

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

Том 25, № 6. С. 1271-1466

2023

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

МЕДИЦИНСКАЯ ИММУНОЛОГИЯ

ИЛЛЮСТРАЦИИ К СТАТЬЕ «СОПОСТАВЛЕНИЕ РАЗНЫХ МЕТОДОВ ОЦЕНКИ КЛЕТОЧНОГО ИММУНИТЕТА К ВИРУСУ SARS-CoV-2» (АВТОРЫ: АФРИДОНОВА З.Э., ТОПТЫГИНА А.П., БОГОЛЮБОВА А.В., СЕМИКИНА Е.Л. [с. 1431-1440])

ILLUSTRATIONS FOR THE ARTICLE "COMPARISON OF DIFFERENT TECHNIQUES FOR EVALUATION OF CELLULAR IMMUNITY TO SARS-CoV-2 VIRUS" (AUTHORS: AFRIDONOVA Z.E., TOPTYGINA A.P., BOGOLYUBOVA A.V., SEMIKINA E.L. [pp. 1431-1440])

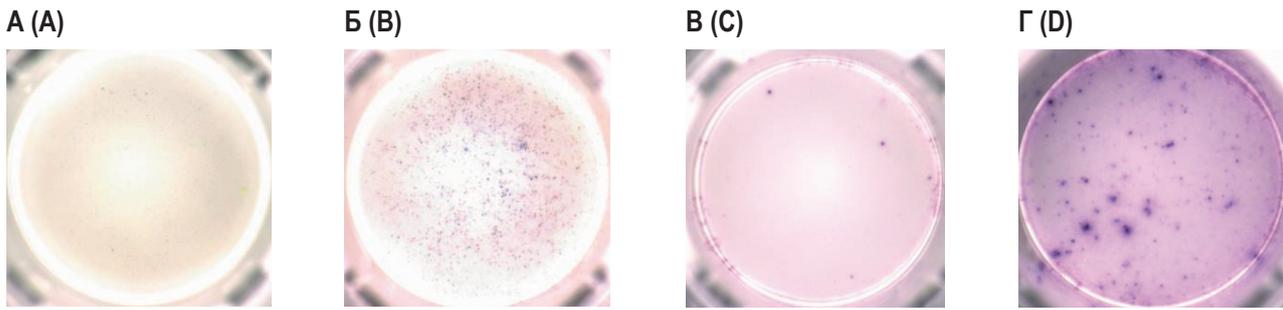


Рисунок 2. Пример исследования клеточного иммунитета методом ELISpot

Примечание. А – спонтанный уровень на тест-системе Human IFN- γ ELISpot. Б – антиген-индуцированный уровень на тест-системе Human IFN- γ ELISpot. В – спонтанный уровень на тест-системе Corona-T-test. Г – антиген-индуцированный уровень на тест-системе Corona-T-test.

Figure 2. Example of cellular immunity study using the ELISpot method

Note. A, spontaneous level on the kit "Human IFN- γ ELISpot". B, antigen-induced level on the kit "Human IFN- γ ELISpot". C, spontaneous level on the kit "Corona-T-test". D, antigen-induced level on the kit "Corona-T-test".

ИЛЛЮСТРАЦИИ К СТАТЬЕ «ОСОБЕННОСТИ ПРЕАНАЛИТИЧЕСКОГО ЭТАПА ПРИ КОЛИЧЕСТВЕННОМ ОПРЕДЕЛЕНИИ ТREC/KREC В ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ» (АВТОРЫ: САЙТГАЛИНА М.А., ОСТАНКОВА Ю.В., СЕДЫХ А.В., ТОТОЛЯН АРЕГ А. [с. 1441-1452])

ILLUSTRATIONS FOR THE ARTICLE "FEATURES OF THE PRE-ANALYTICAL STAGE IN QUANTITATIVE DETERMINATION OF TREC/KREC IN PERIPHERAL BLOOD" (AUTHORS: SAITGALINA M.A., OSTANKOVA YU.V., SEDYKH A.V., TOTOLIAN AREG A. [pp. 1441-1452])

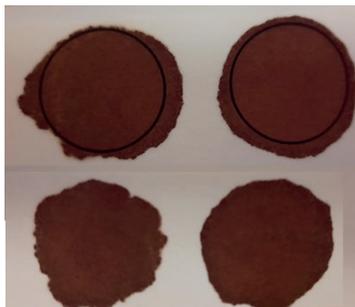


Рисунок 1. Правильно взятый материал

Примечание. Пятна крови нанесены равномерно, бумага пропитана с обеих сторон, поверхность не повреждена.

Figure 1. Correctly collected material

Note. Dried blood spots are applied evenly, the paper is soaked on both sides, the surface is not damaged.

