2.8)	5 0.7 (0.2-1.7)	16 2.3 (1.3-3.8)
	total	652 94.8 (92.8-96.3)	36 5.2 (3.6-7.2)	688 (100)

TABLE 8. STRUCTURE OF SARS-CoV-2 Abs SEROPREVALENCE AMONG VOLUNTEERS IMMUNIZED WITH mRNA VACCINES (n = 536)

		Nc Abs status n, % (95% CI)		Total, n, % (95% CI)
		Nc ⁺	Nc ⁻	
RBD Abs status	RBD ⁺	475 88.6 (85.6-91.2)	58 10.8 (8.3-13.8)	533 99.4 (98.4-99.9)
	RBD ⁻	2 0.4 (0.05-1.3)	1 0.2 (0.0-1.0)	3 0.6 (0.1-1.6)
	total	477 89.0 (86.0-92.0)	59 11.0 (8.5-14.0)	536 100

analogous to seroprevalence in people who have had natural infection (asymptomatic or overt COVID-19). Noteworthy is a noticeable, although not significantly lower proportion of individuals who are monopositive for Nc Abs following mRNA-based vaccination. This is likely explained by the absence in mRNA vaccines of determinants eliciting production of anti-Nc Abs.

In addition to analysis of seroprevalence by vaccine type (vector, whole-virion, mRNA), vaccine distributions by age and region were assessed (Figures 12, 13).

Of the four major vaccines, AZD1222 was the most commonly used. Peak use of this vaccine occurred in people aged 40 to 59 years. In other words, the active working population was more likely to be vaccinated with the AZD1222 vector vaccine. It was used for vaccination in the age groups 18-29 and 60-69 years significantly less often. Unfortunately, the authors failed to establish the reasons for such selectivity.

A different distribution was noted for the WVV CoronaVac. This preparation was more often used in the age groups 18-29 years and 60+; the others were used much less frequently. Obviously they were an additional, but not decisive, helpful factor influencing collective immunity.

The structure of vaccine type utilization in various Tajik regions and cities was characterized by significant heterogeneity (Figure 13, Table 11S, see Supplementary data). Those in the capital (Dushanbe city) and the Isfara district were more often vaccinated with AZD1222 or CoronaVac; BNT162b2 was significantly less frequently used. In Vahdat district, most of the population was vaccinated with the AZD1222 vector vaccine or mRNA-1273. The leaders in the predominant use of AZD1222 were the Kulob, Tursunzade and Panjakent districts, as well as Khuland and Bokhtar cities. Almost everywhere in the RT, the implementation frequency of other vaccines was much lower.

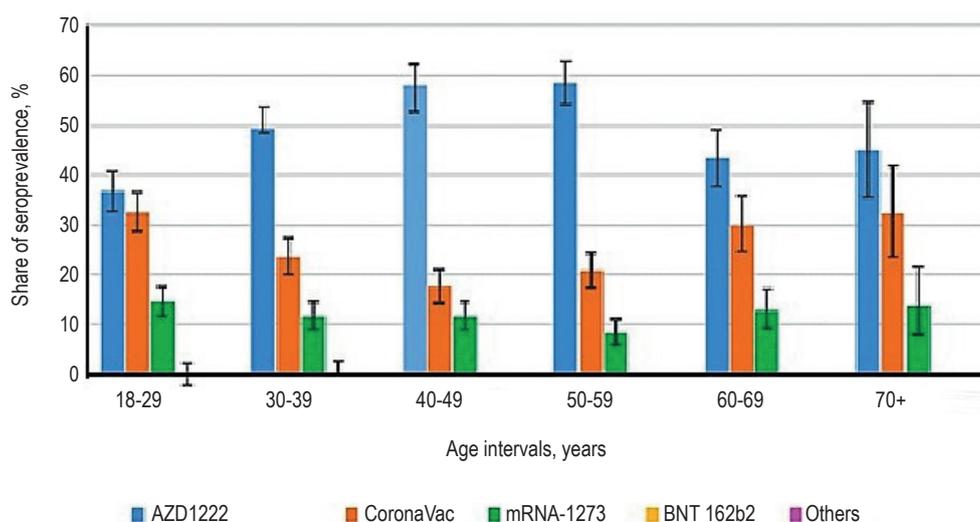


Figure 12. Distribution of vaccines used for immunization by age group (Table 10S, see Supplementary data)

Note. The age group 1-17 years old was excluded from analysis due to the small number of observations (< 0.4%). The legend shows the types of vaccines used (Figures 12, 13). Other refers to any other vaccines (see Table 5).

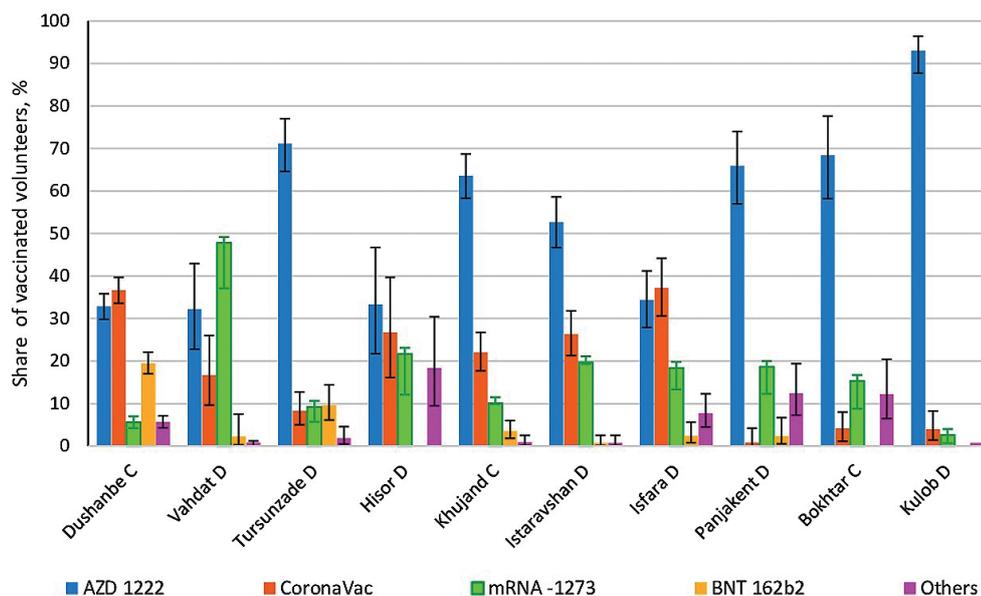


Figure 13. Distribution of vaccines used for immunization in Tajik districts (D) and cities (C)

Note. Black vertical lines are 95% confidence intervals.

Statistical analysis of the seroprevalence of Abs to the two main SARS-CoV-2 antigens revealed almost absolute herd immunity to the pathogen. A significant role in this achievement was played by the vaccines used in the RT. Eventually, they made it possible to reach a total seroprevalence of 99.5% (95% CI: 99.1-99.7). The outcome obtained convincingly confirms the effectiveness of the COVID-19 mass vaccination deployed among the population of the RT.

Discussion

The Republic of Tajikistan, as global data show [12, 18], is a regional leader in overcoming the COVID-19 pandemic. Considering that since the end of February 2022 there have been no registered cases of overt COVID-19 in the country, the epidemic situation can be qualified as favorable. A significant factor, that had a decisive influence in overcoming the COVID-19 pandemic, was undoubtedly mass vaccination in the country. It was launched in accordance with the Emergency COVID-19 Project, with support by the World Bank [7]. As of 05/19/2022, 91.3% of Tajik residents had completed vaccination (received 2 doses), undoubtedly due to the mass vaccination campaign.

This value was clearly reflected in the seroprevalence structure of the surveyed cohort of volunteers recruited from different Tajik regions (Figure 5). When analyzing the age structure of seroprevalence, it is worth noting a very high proportion of individuals seropositive for Nc and RBD Abs, ranging from 87-99% (Figure 2). In addition, there was a significantly lower Nc seroprevalence

among children and young people aged 18-19 years, alongside significantly higher levels among those aged 70+ years. Interestingly, a similar situation was noted in bordering Kyrgyzstan [19]. In a number of Russian regions, predominant seroprevalence among children aged 1-17 years was noted, yet with reduced levels in volunteers aged 70+ [24, 31]. As for the proportion of seropositive individuals (RBD, OS), an almost absolute seroprevalence level of 97-99% was seen here (Figure 2).

With increasing serum concentration interval, quantitative analysis of Nc Abs distribution showed a shift from a 2nd order polynomial (in the region 5 to 10% seropositivity, Abs range 17-31 BAU/mL) to a direct linear regression ($\text{tg}\alpha = 0.40$), ranging from 17.1% (95% CI: 13.2 -21.6) among children (aged 1-17 years) to 22.3% (95% CI: 21.0-23.4) in those aged 70+ (Figure 3).