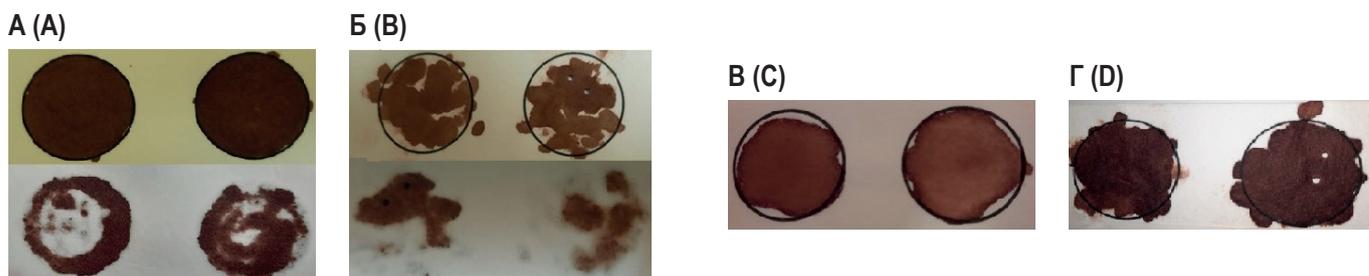


Рисунок 2. Ошибки взятия материала

Примечание. А – кровь наносили инструментом (шприцем или дозатором) по кругу, имитируя правильно взятый материал, прикосновение инструмента к поверхности карты создало царапины и образовало мелкие бумажные кровяные катышки, пропитка бумаги неполная. Б – кровь нанесена несколькими маленькими каплями, бумага не пропитана, а «намазана», количество материала недостаточно. В – недостаточное количество крови, пятна крови бледные с более темным кольцом по периферии: незначительный объем крови физическим воздействием распределили по всей окружности, имитируя правильно взятый материал. Г – многослойное нанесение материала и ошибка высушивания: кровяное пятно заскорузлое, «мятое», слои пропитанной кровью бумаги напозают друг на друга, образуя утолщения поверхности (валики, холмики).

Figure 2. Errors in collected material

Note. A, blood was applied with a tool (syringe or dispenser) in a circle, simulating correctly collected material, touching the tool to the surface of the card created scratches and formed small paper blood pellets, the impregnation of the paper was incomplete. B, blood is applied in several small drops, the paper is not soaked, but "smeared", the amount of material is not enough. C, insufficient amount of blood, dried blood spots are pale with a darker ring along the periphery: a small volume of blood was distributed over the entire circumference by physical force, simulating correctly collected material. D, multi-layer application of material and drying error: dried blood spot is crusty, "crumpled", layers of blood-soaked paper creep on top of each other, forming surface thickenings (rollers, mounds).

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

МЕДИЦИНСКАЯ ИММУНОЛОГИЯ

ноябрь-декабрь

2023, том 25

№ 6

Основан в марте 1999 года

Главный редактор

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

Заместитель главного редактора

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

Редакционная коллегия

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

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

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

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

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

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

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

Ответственный секретарь:

Ракитянская Н.В.
E-mail: medimmun@spbraaci.ru

Редактор перевода:
д.м.н. Чухловин А.Б.

Редактор электронной версии:
Ерофеева В.С.

Редакция: тел./факс (812) 233-08-58

Адрес для корреспонденции:
197101, Санкт-Петербург, а/я 130.

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

© Медицинская иммунология

Журнал зарегистрирован Северо-Западным региональным управлением Государственного комитета РФ по печати 26 марта 1999 г. Свидетельство о регистрации № П 3612.

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

Свидетельство о регистрации ПИ № 77-15892.

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

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

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 25.10.2023 г. Формат 60 x 90 1/8. Печать офсетная.

Усл. печ. л. 24,5. Тираж 2000 экз. (1-й завод – 1000 экз.) Заказ № 042

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**

November-December

2023, volume 25

No. 6

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 25.10.2023. Print format 60 x 90 1/8. Offset printing.

Printed sheets 24.5. Circulation 2000 copies. (1st edition – 1000 copies.)

Print in LLC «ARTEMIDA»

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

Phone: (812) 950-10-99

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

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

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

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

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

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

Нестерова И.В., Татаурщикова Н.С.

ПЕРСПЕКТИВЫ РАЗВИТИЯ АДАПТИВНОЙ МЕДИЦИНСКОЙ ИММУНОЛОГИИ 1277

Микрюкова Н.В., Калинина Н.М.

СИНДРОМ АКТИВАЦИИ ТУЧНЫХ КЛЕТОК: НОВОЕ МИРОВОЗЗРЕНИЕ..... 1289

Белоглазов В.А., Яцков И.А., Камшиев А.А., Агзамова Ю.М.

РОЛЬ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНОВ TOLL-LIKE РЕЦЕПТОРОВ В ПАТОГЕНЕЗЕ НОВОЙ КОРОНАВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ 1299

Кобылянский В.И.

К НЕКОТОРЫМ АСПЕКТАМ ИММУНОСУПРЕССОРОВ И ИХ АЭРОЗОЛЬНОЙ ДОСТАВКЕ В ЛЕГКИЕ ПРИ ЛЕЧЕНИИ COVID-19..... 1307

Селедцов В.И., Доржиева А.Б., Селедцова Г.В.

ПРОТИВООПУХОЛЕВЫЕ И ИММУНОМОДУЛИРУЮЩИЕ ЭФФЕКТЫ ОКСИГЕНОТЕРАПИИ..... 1319

Оригинальные статьи

Тимганова В.П., Заморина С.А., Бочкова М.С., Шардина К.Ю., Ужвиюк С.В., Кропанева М.Д., Раев М.Б.

ВЛИЯНИЕ ГЛИКОДЕЛИНА НА CCR6⁺ СУБПОПУЛЯЦИИ Т-ХЕЛПЕРОВ, ПОЛЯРИЗОВАННЫХ В ФЕНОТИП Th17 1329

Нижегородова Д.Б., Колядич Ж.В., Морозова Н.А., Зафранская М.М.

γδТ-КЛЕТКИ У ПАЦИЕНТОВ С ОПУХОЛЯМИ ПОЛОСТИ НОСА И ОКОЛОНОСОВЫХ ПАЗУХ..... 1343

Сметаненко Е.А., Хонина Н.А., Леплина О.Ю., Тихонова М.А., Баторов Е.В., Пасман Н.М., Черных Е.Р.

ЭКСПРЕССИЯ ИНГИБИТОРНЫХ РЕЦЕПТОРОВ Т-КЛЕТКАМИ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ У БЕРЕМЕННЫХ С ПРЕЭКЛАМПСИЕЙ 1353

Шатунова П.О., Гаврилова М.В., Ртищев А.А., Колыганова Т.И., Зайцева Т.А., Маркушин С.Г.