Different dynamics were observed with quantitative analysis of the distribution of RBD Abs seropositivity (Figure 4). The proportion RBD+ volunteers in the range 26.6 to 450 BAU/mL decreased linearly in the age intervals from 1 year to 70+ years. With an increase in the proportion of individuals with RBD Abs levels > 450 BAU/mL, the trend transformed upward, and the regression changed from linear to 2nd order polynomial. This can likely be explained by longer overall lifetime contact with pandemic and seasonal coronaviruses in adults and the elderly compared with children. The Nc Abs distribution dynamics among people of different ages also supports the likelihood of such an assumption. However, this is still only a hypothesis that requires additional evidence.

The study was conducted in different Tajik geographic regions, with the exception of the Gorno-Badakhshan Autonomous Region. We assessed the influence of region of residence on the level of seroprevalence (Nc, RBD, OS). The results did not show a clear geographical zoning, although some individual features were noted in a number of areas (Figures 5, 14). When ranking regions by Nc seroprevalence, the lowest level was determined to be among residents of Khujand and Bokhtar cities; the highest was in Hisor district. Ranking by seroprevalence did not reveal geographic patterns. For example, the already noted city of Khujand is located in the north of the country, and the city of Bokhtar is in the south.

On the other hand, correspondence analysis (Figure 7) showed a high correlation between seropositivity frequency and districts (Isfara, Vahdat, Panjakent, Hisor) where the maximum shares of Nc Abs seropositivity were found. A low correlation was seen with Khujand city, where seropositivity, as indicated above, was lowest. However, it was not possible to identify any regional differences regarding seropositivity groups RBD and OS. In all cases, the measured indicators varied from 94.7% to 100%; any existing differences were not significant. Finally, even the minimum Nc seroprevalence in Khujand city was 83.4% (95% CI: 79.4-86.9), higher than the postulated threshold for cessation of epidemic processes [26, 28].

When assessing the influence of professional factors, heterogeneity was noted due to the distribution of volunteers by professional group. The largest number of volunteers in the cohort belonged to the group medical workers (Figure 7). Seropositivity values in this profession were: 91.8% (95% CI: 90.3-93.1) for Nc; 98.8% (95% CI: 98.2-99.3) for RBD; and 99.7% (95% CI: 89.4-100) for OS. For OS, differences were significant at ($p < 0.001$) relative to Nc and RBD. This result was expected since healthcare professionals are the most likely to come into contact with COVID-19 patients. It is no coincidence that medical personnel, especially those in infectious disease departments or hospitals, are a risk group for SARS-CoV-2 nosocomial infection frequency [10, 17]. The smallest proportion Nc seropositive was noted in the groups 'state + military employees' and 'manufacturing + agriculture + transport'. As for seropositivity groups RBD and OS, it varied from 93.8% (95% CI: 89.2-96.9) to 100.0% (Figure 9). This position was confirmed by correspondence analysis (Figure 10), which did not reveal a significant relationship between SARS-CoV-2 seroprevalence and occupation. The overall value of the χ^2 index of the performed correspondence analysis was 15.7416 ($p < 0.4712$).

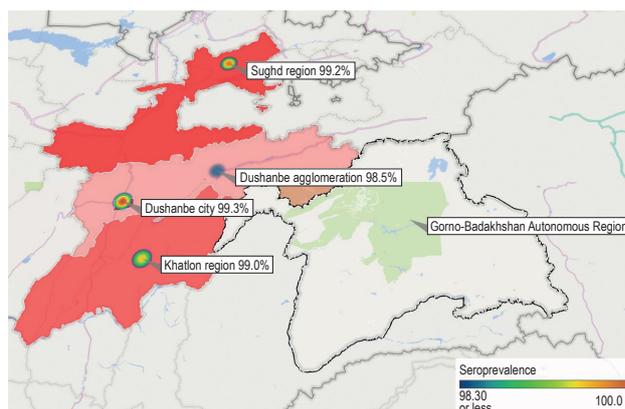


Figure 14. Heat map of seroprevalence levels in the surveyed Tajik regions

Note. Studies were not conducted in the Gorno-Badakhshan Autonomous Region. The seroprevalence scale is shown in the lower right corner.

The proportion of unvaccinated seropositive volunteers with no history of manifest COVID-19 (i.e., seropositive asymptomatic) was 92.8% (95% CI: 91.0-94.3). The largest shares of such individuals were found among volunteers in the age groups 1-17 (> 97%), 18-29 (> 97%), and among the elderly aged 70+ (~100%) (Figure 10). The smallest number of asymptomatic [seropositive] volunteers was found among 50-49 years old, their proportion was 85%. Considering that this group included only unvaccinated volunteers without a history of confirmed COVID-19, it can be reasonably argued that asymptomatic forms of infection are widespread in the Republic. These may serve as an important component of the mechanism behind the formation of high collective immunity to SARS-CoV-2.

An additional factor contributing to the almost complete cessation of COVID-19 incidence in the population during the second half of 2022 was, of course mass vaccination. The cumulative level of collective humoral immunity in the entire cohort was 99.1% (95% CI: 98.8-99.4). More specifically (Table 3), the shares were: 89.2% (95% CI: 88.2-90.2) for double positive (Nc+RBD+); 1.6% (95% CI: 1.2-2.1) for Nc monopositive; and 8.3% (95% CI: 7.4-9.2) for RBD monopositive. Such a high figure, of course, requires further analysis and interpretation.

Considering that 44.9% of the population were not vaccinated, we initially estimated the level of humoral immunity in this volunteer category (Table 4). Overall seropositivity in this group was 98.4% (96% CI: 97.6-99.1); differences with the herd immunity score in the entire cohort (Table 3) were not significant. A possible source of such a high seroprevalence could be COVID-19 convalescents. However, their share in the cohort was only 9.8% (95% CI: 8.8-10.8).

This is probably insufficient to significantly affect OS among unvaccinated volunteers. As such, it is logical to assume that the main reason for this phenomenon may be wide dissemination of asymptomatic infection among the Tajik population, including volunteers.

The high seropositivity in the unvaccinated Tajik population represents an important, yet auxiliary, component of herd immunity. The main role belongs to specific vaccination. As already emphasized, authorities carried out the important step of mass vaccination.

Something similar was done in Israel, using the BNT162b2 (mRNA) vaccine [6]. As of April 2021, 4,709,335 people (> 71% of the pop.) had completed vaccination in Israel [9]. It was an unprecedented action that gave hope for the elimination of COVID-19 in at least one country. However, after a short period of time, data on cases of disease among those vaccinated with BNT162b2 appeared [2]. According to the source, as early as 1-10 days after vaccination, 22 healthcare workers (of 4081 immunized) developed COVID-19. When the Delta variant appeared in Israel, the number of cases of overt infection among vaccinated individuals increased by 2 to 3-fold [5].

Unlike Israel, where only BNT162b2 was used, the RT used a tactic of mass immunization using vaccines from all major platforms (Table 6). To a certain extent, such usage was involuntary. Tajik medical authorities used vaccines received from international organizations and individual countries as assistance. Nonetheless, the variety gave the best result in terms of durable herd immunity.

When assessing seroprevalence among vaccinated volunteers (Table 5), the results practically did not differ from the humoral immunity level in general (Table 3). Seroprevalence among vaccinated individuals was 99.5% (95% CI: 99.1-99.7); differences from the total cohort were not significant. Among vaccines used in the RT, the most widespread was AZD1222. Its share, together with another vector vaccine Gam-COVID-Vac (Sputnik V, Sputnik Light), was 51.4% (95% CI: 49.5-53.4). The inactivated WVV family (CoronaVac, CoviVac) ranked second in terms of distribution, with a 27.3% share (95% CI: 25.6-29.1). Third place was taken by mRNA preparations (mRNA-1273, BNT162b2), whose contribution was 21.3% (95% CI: 19.7-22.9). The vaccine classes used, regardless of their prevalence, caused comparable levels of herd immunity among the population (Tables 7-8, not significant): vector – 99.4% (95% CI: 98.9-99.8); whole-virion – 99.3% (95% CI: 98.3-99.8); and vaccine mRNA – 99.8% (95% CI: 99.0-100).

Thus, it can be argued that the simultaneous or sequential use of preparations created on three main platforms during mass vaccination made it possible to achieve almost absolute immunity to SARS-CoV-2.

In this regard, a detailed analysis of vaccine usage distribution by age, regional, and occupational factors did not bring any surprises. The largest number of people immunized with vector vaccines was noted among the able-bodied population aged 30 to 59 years (Figure 12). Whole-virion inactivated vaccines were also mainly received by able-bodied persons, albeit in a broader age range beginning younger (18 to 59 years). Messenger RNA preparations were distributed much less frequently, mainly in the same age intervals.

The smallest proportion vaccinated (any preparation) was noted among people aged 70+, probably due to contraindications in the group. Children aged 1-17 years were immunized only in isolated cases (any vaccine). Nuances of vaccine distribution by region were noted (Figure 13). In all Tajik territories, a prevalence of vector vaccines was noted. In Dushanbe city only, most individuals received a whole-virion inactivated vaccine, which was unexpected.