ИЗУЧЕНИЕ ИММУНОРЕГУЛЯТОРНОЙ ФУНКЦИИ НАТУРАЛЬНЫХ КИЛЛЕРОВ В ПРОЦЕССЕ ИНФЕКЦИИ, ВЫЗВАННОЙ ВИРУСОМ ПТИЧЬЕГО ГРИППА 1363

Бухарин О.В., Иванова Е.В., Чайникова И.Н., Перунова Н.Б., Никифоров И.А., Челпаченко О.Е., Бондаренко Т.А., Бекпергенова А.В.

ВЛИЯНИЕ КИШЕЧНЫХ МИКРОСИМБИОНТОВ НА ПРОДУКЦИЮ ЦИТОКИНОВ В СИСТЕМЕ *IN VITRO* 1371

Хамед Эбрахимзаде Лейлабадло, Сина Хамзезаде, Парвин Сарбахш, Севда Зоги, Реза Готаслу

ЧАСТОТА ВСТРЕЧАЕМОСТИ АНТИТЕЛ К *HELICOBACTER PYLORI* СРЕДИ НАСЕЛЕНИЯ АЗЕРБАЙДЖАНА (ИРАН) 1389

Сенникова С.В., Топтыгина А.П., Колобов А.А., Симбирцев А.С.

ИЗМЕНЕНИЕ ЦИТОКИНОВОГО ПРОФИЛЯ КАПИЛЛЯРНОЙ И ВЕНОЗНОЙ КРОВИ БОЛЬНЫХ ПСОРИАЗОМ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ЛЕЧЕНИЯ 1395

Студеникина А.А., Перепечеева М.Л., Михайлова Е.С., Вараксин Н.А., Аутеншлюс А.И.

ПРОДУКЦИЯ ЦИТОКИНОВ КЛЕТКАМИ КРОВИ И ОБРАЗЦАМИ ОПУХОЛИ И ЕЕ СОПРЯЖЕННОСТЬ С ЭКСПРЕССИЕЙ МИКРОРНК У ПАЦИЕНТОВ С РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ 1407

Агарков Н.М., Жернакова Н.И., Негребецкий В.А.

СИСТЕМНЫЕ ЦИТОКИНЫ У ПОЖИЛЫХ ПАЦИЕНТОВ С ИШЕМИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНЬЮ СЕРДЦА ПОСЛЕ COVID-19 В РАННИЕ СРОКИ ВЫЗДОРОВЛЕНИЯ 1417

Мяжкова М.А., Боброва З.В., Петровиченко С.Н.

ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ В ОЦЕНКЕ ПАРАМЕТРОВ СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТОЙ СИСТЕМЫ СПОРТСМЕНОВ РАЗЛИЧНОЙ КВАЛИФИКАЦИИ 1423

Иммунологические методы

Афридонова З.Э., Топтыгина А.П., Боголюбова А.В., Семикина Е.Л.

СОПОСТАВЛЕНИЕ РАЗНЫХ МЕТОДОВ ОЦЕНКИ КЛЕТОЧНОГО ИММУНИТЕТА К ВИРУСУ SARS-CoV-2..... 1431

Сайтгалина М.А., Останкова Ю.В., Седых А.В., Тотолян Арег А.

ОСОБЕННОСТИ ПРЕАНАЛИТИЧЕСКОГО ЭТАПА ПРИ КОЛИЧЕСТВЕННОМ ОПРЕДЕЛЕНИИ ТРЕС/КРЕС В ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ 1441

Седых А.В., Сайтгалина М.А., Останкова Ю.В., Тотолян Арег А.

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ НАБОРОВ РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ВЫДЕЛЕНИЯ ДНК ИЗ СУХИХ ПЯТЕН КРОВИ 1453

Правила для авторов 1463

Авторский указатель 1466

Предметный указатель 1466

CONTENTS

Reviews

Nesterova I.V., Tataurschikova N.S.

PROSPECTS FOR THE DEVELOPMENT OF ADAPTIVE MEDICAL IMMUNOLOGY 1277

Mikryukova N.V., Kalinina N.M.

MAST CELL ACTIVATION SYNDROME: A NEW OUTLOOK 1289

Beloglazov V.A., Yatskov I.A., Kamshiy A.A., Agzamova Yu.M.

ROLE OF TOLL-LIKE RECEPTOR GENE POLYMORPHISM IN PATHOGENESIS OF NEW CORONAVIRUS INFECTION 1299

Kobylyansky V.I.

SOME REFLECTIONS ON IMMUNOSUPPRESSANTS AND THEIR DELIVERY TO THE LUNGS BY AEROSOL IN THE TREATMENT OF COVID-19 1307

Seledtsov V.I., Dorzhieva A.B., Seledtsova G.V.

ANTITUMOR AND IMMUNOMODULATORY EFFECTS OF OXYGEN THERAPY 1319

Original articles

Timganova V.P., Zamorina S.A., Bochkova M.S., Shardina K.Yu., Uzhviyuk S.V., Kropaneva M.D., Rayev M.B.

EFFECTS OF GLYCODELIN ON CCR6⁺ CELL SUBPOPULATIONS OF Th17-POLARIZED HELPER T CELLS 1329

Nizheharodava D.B., Kolyadich J.V., Marozava N.A., Zafranskaya M.M.

γδT CELLS IN PATIENTS WITH TUMORS OF THE NASAL CAVITY AND PARANASAL SINUSES 1343

Smetanenka E.A., Khonina N.A., Lepina O.Yu., Tikhonova M.A., Batorov E.V., Pasman N.M., Chernykh E.R.

EXPRESSION OF INHIBITORY RECEPTORS ON PERIPHERAL BLOOD T CELLS IN PREGNANT WOMEN WITH PREECLAMPSIA 1353

Shatunova P.O., Gavrilova M.V., Rtishchev A.A., Kolyganova T.I., Zaytseva T.A., Markushin S.G.

IMMUNOREGULATORY FUNCTIONS OF NATURAL KILLER CELLS IN AVIAN INFLUENZA VIRUS INFECTION 1363

Bukharin O.V., Ivanova E.V., Chainikova I.N., Perunova N.B., Nikiforov I.A., Chelpachenko O.E., Bondarenko T.A., Bekpergenova A.V.

IN VITRO EFFECTS OF INTESTINAL MICROSYMBIANTS ON THE CYTOKINE PRODUCTION 1371

Hamed Ebrahimzadeh Leylabadlo, Sina Hamzehzadeh, Parvin Sarbakhsh, Sevda Zoghi, Reza Ghotaslou

SEROPREVALENCE OF ANTI-HELICOBACTER PYLORI ANTIBODIES IN POPULATION OF AZERBAIJAN, IRAN 1389

Sennikova S.V., Toptygina A.P., Kolobov A.A., Simbirtsev A.S.

TREATMENT-DEPENDENT CHANGES IN CYTOKINE PROFILE OF CAPILLARY AND VENOUS BLOOD IN PATIENTS WITH PSORIASIS 1395

Studenikina A.A., Perepechaeva M.L., Mikhaylova E.S., Varaksin N.A., Autenshlyus A.I.

CYTOKINE PRODUCTION BY BLOOD CELLS AND TUMOR SAMPLES AND ITS COUPLING TO microRNA EXPRESSION IN BREAST CANCER PATIENTS 1407

Agarkov N.M., Zhernakova N.I., Negrebetsky V.A.

SYSTEMIC CYTOKINES IN ELDERLY PATIENTS WITH CORONARY HEART DISEASE AT EARLY RECOVERY FROM COVID-19 1417

Myagkova M.A., Bobrova Z.V., Petrochenko S.N.

IMMUNOLOGICAL INDEXES FOR ASSESSING PARAMETERS OF CARDIOVASCULAR SYSTEM IN ATHLETES OF DIFFERENT QUALIFICATION 1423

Immunological methods

Afridonova Z.E., Toptygina A.P., Bogolyubova A.V., Semikina E.L.

COMPARISON OF DIFFERENT TECHNIQUES FOR EVALUATION OF CELLULAR IMMUNITY TO SARS-CoV-2 VIRUS 1431

Saitgalina M.A., Ostankova Yu.V., Sedykh A.V., Totolian Areg A.

FEATURES OF THE PRE-ANALYTICAL STAGE IN QUANTITATIVE DETERMINATION OF TREC/KREC IN PERIPHERAL BLOOD 1441

Sedykh A.V., Saitgalina M.A., Ostankova Yu.V., Totolian Areg A.

COMPARATIVE ANALYSIS OF REAGENT KITS FOR DNA EXTRACTION FROM DRY BLOOD STAINS 1453

Instructions to Authors 1463

Author index 1466

Subject index 1466

ПЕРСПЕКТИВЫ РАЗВИТИЯ АДАПТИВНОЙ МЕДИЦИНСКОЙ ИММУНОЛОГИИ

Нестерова И.В., Татаурщикова Н.С.

ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы», Москва, Россия

Резюме. Процессы адаптации иммунной системы человека к негативным внутренним и внешним воздействиям, в том числе к стрессорным, инфекционным, факторам внешней среды, контролируются и осуществляются нейроиммуноэндокринным комплексом (НИЭК). При нормальном функционировании НИЭК существует взаимодействие нервной, иммунной и эндокринной систем, что позволяет иммунной системе функционировать нормально, оставаться устойчивой к различным негативным и индуцирующим влияниям, проявлять свои адаптационные возможности, сохраняя при этом способность отражать атаки различных патогенов, нивелировать аллергические и аутоиммунные реакции. При нарушениях нормального функционирования НИЭК страдают адаптационные процессы в иммунной системе, взаимодействие иммунной, нервной и эндокринной систем, что приводит к возникновению стойких нарушений функционирования иммунной системы и может манифестировать формированием болезней иммунной системы, в том числе приобретенного иммунодефицита. Нами обоснована необходимость создания нового перспективного научного направления – адаптивная медицинская иммунология, в основе которого лежит изучение особенностей нарушений функционирования иммунной системы человека при остром или хроническом воздействии негативных внутренних и внешних, стрессорных, инфекционных и других, в том числе урбанистических факторов, в результате чего происходит «срыв адаптационных возможностей иммунной системы» и, как результат, возникают болезни иммунной системы, в том числе приобретенные иммунодефициты и связанные с ними различные иммунозависимые заболевания. Целью адаптивной медицинской иммунологии является разработка алгоритма комплексной диагностики и создание интеграционных междисциплинарных, в том числе иммунотерапевтических подходов, адаптивно воздействующих на приобретенные нарушения функционирования иммунной системы – интеграционной медикаментозной коррекции иммунной системы, проводимой при различных иммунозависимых заболеваниях. Основной задачей является таргетное восстановление адекватного ответа иммунной системы на имеющийся нетипично протекающий острый или хронический инфекционно-воспалительный процесс, а также нивелирование нарушений нервной и эндокринной систем, входящих в НИЭК, с дальнейшим восстановлением их сбалансированного взаимодействия. Подобный интеграционный подход способствует восстановлению нормального функционирования иммунной системы, формированию позитивной клинической эффективности и выходу пациентов в длительную клиническую ремиссию. Другой задачей адаптивной медицинской иммунологии является создание перспективных инноваци-