Conclusion

In summarizing our analysis of herd immunity among the Tajik population, we can make a cautious assumption that one of the likely factors in the formation of highly robust herd immunity may have been the simultaneous use of several vaccines produced on different platforms. The distribution among the population of the widest possible set of antigenic determinants made it possible to form the most diverse set of antibodies. This formed an impediment to spread of the pathogenic virus. Of course, such a hypothesis would not even be plausible without the conditions formed through the mass immunization campaign for the population undertaken by the authorities of the Republic of Tajikistan. A unique combination of social and biological factors made it possible to achieve maximum immunity to SARS-CoV-2, thus preventing further development of the epidemic process.

Conflict of interest: none.

Author contributions

AVP, NDJ – study planning; MMR, TAA – study organization; SDV, MMM, BTK – collection and primary processing of biomaterial;

AMM, ESA – organization of sample transportation; IVD, OVZ – laboratory study of biomaterial; VAI – database formation; AAK – statistical analysis; VSS, TAA, ESA – analysis of data received, writing and editing of the text; ESR – translation and editing of text.

Acknowledgments

The authors are grateful to E.S. Glazkova for laboratory research technical support.

References

1. Agresti A., Coull B.A. Approximate is better than “exact” for interval estimation of binomial proportions. *Am. Stat.*, 1998, Vol. 52, no. 2, pp. 119-126.
2. Amit S., Beni S.A., Biber A., Grinberg A., Leshem E., Regev-Yochay G. Postvaccination COVID-19 among Healthcare Workers, Israel. *Emerg. Infect. Dis.*, 2021, Vol. 27, no. 4, pp 1220-1222.
3. Batrakova L.G. Theory of .statistic. Moscow: Knorus, 2016. 528 p.
4. Bioversity International. Available at: <http://centralasia.bioversityinternational.org/tadjikistan/> (Accessed 20/08/2022).
5. Brosh-Nissimov T., Maor Y., Elbaz M., Lipman-Arens S., Wiener-Well Y., Hussein K., Orenbuch-Harroch E., Cohen R., Zimhony O., Chazan B., Neshet L., Rahav G., Zayyad H., Hershman-Sarafov M., Weinberger M., Najjar-Debbiny R., Chowers M. Hospitalised patients with breakthrough COVID-19 following vaccination during two distinct waves in Israel, January to August 2021: a multicentre comparative cohort study. *Euro. Surveill.*, 2022, Vol. 27, no. 20, 2101026. doi: 10.2807/1560-7917.ES.2022.27.20.2101026.
6. Dagan N., Barda N., Kepten E., Miron O., Perchik S., Katz M.A., Hernán M.A., Lipsitch M., Reis B., Balicer R.D. BNT162b2 mRNA COVID-19 vaccine in a nationwide mass vaccination setting. *N. Engl. J. Med.*, 2021, Vol. 384, no. 15, pp.1412-1423.
7. Emergency Project COVID-19. Available at: <https://projects.worldbank.org/en/projects-operations/project-detail/P173765> Accessed. 20/08/2022.
8. Fischer A. Resistance of children to Covid-19. How? *Mucosal Immunol.*, 2020, Vol. 13, no. 4, pp 563-565.
9. Haas E.J., Angulo F.J., McLaughlin J.M., Anis E., Singer S.R., Khan F., Brooks N., Smaja M., Mircus G., Pan K., Southern J., Swerdlow D.L., Jodar L., Levy Y., Alroy-Preis S. Impact and effectiveness of mRNA BNT162b2 vaccine against SARS-CoV-2 infections and COVID-19 cases, hospitalisations, and deaths following a nationwide vaccination campaign in Israel: an observational study using national surveillance data. *Lancet*, 2021, Vol. 397, no. 10287, pp. 1819-1829.
10. Harrison D., Muradali K., El Sahly H., Bozkurt B., Jneid H. Impact of the SARS-CoV-2 pandemic on health-care workers. *Hosp. Pract. (1995)*, 2020, Vol. 48, no. 4, pp.161-164.
11. Huang Q., Zeng J., Yan J. COVID-19 mRNA vaccines. *J. Genet. Genomics*, 2021, Vol. 48, no 2, pp 107-114.
12. Johns Hopkins University’s Center for Systems Science and Engineering (CSSE) COVID-19 Data Repository. Available at: <https://github.com/CSSEGISandData/COVID-19>. Accessed 23/08/2022.
13. Khan W.H., Hashmi Z., Goel A., Ahmad R., Gupta K., Khan N., Alam I., Ahmed F., Ansari M.A. COVID-19 Pandemic and Vaccines Update on Challenges and Resolutions. Review. *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, 2021, Vol. 11, 690621. doi: 10.3389/fcimb.2021.690621.
14. Mehta N.S., Mytton O.T., Mullins E.W.S., Fowler T.A., Falconer C.L., Murphy O.B., Langenberg C., Jayatunga W.J.P., Eddy D.H., Nguyen-Van-Tam J.S. SARS-CoV-2 (COVID-19): What do we know about children? A systematic review. *Clin. Infect. Dis.*, 2020, Vol 71, no. 9, pp. 2469-2479.
15. Moriyama M., Hugentobler W.J., Iwasaki A. Seasonality of Respiratory Viral Infections. *Annu.Rev. Virol.*, 2020. Vol. 7, no. 1, pp 83-101.
16. Mukhabbatov Kh.M. Natural resource potential of the mountainous regions of Tajikistan. Moscow: Granitca, 1999.
17. Opoku M.M., Asante K.P., Gyaase S., Teviu E.A.A., Amponsah K., Twum A., Kusi K.F., Ampofo A.K., Adomako-Boateng F. Risk factors for COVID-19 virus infection among health workers: a case-control study in the bono east region of ghana. *Am. J. Infect. Control*, 2022. doi: 10.1016/j.ajic.2022.08.008.
18. Our world is in data. Available at: <https://ourworldindata.org/> (Accessed 23/08/2022).
19. Popova A.Y., Kasymov O.T., Smolenski V.Y., Smirnov V. S., Egorova S.A., Nurmatov Z.S., Milichkina A.M., Suranbaeva G.S., Kuchuk T.E., Khamitova I.V., Zueva E.V., Ivanov V.A., Nuridinova Z.N., Derkenbaeva A.A., Drobyshevskaya V.G., Sattarova G.Z., Kaliev M.T., Gubanova A.V., Zhimbaeva O.B., Razumovskaya A.P., Verbov V.N., Likhachev I.V., Krasnov A.V., Totolian A.A. SARS CoV 2 herd immunity of the Kyrgyz population in 2021. *Medical Microbiology and Immunology*, 2022. Vol. 211, no. 4, pp. 195-210.

20. Popova A.Yu., Totolian A.A. Methodology for assessing herd immunity to the SARS-CoV-2 virus in the context of the COVID-19 pandemic. *Russian Journal of Infection and Immunity*, 2021, Vol 11, no. 4, pp. 609-616. (In Russ.). doi: 10.15789/2220-7619-MFA-1770.

21. Popova A.Yu., Andreeva E.E., Babura E.A., Balakhonov S.V., Bashketova N.S., Bugorkova S.A., Bulanov M.V., Valeullina N.N., Goryaev D.V., Detkovskaya N.N., Ezhlova E.B., Zhimbaeva O.B., Zaitseva N.N., Zueva E.V., Ivanov V.A., Istorik O.A., Kovalchuk I.V., Kozlovskikh D.N., Kombarova S.Yu., Kurganova O.P., Lomovtsev A.E., Lukicheva L.A., Melnikova A.A., Mikailova O.M., Milichkina A.M., Noskov A.K., Noskova L.N., Oglezneva E.E., Osmolovskaya T.P., Patyashina M.A., Penkovskaya N.A., Petrova O.A., Razumovskaya A.P., Samoilo L.V., Stepanova T.F., Trotsenko O.E., Khamitova I.V., Totolian A.A. Peculiarities of SARS-CoV-2 nucleocapsid in children during the COVID-19 epidemic of 2020. *Pediatrics. Journal named after G. Speransky*, 2021, Vol. 100, no. 3, pp. 97-106. (In Russ.)

22. Popova A.Yu., Andreeva E.E., Babura E.A., Balakhonov S.V., Bashketova N.S., Bulanov M.V., Valeullina N.N., Goryaev D.V., Detkovskaya N.N., Ezhlova E.B., Zaitseva N.N., Istorik O.A., Kovalchuk I.V., Kozlovskikh D.N., Kombarova S.V., Kurganova O.P., Kuttyrev V.V., Lomovtsev A.E., Lukicheva L.A., Lyalina L.V., Melnikova A.A., Mikailova O.M., Noskov A.K., Noskova L.N., Oglezneva E.E., Osmolovskaya T.P., Patyashina M.A., Penkovskaya N.A., Samoilo L.V., Smirnov V.S., Stepanova T.F., Trotsenko O.E., Totolian A.A., Features of developing SARS-CoV-2 nucleocapsid protein population-based seroprevalence during the first wave of the COVID-19 epidemic in the Russian Federation. *Russian Journal of Infection and Immunity*, 2021. Vol. 11, no. 2, pp. 297-323. (In Russ.). doi: 10.15789/2220-7619-FOD-1684.