Адрес для переписки:

Нестерова Ирина Вадимовна
ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов
имени Патриса Лумумбы»
117513, Россия, Москва, Ленинский пр., 123, кв. 1.
Тел.: 8 (916) 187-73-41.
E-mail: inesterova1@yandex.ru

Address for correspondence:

Irina V. Nesterova
P. Lumumba Peoples' Friendship University of Russia
123 Leninsky Ave, Apt 1
Moscow
117513 Russian Federation
Phone: +7 (916) 187-73-41.
E-mail: inesterova1@yandex.ru

Образец цитирования:

И.В. Нестерова, Н.С. Татаурщикова «Перспективы
развития адаптивной медицинской иммунологии»
// Медицинская иммунология, 2023. Т. 25, № 6.
С. 1277-1288.
doi: 10.15789/1563-0625-PFT-2890

© Нестерова И.В., Татаурщикова Н.С., 2023
Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

I.V. Nesterova, N.S. Tataurschikova "Prospects for
the development of adaptive medical immunology", *Medical
Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2023,
Vol. 25, no. 6, pp. 1277-1288.
doi: 10.15789/1563-0625-PFT-2890

© Nesterova I.V., Tataurschikova N.S., 2023
The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License

DOI: 10.15789/1563-0625-PFT-2890

онных диагностических технологий и, на этой основе, разработка новых интеграционных программ для таргетного восстановления повреждений иммунной системы, а также нервной и эндокринной систем у иммунокомпрометированных пациентов, страдающих различными иммунозависимыми заболеваниями.

Ключевые слова: адаптивная медицинская иммунология, иммунодефицит, иммунозависимые заболевания, интеграционная программа, коррекция иммунной системы, нейроиммуноэндокринный комплекс

PROSPECTS FOR THE DEVELOPMENT OF ADAPTIVE MEDICAL IMMUNOLOGY

Nesterova I.V., Tataurschikova N.S.

P. Lumumba Peoples' Friendship University of Russia, Moscow, Russian Federation

Abstract. The processes of adaptation of the human immune system to negative internal and external influences, including stress, infectious, environmental factors, are controlled by the neuroimmunoendocrine complex (NIEC). The normal functioning of the NIEC is the close interaction between the nervous, immune and endocrine systems. The normal NIEC allows the immune system show its adaptive capabilities, remain resistant to various negative influences, while maintaining the ability to repel attacks of various pathogens, neutralize allergic and autoimmune reactions. In case of violations of the normal functioning of the NIEC, adaptive processes in the immune system, the interaction of the immune, nervous and endocrine systems suffer, which leads to persistent violations of the functioning of the immune system and can manifest the formation of diseases of the immune system, including acquired immunodeficiency. We have justified the need to create a new promising scientific direction – adaptive medical immunology, which is based on the study of the features of disorders of the human immune system under acute or chronic exposure to negative internal and external, stressful, infectious, urban factors, resulting in a “breakdown of the adaptive capabilities of the immune system” and, as a result, the diseases exist of the immune system, including acquired immunodeficiency and related immune-dependent diseases. The aim of adaptive medical immunology is to develop an algorithm for complex immunodiagnostics and to create integrative interdisciplinary programs for correction immune system, including immunotherapeutic approaches that affect acquired disorders and restore an adaptive activities of the immune system. The main task is the restoration of an adequate response of the immune system to the existing atypically occurring acute or chronic infectious and inflammatory process, as well as the leveling of disorders of the nervous and endocrine systems with restoration their balanced interaction in the NIEC. Such an integration approach contributes to the restoration of the normal functioning of the immune system, the formation of positive clinical efficacy and the exit of patients into long-term clinical remission. Another task of adaptive medical immunology is the creation of promising innovative diagnostic technologies and, on this basis, the development of new integration programs for targeted restoration of damage to the immune system, as well as the nervous and endocrine systems in immunocompromised patients suffering from various immune-dependent diseases.

Keywords: adaptive medical immunology, immunodeficiency, immune-dependent diseases, integration program, correction of the immune system, neuroimmunoendocrine complex

Введение

Процессы адаптации иммунной системы человека к позитивным и негативным внутренним и внешним воздействиям, в том числе к влияниям факторов внешней среды, контролируются и осуществляются нейроиммуноэндокринным комплексом (НИЭК). При нормальном функционировании НИЭК существует тонкое, но очень четкое физиологическое взаимодействие

нервной, иммунной и эндокринной систем, что позволяет иммунной системе функционировать нормально, оставаться устойчивой к различным негативным и индуцирующим влияниям и, таким образом, проявлять свои адаптационные возможности, сохраняя при этом способность отражать атаки различных патогенов, нивелировать аллергические и аутоиммунные реакции. При нарушениях нормального функционирования НИЭК нарушаются адаптационные процес-

сы в иммунной системе, поскольку нарушается физиологическое взаимодействие иммунной, нервной и эндокринной систем, что приводит к возникновению стойких нарушений функционирования иммунной системы, что может манифестировать формирование болезней иммунной системы, в том числе приобретенного иммунодефицита.