23. Popova A.Yu., Smirnov V.S., Ezhlova E.B., Melnikova A.A., Samoilo L.V., Lyalina L.V., Semyonova E.V., Gursky M.A., Aksenova E.A., Arbuzova T.V., Totolian A.A. Herd immunity to SARS-CoV-2 in the Novosibirsk Region population amid the COVID-19 pandemic. *Problems of Virology*, 2021, Vol. 66, no. 4, pp 299-309. (In Russ.)

24. Popova A.Yu., Smirnov V.S., Ezhlova E.B., Melnikova A.A., Trotsenko O.E., Kurganova O.P., Detkovskaya T.N., Lyalina L.V., Abbasova E.I., Yurgina O.M., Romanova O.B., Pyatyrova E.V., Burdinskaya E.N., Solokhin A.S., Bogdan E.V., Bazykina E.A., Totolian A.A. Herd immunity to SARS-CoV-2 in the population of the Southern regions of the Far East of Russia. *Acta Biomedica Scientifica*, 2021, Vol. 6, no. 5, pp. 253-273. (In Russ.)

25. Qi H., Xiao S., Shi R., Ward M.P., Chen Y., Tu W., Su Q., Wang W., Wang X., Zhang Z. COVID-19 transmission in Mainland China is associated with temperature and humidity: A time-series analysis. *Sci.Tot. Environ*, 2020, Vol. 728, 138778. doi: 10.1016/j.scitotenv.2020.138778.

26. Randolph H.E., Barreiro L.B. Herd Immunity: Understanding COVID-19. *Immunity*, 2020, Vol. 52, pp. 737-741.

27. Ross Business Consulting. Available at: <https://www.rbc.ru/society/03/07/2021/60e074ad9a79479afe3d257b> (Accessed 20/08/2022).

28. Rostami A., Sepidarkish M., Leeflang M.M.G., Riahi S.M., Shiadeh M.N., Esfandyari S., Mokdad A.H., Hotez P.J., Gasser R.B. SARS-CoV-2 seroprevalence worldwide: A systematic review and meta-analysis. *Clin. Microbiol. Infect.*, 2020, Vol. 27, pp. 331-340.

29. Ryzhikov A.B., Ryzhikov E.A., Bogryantseva M.P., Usova S.V., Danilenko E.D., Nechaeva E.A., Pyankov O.V., Pyankova O.G., Gudymo A.S., Bodnev S.A., Onkhonova G.S., Sleptsova E.S., Kuzubov V.I., Ryndyuk N.N., Ginko Z.I., Petrov V.N., Moiseeva A.A., Torzhkova P.Yu., Pyankov S.A., Tregubchak T.V., Antonec D.V., Gavrilova E.V., Maksyutov R.A. A single blind, placebo-controlled randomized study of the safety, reactogenicity and immunogenicity of the “EpiVacCorona” Vaccine for the prevention of COVID-19, in volunteers aged 18-60 years (phase I-II). *Russian Journal of Infection and Immunity*, 2021, Vol. 11, no 2, pp. 283-296. (In Russ.). doi: 10.15789/2220-7619-ASB-1699.

30. Sakurai F., Tachibana M., Mizuguchi H. Adenovirus vector-based vaccine for infectious diseases. *Drug Metab. Pharmacokinet.*, 2022, Vol. 42, 100432. doi: 10.1016/j.dmpk.2021.100432.

31. Smirnov V.S., Lyalina L.V., Milichkina A.M., Khamitova I.V., Zueva E.V., Ivanov V.A., Zaguzov V.S., Totolian A.A. Longitudinal Randomized Cohort Study of SARS-CoV-2 Antibody Seroprevalence in the St. Petersburg Population. *Viruses*, 2022, Vol. 14, no. 5, 913. doi: 10.3390/v14050913.

32. United Nations Department of Economic and Social Affairs. Available at: <https://countrymeters.info/ru/Tajikistan>. (Accessed 20/08/2022).
33. Wald A., Wolfowitz J. Confidence limits for continuous distribution functions. *Ann. Math. Stat.*, 1939, Vol. 10, no. 2, pp. 105-118.
34. WHO population-based age-stratified seroepidemiological investigation protocol for coronavirus 2019 (COVID-19) infection, version 2, 26.05.2020. Available at: <https://www.who.int/publications/i/item/WHO-2019-nCoV-Seroepidemiology-2020.2> Accessed 05/03/2022.
35. World bank. Statistic. Available at: <https://data.worldbank.org/country/tajikistan>. (Accessed 25/03/2022).

Авторы:

Попова А.Ю. — д.м.н., профессор, руководитель Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Москва, Россия

Смирнов В.С. — д.м.н., профессор, ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной иммунологии ФБУН «Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера», Санкт-Петербург, Россия

Егорова С.А. — д.м.н., заместитель директора по инновациям ФБУН «Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера», Санкт-Петербург, Россия

Абдуллозода Д.А. — д.м.н., профессор, министр здравоохранения и социальной защиты населения Республики Таджикистан, г. Душанбе, Республика Таджикистан

Рузиев М.М. — д.м.н., профессор, директор ГУ «Таджикский научно-исследовательский институт профилактической медицины» Министерства здравоохранения и социальной защиты населения Таджикистана, г. Душанбе, Республика Таджикистан

Миличкина А.М. — главный врач медицинского центра ФБУН «Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера», Санкт-Петербург, Россия

Иванов В.А. — IT-аналитик ФБУН «Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера», Санкт-Петербург, Россия

Authors:

Popova A. Yu., PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Federal Service for Supervision of Consumer Rights Protection and Human Welfare, Moscow, Russian Federation

Smirnov V.S., PhD, MD (Medicine), Professor, Leading Research Associate, Laboratory of Molecular Immunology, Saint Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation

Egorova S.A., PhD, MD (Medicine), Deputy Director for Innovation, Saint Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation

Abdullozoda J.A., PhD, MD (Medicine), Professor, Minister of Health and Social Protection of the Population of the Republic of Tajikistan, Dushanbe, Republic of Tajikistan

Ruziev M.M., PhD, MD (Medicine), Professor, Director, Tajik Research Institute of Preventive Medicine, Dushanbe, Republic of Tajikistan

Milichkina A.M., Chief Physician of the Medical Center, Saint Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation

Ivanov V.A., IT Analyst, Saint Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation

Вохидов С.Д. — начальник отдела эпидемиологического анализа и профилактики инфекционных заболеваний ГУ «Таджикский научно-исследовательский институт профилактической медицины» Министерства здравоохранения и социальной защиты населения Таджикистана, г. Душанбе, Республика Таджикистан

Yokhidov S.D., Head, Department of Epidemiological Analysis and Prevention of Communicable Diseases, Tajik Research Institute of Preventive Medicine, Dushanbe, Republic of Tajikistan

Рамзи Э.С. — научный аналитик ФБУН «Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера», Санкт-Петербург, Россия

Ramsay E.S., Science Analyst, Saint Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation

Муллоджанова М.М. — к.м.н., заведующая лабораторией гриппа ГУ «Таджикский научно-исследовательский институт профилактической медицины» Министерства здравоохранения и социальной защиты населения Таджикистана, г. Душанбе, Республика Таджикистан

Mullodzhanova M.M., PhD (Medicine), Head, Influenza Laboratory, Tajik Research Institute of Preventive Medicine, Dushanbe, Republic of Tajikistan

Дрозд И.В. — к.м.н., руководитель центральной клинико-диагностической лаборатории медицинского центра ФБУН «Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера», Санкт-Петербург, Россия

Drozd I.V., PhD (Medicine), Head, Central Clinical Diagnostic Laboratory, Medical Center, Saint Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation

Холова Б.Т. — заведующая лабораторией урогенитальных инфекций ГУ «Таджикский научно-исследовательский институт профилактической медицины» Министерства здравоохранения и социальной защиты населения Таджикистана, г. Душанбе, Республика Таджикистан

Kholova B.T., Head, Laboratory of Urogenital Infections, Tajik Research Institute of Preventive Medicine, Dushanbe, Republic of Tajikistan

Краснов А.А. — старший научный сотрудник ФБУН «Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера», Санкт-Петербург, Россия

Krasnov A.A., Senior Research Associate, Saint Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation

Джафаров Н.Д. — начальник Управления санитарно-эпидемиологической безопасности, чрезвычайных ситуаций и экстренной медицинской помощи Министерства здравоохранения и социальной защиты населения Республики Таджикистан, г. Душанбе, Республика Таджикистан

Jafarov N.D., Head, Department of Sanitary and Epidemiological Safety, Emergencies and Emergency Medical Assistance, Tajik Ministry of Health and Social Protection, Dushanbe, Republic of Tajikistan

Жимбаева О.Б. — врач центральной клинико-диагностической лаборатории медицинского центра ФБУН «Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера», Санкт-Петербург, Россия

Zhimbayeva O.B., Doctor of the Central Clinical Diagnostic Laboratory, Medical Center, Saint Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation

Губанова А.В. — врач клинической лабораторной диагностики центральной клинико-диагностической лаборатории медицинского центра ФБУН «Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера», Санкт-Петербург, Россия

Gubanova A.V., Doctor of Clinical Laboratory Diagnostics, Central Clinical Diagnostic Laboratory, Medical Center, Saint Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation

Разумовская А.П. — врач клинической лабораторной диагностики центральной клинико-диагностической лаборатории медицинского центра ФБУН «Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера», Санкт-Петербург, Россия

Razumovskaya A.P., Doctor of Clinical Laboratory Diagnostics, Central Clinical Diagnostic Laboratory, Medical Center, Saint Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation

Дробышевская В.Г. — врач клинической лабораторной диагностики центральной клинико-диагностической лаборатории медицинского центра ФБУН «Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера», Санкт-Петербург, Россия

Drobyshevskaya V.G., Doctor of Clinical Laboratory Diagnostics, Central Clinical Diagnostic Laboratory, Medical Center, Saint Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation

Тотolian Арег А. — д.м.н., профессор, академик РАН, директор ФБУН «Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера», Санкт-Петербург, Россия

Totolian Areg A., PhD, MD (Medicine), Professor, Full Member, Russian Academy of Sciences, Saint Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation

ДИНАМИКА IgG-АНТИТЕЛ ПРОТИВ RBD УЧАСТКА S-БЕЛКА SARS-CoV-2 ПОСЛЕ ВВЕДЕНИЯ CoronaVac: ДЛИТЕЛЬНОЕ НАБЛЮДЕНИЕ

**Фей Лиана, Сойлия Фертилита, Элла Амалия, Вени Ларасати,
Риана Сари Пуспита Расид, Эка Фебри Зулиссетина,
Рохан Саблоак, Закийя Ульфа Сари**

*Университет Шривиджая – Центральная больница общего профиля доктора Мохаммада Хусина,
г. Палембанг, Индонезия*

Резюме. Сообщений о титрах антител после введения CoronaVac по-прежнему мало, особенно когда речь идет об эффективности CoronaVac после вакцинации среди населения Индонезии. Целью данного исследования является определение эффективности вакцинации против COVID-19 путем сравнения уровней IgG против S1 субъединицы RBD SARS-CoV-2 после первой и второй вакцинации. Исследователи собрали образцы венозной крови у участников после того, как они получили вакцину CoronaVac 600 SU/0,5 мл с двумя разными интервалами (14 дней и 28 дней). Кровь брали дважды (после первой и второй вакцинации) и тестировали на антитела (значение положительного обнаружения антител 50 AU/мл). Парные данные были проанализированы с использованием критерия Уилкоксона (числового) или критерия Макнемара (категориального). Средние уровни IgG1 в 14-дневном интервале между дозами вакцины составляли 64,40 AU/мл, а уровни IgG2 составляли 886,10 AU/мл. При этом средний уровень IgG1 составил 146,10, а уровень IgG2 – 688,00 AU/мл в группе с 28-дневным интервалом между дозами вакцины. После первой вакцинации 60,00% обследованные имели положительный уровень IgG, который увеличился до 98,57% после второй вакцинации. После вакцинации полной дозой все участники имели достоверно более высокие уровни антител. Эффект был сильнее в группе, получавшей вакцину с 14-дневным интервалом. Также было показано, что CoronaVac увеличивает встречаемость антител у участников исследования.

Ключевые слова: антитело, условная единица, CoronaVac, рецептор-связывающий домен, SARS-CoV-2

Адрес для переписки:

*Фей Лиана
Университет Шривиджая – Центральная больница
общего профиля доктора Мохаммада Хусина
30126, Палембанг, Южная Суматера, Индонезия.
Тел.: +62 711 373438.
Факс: +62 711 373438.
E-mail: pheyliana@fk.unsri.ac.id*

Address for correspondence:

*Phey Liana
Department of Clinical Pathology, Faculty of Medicine,
Sriwijaya University – Dr. Mohammad Hoesin General Hospital
Palembang
South Sumatera
30126 Indonesia
Phone: +62 711 373438.
Fax: +62 711 373438.
E-mail: pheyliana@fk.unsri.ac.id*

Образец цитирования:

*Фей Лиана, Фертилита Сойлия, Элла Амалия, Вени Ларасати, Риана Сари Пуспита Расид, Эка Фебри Зулиссетина, Рохан Саблоак, Закийя Ульфа Сари «Динамика IgG-антител против RBD участка S-белка SARS-CoV-2 после введения CoronaVac: длительное наблюдение» // Медицинская иммунология, 2023. Т. 25, № 1. С. 215-222. doi: 10.15789/1563-0625-ASC-2553
© Фей Лиана и соавт., 2023
Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0*

For citation:

*Phey Liana, Soilia Fertilita, Ella Amalia, Veny Larasati, Riana Sari Puspita Rasyid, Eka Febri Zulissetiana, Rohan Sabloak Zakiiyah Ulfa Sari “Anti-SARS-CoV-2 spike receptor binding domain (S-RBD) IgG antibodies following CoronaVac administration: a longitudinal study. Anti-SARS-CoV-2 S-RBD IgG antibodies”, Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2023, Vol. 25, no. 1, pp. 215-222. doi: 10.15789/1563-0625-ASC-2553
© Phey Liana et al., 2023
The article can be used under the Creative Commons Attribution 4.0 License
DOI: 10.15789/1563-0625-ASC-2553*

ANTI-SARS-CoV-2 SPIKE RECEPTOR BINDING DOMAIN (S-RBD) IgG ANTIBODIES FOLLOWING CoronaVac ADMINISTRATION: A LONGITUDINAL STUDY.

ANTI-SARS-CoV-2 S-RBD IgG ANTIBODIES

Phey Liana, Soilia Fertilita, Ella Amalia, Veny Larasati, Riana Sari Puspita Rasyid, Eka Febri Zulissetiana, Rohan Sabloak, Zakiyyah Ulfa Sari

Sriwijaya University – Dr. Mohammad Hoesin General Hospital, Palembang, Indonesia

Abstract. Reports on antibody titers following CoronaVac administration are still scarce, particularly when it comes to the post-vaccination effectiveness of CoronaVac in the Indonesian population. The purpose of this study is to determine the efficacy of COVID-19 vaccination by comparing the IgG levels against the S1 subunit of SARS-CoV-2 RBD after the first and second vaccinations. The researchers collected venous blood samples from participants after they received the CoronaVac 600 SU/0.5 mL vaccine at two different intervals (14 days and 28 days). Blood was drawn twice (after the first and second vaccinations) and tested for antibodies (positive antibody detection value of 50 AU/mL). Paired data were analyzed by using either the Wilcoxon test (numerical) or the McNemar test (categorical). The median IgG1 levels in the 14-day interval between vaccine doses were 64.40 AU/mL and IgG2 levels were 886.10 AU/mL. Meanwhile, the median IgG1 level was 146.10, and IgG2 level was 688.00 AU/mL in the group with a 28-day interval between vaccine doses. After the first vaccination, 60.00 % of study subjects had positive IgG levels, which increased to 98.57% after the second vaccination. Following the full-dose vaccination, all participants had higher antibody levels, and considered significant. The effect was stronger in the group that received the vaccine at 14-day intervals. CoronaVac has also been shown to increase the prevalence of detectable antibody positivity in study participants.

Keywords: antibody, arbitrary unit (AU), CoronaVac, receptor binding domain, SARS-CoV-2

This study was supported by the funding from Sriwijaya University Faculty of Medicine (grant number: 0330/UN9.FK/TU.SK/2021).

Introduction

The SARS-CoV-2 infection has emerged as an issue globally with its serious pathogenicity and contagious potential. It is based on the presence of virus transmission from asymptomatic and presymptomatic individuals. Hence, various efforts are made to control and prevent infection, including vaccination. The development of a vaccine is implemented quickly which aims to avoid infection and prevent symptoms of COVID-19, thus reducing harmful consequences [18].

The main strategy employed in various COVID-19 vaccine candidates is to create vaccines capable of inducing antibodies against the receptor-binding domain (RBD) [13]. As widely known, SARS-CoV-2 has a spike protein (S) on its surface. The viral S

protein will attach to its receptor on the host surface of the cell, Angiotensin-Converting Enzyme 2 (ACE-2). This attachment process depends on a domain of the S protein known as the RBD. The main immune pathway for preventing infection is to restrict viral binding to ACE-2 [18].

Some vaccines have been developed rapidly, with varying mechanisms of action. These include nucleic acid (RNA and DNA) vaccines, viral vector (replicating or non-replicating) vaccines, inactivated viral vaccines, protein subunit vaccines, virus-like particle vaccines, live attenuated vaccines, lentiviral vector-modified artificial antigen-presenting cells (APCs), and dendritic cell vaccines [5, 10, 17]. The non-replicating viral vector-based (24%) and RNA-based (20%) vaccines are two of the most widely developed vaccine forms [17]. Some vaccines have received emergency use authorization (EUA), an approval that allows them to be used in the general population [9].