Причинами нарушений нормального функционирования НИЭК являются часто повторяющиеся, достаточно регулярные и длительные повреждающие воздействия негативного характера, в первую очередь стрессорные, а также факторы внешней среды, которые оказывают дисрегуляторные влияния на нейроиммуноэндокринный комплекс индивидуума. Вследствие этого нарушается работа нервной, иммунной и эндокринной систем из-за возникшего дисбаланса в их взаимодействиях. Так, например, сильный психоэмоциональный стресс индуцирует нарушение противовирусной иммунной защиты, и через несколько часов у пациента хронической герпес-вирусной инфекцией возникают острая или обострение хронической инфекции, вызванной ВПГ1 или ВПГ2 на фоне срыва адаптационных возможностей иммунной системы. Другой пример свидетельствует о том, что эндокринный дисбаланс в период овуляции, возникший у женщин, страдающих хроническим генитальным герпесом упорно-рецидивирующего течения, приводит к обострениям этой вирусной инфекции вследствие нарушений противовирусной иммунной защиты, спровоцированной негативным изменением гормонального фона.

Различные нетипично протекающие острые тяжелые или рецидивирующие хронические инфекционно-воспалительные заболевания с необычным или нетипичным течением также возникают при нарушении нормального функционирования НИЭК. Отличительной чертой такой острой или хронической патологии является отсутствие адекватного ответа на традиционную стандартную терапию в рамках клинических рекомендаций. Кроме того, при срыве адаптационных возможностей иммунной системы, при предсуществующей генетической предрасположенности может произойти дебют манифестации или обострение аллергических, аутоиммунных заболеваний или аутовоспалительных синдромов.

К сожалению, острый и хронический стресс в условиях современной урбанизации стал «обычным явлением». На этом фоне снижается адаптационный потенциал иммунной системы, что приводит к неадекватному реагированию на внедрение патогенов механизмов врожденного и приобретенного иммунитета, т. е. к ослаблению

противомикробной защиты. Вследствие чего возникают различные нетипично протекающие острые и хронические инфекционно-воспалительные заболевания [1, 12]. По данным ВОЗ, около 75% лиц, проживающих в разных странах, страдают хотя бы одним хроническим заболеванием, а иногда и несколькими.

В связи с вышеизложенным просматривается насущная необходимость в разработке новых подходов к диагностике и комплексному лечению, направленному на восстановление нормального функционирования НИЭК и, в первую очередь, на реставрацию адаптационных возможностей иммунной системы. Это стало возможным при использовании разработанных нами ранее интеграционных программ коррекции – реабилитации иммунной системы у иммунокомпromетированных пациентов, детей и взрослых, с различными нетипично протекающими инфекционно-воспалительными заболеваниями. Разработанные нами интеграционные программы продемонстрировали высокую клинко-иммунологическую эффективность как у иммунокомпromетированных детей, так и у взрослых с приобретенными иммунодефицитами [3, 5, 6, 14].

По нашим данным, планомерная и, при необходимости, достаточно длительная интеграционная адаптивная медикаментозная терапия, в том числе иммунотерапия, способствует нормализации адаптационного потенциала иммунной, нервной и эндокринной систем, обеспечивает восстановление и нормализацию функционирования иммунной системы и способствует достижению стойкой клинической ремиссии при нетипично протекающих инфекционно-воспалительных заболеваниях, ранее не отвечавших на терапию в рамках клинических рекомендаций [3, 4, 5, 6, 7, 14].

Приобретенные иммунодефициты – болезни иммунной системы

Приобретенные или вторичные иммунодефициты – это всегда определенный характерный клинический фенотип, поскольку пациенты с приобретенным иммунодефицитом имеют весьма яркие клинические признаки того, что различные инфекционно-воспалительные заболевания протекают необычно – нетипично, а их жалобы и клинические симптомы болезни и «не укладываются в обычную клиническую картину болезни», при этом проводимая терапия в рамках разработанных и утвержденных МЗ РФ стандартов или клинических рекомендаций не помогает справиться с инфекционно-воспалительным процессом и не дает выраженной клинической эффективности. Отмечается «неотвечаемость» на проводимое лечение, которое, как правило, часто не заканчивается полным выздоровлением. Про-

веденное лечение в последующем не предупреждает рецидива инфекционно-воспалительного заболевания [2].

Приобретенные иммунодефициты – это всегда определенная клиническая категория, имеющая весьма характерные признаки того, что иммунная система индивидуума компрометирована и не справляется с антигенной нагрузкой того или иного вида (бактерии, вирусы, грибы, аллергены, мутировавшие и опухолевые клетки и т. д.), чаще всего с инфекционными антигенами, представленными патогенной или условно-патогенной флорой, что проявляется нетипично протекающими острыми или хроническими инфекционно-воспалительными заболеваниями. В основе клинических проявлений приобретенного иммунодефицита, как правило, лежит приобретенное, транзиторное или длительно существующее (от 3-6 месяцев до 3-6-10 и более лет) повреждение иммунной системы количественного или функционального характера – своеобразная, лабораторно выявляемая, формула иммунного дефекта или комплекса иммунных дефектов. Приобретенные иммунодефициты, обусловленные аномальным функционированием иммунной системы, характеризуются полной или частичной недостаточностью функционирования ее различных звеньев. Они могут возникать в любые периоды постнатального развития: как после рождения ребенка, так и в процессе роста и развития организма, в любом периоде детского возраста, в юношеском, зрелом, пожилом и старческом возрасте. Приобретенные иммунодефициты в конечном счете обуславливают функциональную неадекватность иммунного ответа на антигенную (АГ) нагрузку, а суть иммунопатогенеза любой формы вторичного приобретенного иммунодефицита заключается в невозможности полной или неполной АГ элиминации [2]. Пациент, страдающий приобретенным иммунодефицитом, ассоциированным с нетипично протекающими инфекционно-воспалительными заболеваниями, – иммунокомпрометированный пациент.