Since early 2021, governments in several countries, including Indonesia, have launched a COVID-19 vaccination campaign to combat the disease's spread. COVID-19 vaccines of various types, including mRNA and inactivated vaccines, are used. However, reports on post-vaccination antibody levels need to be expanded. This is due to the wide variability of immune responses to SARS-CoV-2 following the vaccination [14].

The inactivated vaccine (CoronaVac) manufactured by Sinovac is the most commonly used SARS-CoV-2 vaccine in Indonesia [15]. This vaccine is administered intramuscularly in two doses of 0.5 mL each. The interval between each dose is four weeks [21]. From early November 2021, this vaccine is approved for children aged 6 to 11 years [4].

The immune response to vaccines is influenced by a variety of factors, including vaccination program quality (type of vaccine, age of recipients, the interval between doses, vaccine potency, formulation and stability, vaccine administration and vaccination schedule), host-related factors (age, gender, genetic factors, smoking, and nutrition), and environmental factors [6]. One method for determining the immune response to vaccines is to evaluate the level of antibodies formed after vaccination. Antibodies produced as a result of vaccination can be IgM at first, then IgG, and finally IgA. IgG is known to have good affinity and neutrality against antigens among these antibody classes, making it reliable for detecting immune response and vaccine effectiveness following COVID-19 vaccination [12].

Reports on antibody titers following CoronaVac administration are still scarce, particularly when it comes to the post-vaccination effectiveness of CoronaVac in the Indonesian population [20]. The efficacy of COVID-19 vaccination, particularly the inactivated vaccine type, is still being studied, particularly in terms of a sufficient antibody titer threshold to stimulate a protective effect. The purpose of this study is to determine the efficacy of COVID-19 vaccination by comparing the IgG levels against the s1 subunit of SARS-CoV-2 RBD after the first and second vaccinations.

Materials and methods

Study overview

We collected data in two instances: through questionnaires and blood testing. The questionnaire includes sociodemographic information and history of confirmed COVID-19 cases (for exclusion of participants who have been contracted with COVID-19). Venous blood samples were obtained to determine post-vaccination immunoglobulin G (IgG) levels after receiving CoronaVac 600 SU/0.5 mL (Sinovac Life Sciences, Beijing, China) with two

different dosing interval (14 days and 28 days). Sample collection was done between March to June 2021. This study was approved by the Institutional Review Board of Faculty of Medicine, Universitas Sriwijaya (approval number: 062-2021).

Blood collection and antibody examination

The blood sampling steps were repeated twice, with 3 cc of blood obtained (from the median cubital vein) for each sample collection (13-14 days after the first dose of vaccination and 30 ± 2 days after the second dose of vaccination). Blood samples were placed in non-anticoagulant tubes to obtain the serum to be examined.

IgG concentrations were assessed utilizing Abbott SARS-CoV-2 IgG II Quant assay (from 75 μ L of serum sample). The Architect TM i2000 analyzer (Abbott) then analyzed it using the Chemiluminescent Microparticle Immunoassay (CMIA) method. When the antibody titer level reached 50 arbitrary units per milliliter (AU/mL), the result was considered reactive. Meanwhile, a value of < 50 AU/mL is defined as non-reactive [2]. Calibration was performed before each test. The IgG evaluation for SARS-CoV-2 RBS subunit s1 was performed in the Clinical Pathology Laboratory of Mohammad Hoesin Hospital.

Statistical analysis

The data was analyzed using the IBM SPSS Statistics for Windows, Version 24.0 program (Armonk, NY: IBM Corp.). The characteristics of the research subjects were displayed in the form of a frequency distribution table, including the concentration and dispersion calculations (maximum, minimum, mean, median, and standard deviation values). Differences in first and second IgG levels were analyzed using the paired T-test for data with a normal distribution or the Wilcoxon test for data with an abnormal distribution (numerical variable). Meanwhile, for the categorical variable, McNemar test was conducted. The threshold of significance was set at $p < 0.05$.

Results

This study included 70 people who had received a complete COVID-19 vaccination (2 doses) with the CoronaVac vaccine. Health workers, public-sector employees, and the elderly were among the research participants. Table 1 displays demographic information about the participants.

Table 1 shows that the majority of the participants were between the ages of 26 to 45. The subjects in the study ranged in age from 20 to 68 years old, with an average age of 35.63 years (median: 35 years). The number of male and female participants was almost equitably spread. In terms of vaccine intervals, the majority of study subjects (61.43%) had vaccine intervals of 28 days.

TABLE 1. SUBJECT CHARACTERISTICS

Variabel	Median ± IQR	Mean ± SD	n	%
Age (years)	35.00±23.00	35.63±13.91		
Age (14-days interval)	21.00±1.00	23.07±5.34		
Age (28-days interval)	42.00±21.00	43.51±11.63		
Age group (years)				
18-25			25	35.71
26-45			29	41.43
46-65			14	20.00
≥ 65			2	2.86
Gender				
Male	–	–	33	47.14
Female	–	–	37	52.86
First and second vaccination interval				
14 days	–	–	27	38.57
28 days	–	–	43	61.43

Note. IQR, Interquartile range; SD, Standard deviation.

TABLE 2. ANTIBODY RESPONSE ASSESSMENT

Variable	After 1 st dose	After 2 nd dose
Positive (%)	42 (60.00%)	69 (98.57%)
Negative (%)	28 (40.00%)	1 (1.43%)
Elevated antibody (%)	70 (100.00%)	

TABLE 3. ANTIBODY LEVELS FOLLOWING THE VACCINATION WITH CoronaVac

Variable	After 1 st dose	After 2 nd dose	p value
Serum sample			
Antibody (+)			
28 days interval	28 (65.1%)	42 (97.7%)	1.000 ^a
14 days interval	14 (51.9%)	27 (100.0%)	
Antibody level			
28 days interval	146.10±845.00 AU/mL	688.00±1157.80 AU/mL	0.036 ^b
14 days interval	64.40±759.90 AU/mL	886.100±683.40 AU/mL	< 0.001 ^b
Total	88.60±759.90 AU/mL	766.15±968.32 AU/mL	< 0.001 ^b

Note. Data were presented Median ± Interquartile Range (IQR). Statistical analysis was done using the (a) McNemar and (b) Wilcoxon test, p < 0.05.

We observed the clinical effect of CoronaVac vaccination on participant antibody formation. All participants had elevated antibody counts from the first to the second vaccination, with only one subject (1.43%) having undetectable antibody levels despite being fully vaccinated. Table 2 contains the specifics. Table 2 contains the specific details.

Regarding the clinical implication, we examined the vaccine's efficacy based on dosing intervals (14-days or 28-days). Following the full dose, we discovered that both types of vaccines were able to raise antibody levels, resulting in a positively-detected quantity of antibodies (≥ 50 AU/mL). We also discovered that the elevation of antibody amount between the first and second doses was significant in both dosing, but it appears to be more significant in the group that received the full dose within 14 days of the interval ($p < 0.001$ vs $p = 0.036$). The same result was obtained when the analysis was performed without regard for the respective dosing interval group ($p < 0.001$). Table 3 contains more information on these findings.

Discussion

COVID-19 vaccination using various vaccine types has been implemented globally to counter the effects of the pandemic. Vaccination is effective in preventing serious disease manifestation, hospitalization, and mortality [1, 7]. This study included 70 people who had received a full COVID-19 vaccination (2 doses) with the CoronaVac vaccine, with either a 14-day or a 28-day dosing interval.

According to the findings of this study, approximately 60% of the participants had positive IgG levels after the first vaccination, whilst almost all of the participants had positive IgG amounts after the second vaccination. These findings are similar to those of Binay et al. who found that 100% of participants had positive IgG levels after receiving two doses of the CoronaVac vaccine [3]. Meanwhile, Bayram et al. found that after CoronaVac vaccination, IgG was found to be positive in 77.8% of participants after the first vaccination and 99.6% of subjects after the second vaccination [2].

The IgG assessment after the first and second vaccinations was found to be highly variable in this study, and mainly explained as the effect of heterogenous individual immune response [11]. The median IgG1 (first dose) level was 64.40 AU/mL and the IgG2 (second dose) level was 886.10 AU/mL in the 14-day dosing interval. Meanwhile, the median IgG1 level for the group with a 28-day dosing interval was 146.10 AU/mL, and the IgG2 level was 688.00 AU/mL. Conversely, in phase 1/2 trials conducted by Zhang et al. with participants aged 18-59 years, they discovered that subjects who had a 28-day interval between CoronaVac vaccine doses

had higher antibody levels than those with a 14-day interval [22]. However, a Turkish study found that vaccine effectiveness (as measured by seroconversion rates) did not differ significantly between vaccine schedules (14-day or 28-day intervals) [19].

The differences identified in this research may be explained by the age differences between the study subjects in both interval groups. The 14-day vaccine interval group was significantly younger than the 28-day vaccine interval group (median: 21.00 years vs 42.00 years). Previous research on the use of the CoronaVac vaccine has described this age-related phenomenon, with older age being associated with lesser immune response, lower maximum antibody levels, and faster antibody decline [16]. Other potential reasons for this finding are related to immunodominance. Immunodominance is an immunological condition in which immune responses are directed against only a subset of the antigenic peptides formed. Previous research has discovered at least six immunodominant epitopes that differ from the previously identified immune response (reflected as specific antibodies production) and can alter vaccination efficacy [8]. However, no specific explanation regarding the influence of age (mean or median value) and vaccination interval which has been described in previous study [22].

Our study had a higher median SARS-CoV-2 anti-spike IgG2 value (following two CoronaVac 766.15 AU/mL vs 547.7 AU/mL) than Keskin et al. (766.15 AU/mL vs 547.7 AU/mL). However, no specific dosing intervals were mentioned in the comparison study [8]. Meanwhile, we measured the IgG2 level one month after the second dose of vaccination. Some important factors causing these differences (as observed in several studies) include the length of follow-up and country-level experience with inactivated virus vaccines [21].

Our research has several limitations. Mainly, it is related to the small sample size used in this study. Then, due to the government vaccination regulation of CoronaVac, which follows a 4 week (28 day) interval between vaccine doses, no additional participants with a 14-day interval can be included. Our analyses were affected by the absence of more refined covariates such as chronic illness (comorbidities) which could influence vaccine effectiveness.

Conclusion

CoronaVac administration at both dosing intervals (14-days and 28-days) is effective in enhancing antibody levels ($p < 0.05$). The effect appears to be prominent in the 14-day dosing interval group. Our study also discovered that 60.00% of participants have positive IgG levels (≥ 50 AU/mL) after the first vaccine dose, and this number rises to 98.57% after

the second vaccination. Future studies with larger samples and correlating the results with genetic factors of participants due to interpersonal immune variability can be proposed. Further comparison with similar research, particularly in the Indonesian population, is required for improved overall validity.

In addition, due to contradictory results with the established protocols (longer interval gives a better level of detected antibody), it is suggested to assess total antibody and antibody against different inductors (such as protein N) in forthcoming studies.

References

1. Akpolat T., Uzun O. Reduced mortality rate after coronavac vaccine among healthcare workers. *J. Infect.*, 2021, Vol. 83, no. 2, pp. e20-e21.
2. Bayram A., Demirbakan H., Karadeniz P.G., Erdoğan M., Koçer I. Quantitation of antibodies against SARS-CoV-2 spike protein after two doses of CoronaVac in health care workers. *J. Med. Virol.*, 2021, Vol. 93, no. 9, pp. 5560-5567.
3. Binay U.D., Karakeçili F., Binali E., Barkay O., Gul O., Mertoglu C. Level of SARS-CoV-2 IgG antibodies after two doses CoronaVac vaccine: Primarily report. *J. Antivir. Antiretrovir.*, 2021, Vol. 13, no. S18, 005. doi: 10.21203/rs.3.rs-388073/v2.
4. Cabinet Secretariat of the Republic of Indonesia. (2021) BPOM allows use of sinovac vaccine for children aged 6-11. [Cited 8 December 2021]. Available from: <https://setkab.go.id/en/bpom-allows-use-of-sinovac-vaccine-for-children-aged-6-11/>.
5. Calina D., Docea A.O., Petrakis D., Egorov A.M., Ishmukhametov A.A., Gabibov A.G. Towards effective COVID19 vaccines: Updates, perspectives and challenges. *Int. J. Mol. Med.*, 2020, Vol. 46, no. 1, pp. 3-16.
6. Ganji K.S., Mohammadzadeh I., Mohammadnia-Afrouzi M., Ebrahimpour S., Shahbazi M. Factors affecting immune responses to vaccines. *Gazz Medica Ital Arch per le Sci Mediche*, 2018, Vol. 177, no. 5, pp. 219-228.
7. Jara A., Undurraga E.A., González C., Paredes F., Fontecilla T., Jara G. Effectiveness of an inactivated SARS-CoV-2 vaccine in Chile. *N. Engl. J. Med.*, 2021, Vol. 385, no. 10, pp. 875-884.
8. Keskin A.U., Bolukcu S., Ciragil P., Topkaya A.E. SARS-CoV-2 specific antibody responses after third CoronaVac or BNT162b2 vaccine following two-dose CoronaVac vaccine regimen. *J. Med. Virol.*, 2022, Vol. 94, no. 1, pp. 39-41.
9. Krause P.R., Gruber M.F. Emergency use authorization of Covid vaccines – safety and efficacy follow-up considerations. *N. Engl. J. Med.*, 2020, Vol. 383, no. 19, e107. doi: 10.1056/NEJMp2031373.
10. Kyriakidis N.C., López-Cortés A., González E.V., Grimaldos A.B., Prado E.O. SARS-CoV-2 vaccines strategies: a comprehensive review of phase 3 candidates. *NPJ Vaccines*, 2021, Vol. 6, no. 1, 28. doi: 10.1038/s41541-021-00292-w.
11. Lippi G., Henry B.M., Plebani M. Anti-SARS-CoV-2 Antibodies testing in recipients of COVID-19 vaccination: why, when, and how? *Diagnostics*, 2021, Vol. 11, no. 6, 941. doi: 10.3390/diagnostics11060941.
12. Melgoza-González E.A., Hinojosa-Trujillo D., Reséndiz-Sandoval M., Mata-Haro V., Hernández-Valenzuela S., García-Vega M., Bravo-Parra M., Arvizu-Flores A.A., Valenzuela O., Velázquez E., Soto-Gaxiola A., Gómez-Meza M.B., Pérez-Jacobo F., Villela L., Hernández J. Analysis of IgG, IgA and IgM antibodies against SARS-CoV-2 spike protein S1 in convalescent and vaccinated patients with the Pfizer-BioNTech and CanSinoBio vaccines. *Transbound. Emerg. Dis.*, 2021. doi: 10.1111/tbed.14344.
13. Min L., Sun Q. Antibodies and Vaccines Target RBD of SARS-CoV-2. *Front. Mol. Biosci.*, 2021, Vol. 8, 671633. doi: 10.3389/fmolb.2021.671633.
14. Munro C. Covid-19: 40% of patients with weakened immune system mount lower response to vaccines. *BMJ*, 2021, Vol. 374, n2098. doi: 10.1136/bmj.n2098.
15. Nugraha R.R., Miranda A.V., Ahmadi A., Lucero-Prisno D.E. Accelerating Indonesian COVID-19 vaccination rollout: a critical task amid the second wave. *Trop. Med. Health*, 2021, Vol. 49, no. 1, 76. doi: 10.1186/s41182-021-00367-3.
16. Ranzani O.T., Hitchings M.D.T., Dorion M., D'Agostini T.L., de Paula R.C., de Paula O.F.P. Effectiveness of the CoronaVac vaccine in older adults during a gamma variant associated epidemic of covid-19 in Brazil: test negative case-control study. *BMJ*, 2021, Vol. 374, n2015. doi: 10.1136/bmj.n2015.
17. Rego G.N.A., Nucci M.P., Alves A.H., Oliveira F.A., Marti L.C., Nucci L.P. Current clinical trials protocols and the global effort for immunization against SARS-CoV-2. *Vaccines*, 2020, Vol. 8, no. 3, 474. doi: 10.3390/vaccines8030474.
18. Speiser D.E., Bachmann M.F. Covid-19: Mechanisms of vaccination and immunity. *Vaccines*, 2020, Vol. 8, no. 3, 404. doi: 10.3390/vaccines8030404.

19. Tanriover M.D., Doğanay H.L., Akova M., Güner H.R., Azap A., Akhan S. Efficacy and safety of an inactivated whole-virion SARS-CoV-2 vaccine (CoronaVac): interim results of a double-blind, randomised, placebo-controlled, phase 3 trial in Turkey. *Lancet*, 2021, Vol. 398, no. 10296, pp. 213-222.
20. Ulhaq Z.S., Soraya G.V., Indriana K., Devitasari R., Pradiptha I.P.Y., Zulfikar D.B., Uxiana V., Zulkarnain, Rachma L.N., Arisanti D. The level of Ig anti-RBD SARS-CoV-2 after two doses of CoronaVac vaccine. *J. Med. Virol.*, 2022, Vol. 94, no. 3, pp. 829-832.
21. Wilder-Smith A., Mulholland K. Effectiveness of an Inactivated SARS-CoV-2 Vaccine. *N. Engl. J. Med.*, 2021, Vol. 385, pp. 946-948.
22. Zhang Y., Zeng G., Pan H., Li C., Hu Y., Chu K. Safety, tolerability, and immunogenicity of an inactivated SARS-CoV-2 vaccine in healthy adults aged 18-59 years: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 1/2 clinical trial. *Lancet Infect. Dis.*, 2021, Vol. 21, no. 2, pp. 181-192.