К факторам риска, провоцирующим развитие приобретенных иммунодефицитов, относятся:

- контакты с часто болеющими вирусными и бактериальными инфекциями лицами из микро- и макроокружения;
- проживание в условиях неблагоприятного экологического воздействия, в том числе влияние урбанизации;
- нарушения питания;
- нарушения метаболизма;
- различные эндокринопатии;
- болезни нервной системы.

К причинно-значимым негативным повреждающим факторам чаще всего относятся:

- респираторные вирусные и бактериальные инфекции;
- герпес-вирусные инфекции (ВЧГ1, ВЧГ2, ВОЛ, ВЭБ, ВЧГ6, ВЧГ7, ЦМВ);
- тяжелые гнойные инфекции (сепсис, острая деструкция легких, острый гематогенный остеомиелит, острый перитонит и т. д.);
- тяжелые грибковые инфекции;
- острый или хронический психоэмоциональный и физический стресс;
- длительное применение НПВП;
- длительное применение ГКС;
- некорректное применение препаратов с иммуносупрессивным действием;
- некорректное применение биологических препаратов на основе моноклональных антител, таргетно блокирующих действие провоспалительных цитокинов;
- лучевая терапия;
- химиотерапия;
- спленэктомия.

Нередко имеет место одновременное воздействие нескольких факторов риска и индуцирующих негативных факторов, что ускоряет возникновение и усугубляет как повреждения иммунной системы, так и клинические проявления приобретенного иммунодефицита.

На фоне приобретенных иммунодефицитов могут возникать различные иммунозависимые или иммуноопосредованные заболевания: нетипично протекающие острые и хронические инфекционно-воспалительные, аллергические и аутоиммунные болезни или их сочетания, характеризующиеся различными вариантами коморбидности. Некоторые из этих патологических состояний при приобретенном иммунодефиците объединены единым иммунопатогенезом.

Так, при приобретенном иммунодефиците пациент может страдать различными инфекционно-воспалительными заболеваниями вирусной этиологии: рекуррентными ОРВИ с частотой острых эпизодов от 4-6 до 20-24 и более в год и рецидивирующими или упорно-рецидивирующими хроническими герпес-вирусными инфекциями: хронической герпетической инфекцией ороназофациальной локализации, хроническими герпетическими ангинами, обусловленными в том числе герпес-вирусными инфекциями, вызванными вирусом Эпштейна–Барр, цитомегаловирусом, вирусом человеческого герпеса 6-го типа, и/или хроническими герпетическими стоматитами упорно-рецидивирующего течения, хроническим генитальным герпесом упорно-рецидивирующего течения, папилломатозом гортани и т. д. Часто отмечается коморбидность. Подобные состояния имеют единый иммунопатогенез: различные моно- или комбинированные наруше-

ния функционирования механизмов противовирусной иммунной защиты: поражение системы интерферонов — интерферопатии, ассоциированные с дефектом индуцированной продукции $IFN\alpha$ и $IFN\gamma$, дефицит Т-цитотоксических лимфоцитов и Т-хелперов, дефицит и снижение функциональной активности естественных киллерных клеток (ЕКК) и т. д. [7].

В то же время при приобретенных иммунодефицитах могут страдать механизмы элиминации не вирусов, а бактерий, что приводит к возникновению острых или хронических нетипично протекающих инфекционно-воспалительных заболеваний орофарингеальной зоны: хронических тонзиллита, фарингита, отита, ринита, гнойного пансинусита с частыми обострениями, повторными пневмониями, ХОБЛ, хроническими упорно-рецидивирующими заболеваниями урогенитального тракта и т. д. У одного и того же больного с приобретенным иммунодефицитом могут наблюдаться одновременные поражения нескольких органов и систем. Нарушения противобактериальной иммунной защиты чаще всего ассоциированы с дефектом эффекторной фагоцитарной функции нейтрофильных гранулоцитов (НГ), нейтропенией вторичного характера, формированием НГ с негативно трансформированным фенотипом и/или с дефицитом секрета IgA, сывороточных IgG, IgM, IgA и т. д.

Достаточно часто при приобретенных иммунодефицитах наблюдаются сочетания вирусных и бактериальных нетипично протекающих инфекционно-воспалительных заболеваний. В таких случаях иммунопатогенез приобретенных иммунодефицитов связан с комбинированными нарушениями иммунных механизмов, как противовирусной, так и противобактериальной защиты.

При подобных коморбидных состояниях рекуррентные ОРВИ через 2-3 дня после контакта с респираторными или герпес-вирусами практически всегда (в 89-95% случаев) осложняются обострением хронических бактериальных инфекционно-воспалительных заболеваний орофарингеальной зоны: хроническими ринитами бактериальной этиологии упорно-рецидивирующего течения, хроническими тонзиллитами с частыми обострениями, хроническими фарингитами с частыми обострениями, хроническими гнойными синуситами или пансинуситами упорно-рецидивирующего течения, хроническими гнойными отитами с частыми рецидивами, хроническими бронхитами, ХОБЛ, пневмониями и т. д.

Все вышеперечисленные иммунозависимые заболевания являются «индикаторными болезнями» — «клиническими масками» иммунопато-

логии, сформировавшимися на фоне приобретенного иммунодефицита, а в их основе лежат моно- или комплекс различных иммунопатогенетически значимых нарушений. В детском возрасте клинические синдромы могут эволюционировать во времени, как в сторону «упрощения», так и в сторону «усложнения». Эта эволюция неизбежно сопровождается сменой «клинических масок».

С одной стороны, существуют приобретенные иммунодефициты, возникшие вследствие воздействия самых разнообразных негативных повреждающих факторов. С другой стороны, по данным ВОЗ, приобретенный иммунодефицит часто является одной из причин хронизации различных инфекционно-воспалительных заболеваний, поскольку иммунная система компрометирована и не в состоянии справиться с патогенной и условно-патогенной флорой при целом ряде хронических заболеваний. Таким образом, в этой ситуации появляется так называемый «замкнутый круг», разомкнуть который возможно только при восстановлении полноценной противоинфекционной иммунной защиты.