Авторы:

Фей Лиана – заведующая кафедрой клинической патологии, медицинский факультет, Университет Шривиджая – Центральная больница общего профиля доктора Мохаммада Хусина, г. Палембанг, Индонезия

Сойлия Фертилита – преподаватель кафедры гистологии, медицинский факультет, Университет Шривиджая – Центральная больница общего профиля доктора Мохаммада Хусина, г. Палембанг, Индонезия

Элла Амалия – преподаватель, заведующая кафедрой микробиологии, медицинский факультет, Университет Шривиджая – Центральная больница общего профиля доктора Мохаммада Хусина, г. Палембанг, Индонезия

Authors:

Phey Liana, MD, PhD student in Biomedical Science Program, Faculty of Medicine, Sriwijaya University, Palembang, Indonesia, Clinical Pathologist graduated from the Faculty of Medicine, University of Indonesia, Jakarta; Head, Department of Clinical Pathology, Faculty of Medicine, Sriwijaya University – Dr. Mohammad Hoesin General Hospital, Palembang, Indonesia

Soilia Fertilita, MD, Magister in Immunology from Postgraduate Program, Universitas Airlangga, Surabaya; Lecturer in the Department of Histology, Faculty of Medicine, Department of Histology, Faculty of Medicine, Sriwijaya University – Dr. Mohammad Hoesin General Hospital, Palembang, Indonesia

Ella Amalia, MD, Magister in Biomedical Science from Postgraduate Program, Head of Department of Microbiology and Lecturer, Faculty of Medicine, Sriwijaya University – Dr. Mohammad Hoesin General Hospital, Palembang, Indonesia

Вени Ларасати — преподаватель, заведующая кафедрой гистологии, медицинский факультет, Университет Шривиджая — Центральная больница общего профиля доктора Мохаммада Хусина, г. Палембанг, Индонезия

Риана Сари Пуспита Расид — преподаватель кафедры гистологии, медицинский факультет, Университет Шривиджая — Центральная больница общего профиля доктора Мохаммада Хусина, г. Палембанг, Индонезия

Эка Фебри Зулиссетина — преподаватель кафедры физиологии, медицинский факультет, Университет Шривиджая — Центральная больница общего профиля доктора Мохаммада Хусина, г. Палембанг, Индонезия

Рохан Саблоак — студент медицинского факультета, Университет Шривиджая — Центральная больница общего профиля доктора Мохаммада Хусина, г. Палембанг, Индонезия

Закийя Ульфа Сари — студент медицинского факультета, Университет Шривиджая — Центральная больница общего профиля доктора Мохаммада Хусина, г. Палембанг, Индонезия

Veny Larasati, MD, Magister in Biomedical Science from Postgraduate Program, Universitas Udayana, Bali; Head of Department of Histology and Lecturer, Faculty of Medicine, Sriwijaya University — Dr. Mohammad Hoesin General Hospital, Palembang, Indonesia

Riana Sari Puspita Rasyid, MD, Magister in Biomedical Science from Postgraduate Program, Lecturer in the Department of Histology, Faculty of Medicine, Sriwijaya University — Dr. Mohammad Hoesin General Hospital, Palembang, Indonesia

Eka Febri Zulissetiana, MD, Magister in Biomedical Science from Postgraduate Program, Lecturer in The Department of Physiology, Faculty of Medicine, Sriwijaya University — Dr. Mohammad Hoesin General Hospital, Palembang, Indonesia

Rohan Sabloak, Undergraduate Medical Student, Faculty of Medicine, Sriwijaya University — Dr. Mohammad Hoesin General Hospital, Palembang, Indonesia

Zakiyyah Ulfa Sari, Undergraduate Medical Student, Faculty of Medicine, Sriwijaya University — Dr. Mohammad Hoesin General Hospital, Palembang, Indonesia

Поступила 16.07.2022
Принята к печати 20.08.2022

Received 16.07.2022
Accepted 20.08.2022

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

Абдуллозода Д.А.	193	Комкова М.В.	101	Разумовская А.П.	193
Агарков Н.М.	127	Коновалова М.В.	155	Рамзи Э.С.	193
Александрова Е.В.	167	Кравченко Л.В.	101	Риана Сари Пуспита Расид	215
Андреева В.О.	101	Краснов А.А.	193	Ровда Ю.И.	59, 69
Артамонов А.А.	167	Криворучко А.Б.	167	Рохан Саблоак	215
Бебяков А.М.	135	Крукиер И.И.	101	Рузиев М.М.	193
Бейкин Я.Б.	111	Лагерева Ю.Г.	111	Рукина Н.Ю.	91
Ведерникова А.В.	59, 69	Лев И.В.	127	Садьков В.Ф.	155
Вени Ларасати	215	Левкович М.А.	101	Саидов М.З.	7
Воропай А.А.	101	Лобыкина А.А.	59, 69	Сайтгалина М.А.	135
Вохидов С.Д.	193	Лыков А.П.	81	Сапожников Ю.А.	91
Галкина Г.А.	101	Ляшенко Ю.И.	167	Свиршевская Е.В.	155
Геворгиз Р.Г.	81	Мальцев О.В.	167	Смирнов В.С.	193
Голомидов А.В.	69	Масалов Е.Б.	167	Сойлия Фертилита	215
Губанова А.В.	193	Мелконян Г.Г.	91	Соловьева А.С.	91
Денисова А.Р.	135	Мешкова М.Е.	167	Сохарев В.В.	69
Джафаров Н.Д.	193	Миличкина А.М.	193	Ташкинов Н.В.	91
Дробышевская В.Г.	193	Минаева Л.В.	167	Тотоян Арег А.	135, 193
Дрозд И.В.	193	Миняйлова Н.Н.	59, 69	Труфанова А.А.	181
Егорова С.А.	193	Морозова Н.В.	101	Уваров П.И.	81
Жданов К.В.	167	Муллоджанова М.М.	193	Фей Лиана	215
Железнова С.Н.	81	Никитин Ю.В.	167	Филиппенко А.В.	181
Жимбаева О.Б.	193	Носков А.К.	181	Халивопуло И.К.	59
Закий Ульфа Сари	215	Омельченко Н.Д.	181	Холова Б.Т.	193
Зинчук С.Ф.	59, 69	Останкова Ю.В.	135	Чемисова О.С.	181
Иванов А.М.	167	Печникова Н.А.	135	Шабалдин А.В.	59, 69
Иванов В.А.	193	Пичугова С.В.	111	Шмакова О.В.	59, 69
Иванов К.С.	167	Погорелова Т.Н.	101	Шокур О.А.	91
Иванова И.А.	181	Подчерняева Н.С.	135	Эка Фебри Зулиссетина	215
Коваль А.Н.	91	Полтавцева Р.А.	155	Элла Амалиа	215
Козлов В.А.	39	Попова А.Ю.	193		
Козлов К.В.	167	Пырегов А.В.	155		

ПРЕДМЕТНЫЙ УКАЗАТЕЛЬ

абсцессы	92	иммунодефицитные состояния	60	провоспалительные цитокины	168
активированные лимфоциты	168	искусственные заболевания		протоочная цитометрия	156, 168
анализ <i>in silico</i>	136	мягких тканей	92	ранняя диагностика	102
антитело	215	клетки-супрессоры	39	ревматические болезни	7
апоптоз	156	клеточный иммунитет	168	Республика Таджикистан	194
аутореактивность	7	коллективный иммунитет	194	рецептор-связывающий домен	215
бессимптомное течение	194	корреляционные связи	128	сахарный диабет	102, 128
биоинформатические технологии	136	лимфоциты периферической		слезная жидкость	128
В-лимфоциты памяти	182	крови	156	соматотропин	70
вакцинация	194	миграция Т-клеток	39	спленоциты	81
вакцины	182	микроводоросли	81	тимоциты	81
варикоцеле	112	микрососудистые осложнения	102	тимус	39, 60, 70
вилочковая железа	60, 70	население	194	тимэктомия	60
вирусная нагрузка	168	наследственный ангиоотек	136	условная единица	215
воспаление	7, 112	негативная селекция	39	флегмона	92
воспалительные цитокины	92	нейроэндокринная система	70	хемокины	128
врожденный иммунитет	7	оксид азота	81	цитокины	81, 102, 112
ген <i>HS3ST6</i>	136	патогенетически значимые		экспрессия CD45	156
гибель клеток	7	мутации	136	эндотелиальная дисфункция	112
гормон роста	70	первичные иммунодефициты	136	эндотелий	156
гуморальный иммунитет	182	подростки	102, 112	CoronaVac	215
дети	60, 70	пожилые	128	COVID-19	156, 168, 194
диабетическая ретинопатия	128	полимеразная цепная реакция	168	DAMPs	7
иммунные нарушения	102	полиморфизм	136	PRR-рецепторы	7
иммуноглобулины	182	популяции В-лимфоцитов	182	SARS-CoV-2	168, 182, 194, 215



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

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

**ДНИ ИММУНОЛОГИИ
В САНКТ-ПЕТЕРБУРГЕ**

5 – 8 июня 2023 года

Основные даты:

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

ОРГАНИЗАТОРЫ ФОРУМА:

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

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

КОНТАКТЫ:

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

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

АДРЕС ДЛЯ КОРРЕСПОНДЕНЦИИ:
197101, Санкт-Петербург, а/я 130,
СПб РО РААКИ

www.immundays.spbraaci.ru



**ПОДПИСНОЙ ИНДЕКС:
УРАЛ-ПРЕСС – 42311**

ISSN 1563-0625



9 771563 062002 >