В то же время всегда следует помнить о том, что на первом этапе комплексной диагностики врач должен сначала учитывать характерные жалобы пациента, провести поиск клинических критериев иммунокомпрометированности, указывающих на наличие приобретенного иммунодефицита, выявить индуцирующие факторы, и только потом, на втором этапе — провести полноценную лабораторную иммунодиагностику, чтобы оценить состояние иммунной системы и интерферонового статуса. При этом необходимо учитывать, в каком периоде болезни, ассоциированной с приобретенным иммунодефицитом, было проведено иммунодиагностическое исследование, не забывая об особенностях реагирования нормально функционирующей иммунной системы на острый или на обострение хронического инфекционно-воспалительного процесса. Поскольку при иммунодефицитах иммунный ответ на острый инфекционно-воспалительный процесс со стороны иммунной системы часто нарушен и иммунная система может демонстрировать состояние «неотвечаемости», т. е. отсутствие изменений в иммунной системе. При этом при некоторых дефектах функционирования иммунной системы (нейтропения, нарушения фагоцитарной активности) ее ответ с уровня дефицита, например, при гнойной бактериальной инфекции, с трудом дотягивает до уровня нормальных параметров. И это уже патология, поскольку затруднена элиминация патогенной флоры и гнойно-воспалительный процесс не регрессирует. Такой пациент нуждается в таргетной иммуно-

дулирующей терапии, направленной на восстановление количества и эффекторных функций нейтрофильных гранулоцитов или проведения заместительной иммунотерапии внутривенными иммуноглобулинами. При аллергических заболеваниях обязательной является комплексная аллергодиагностика, а при подозрении на наличие аутоиммунных заболеваний – диагностика состояния аутоиммунитета.

Многими клиническими иммунологами были сделаны попытки классифицировать приобретенные вторичные иммунодефициты. Приобретенные знания и мировой опыт в области диагностики и лечения первичных ИД позволили вплотную подойти к решению вопроса классифицирования приобретенных нарушений функционирования иммунной системы.

Классификация вторичных иммунодефицитов

Одна из первых попыток систематизировать вторичные иммунодефицитные состояния была сделана в 1979 году научной группой экспертов ВОЗ. Систематизация была проведена с учетом причин возникновения: протозойные инфекции; бактериальные медленные инфекции (лепра, туберкулез, сифилис и др.); вирусные инфекции; грибковые заболевания; инфекции и гельминтозы; нарушения питания (истощение, кахексия, нарушения всасывания); другие патологические состояния (онкологические заболевания, болезни почек, уремия, хроническая почечная недостаточность, болезни обмена веществ, хронические заболевания печени, ожоговая болезнь); тяжелые хирургические травмы и послеоперационные осложнения, осложнения наркоза; лекарственные воздействия; некоторые лечебные воздействия (рентгеновское облучение, терапия кортикостероидами, цитостатиками, тимэктомия, дренаж грудного протока); воздействие физических факторов (ионизирующая радиация, коротковолновое электромагнитное излучение); химические факторы (вещества бензолного и толуолового рядов); большинство хронических заболеваний.

Далее многочисленными авторами в нашей стране были сделаны попытки систематизировать, классифицировать вторичные иммунодефицитные состояния, в основном по причинам возникновения и механизмам повреждения. Однако, на наш взгляд, они не отвечали запросам практики и недостаточно ориентировали врача на осуществление лечебных мероприятий.

С нашей точки зрения, для выбора оптимальной тактики проведения иммунотерапии, заместительного или позитивного иммуномодулирующего характера, важно установить причину возникновения, уровень, характер, комбинации вторичных повреждений иммунной системы, с

ориентацией на клинические проявления иммунодефицита в каждом конкретном случае.

Более 20 лет назад нами была предложена классификация вторичных иммунодефицитных состояний, как обобщение своего накопленного опыта, которая постепенно претерпевала определенные изменения. Последний вариант Классификации приобретенных вторичных иммунодефицитов опубликован в 2002 и в 2022 гг. [2, 7] (рис. 1).

Кроме того, учитывались причины возникновения приобретенных иммунодефицитов, а также повреждающие и индуцирующие факторы, клинические проявления иммунокомпрометированности при инфекционно-воспалительных заболеваниях, характер их течения, уровни и виды повреждений иммунной системы (рис. 1) с оценкой сочетаемости диагностируемых дефектов функционирования иммунной системы.

При контакте с патогеном некомпromетированная иммунная система человека реализует стереотипный иммунный ответ на фоне развития острого вирусного или острого бактериального инфекционно-воспалительного процесса, в зависимости от вида патогена.

Так, при контакте с вирусными патогенами первыми реагируют система IFN (адекватно вирусной нагрузке повышается локальная и системная продукция $IFN\alpha/\beta$, в более поздние сроки возрастает продукция $IFN\gamma$), дендритные клетки, со 2-го дня увеличивается количество нескольких субпопуляций естественных киллерных клеток, их функциональная активность, в зависимости от первичного или вторичного контакта с вирусным патогеном в течение 2-5 дней увеличивается количество цитотоксических Т-лимфоцитов $CD3^+CD8^+$ и их активированных форм $CD3^+CD8^+CD25^+$, $CD3^+CD8^+HLA-DR^+$, а также естественных киллерных Т-лимфоцитов $CD3^+CD56^+$. Ответ со стороны гуморального звена зависит от первичного или вторичного контакта с данным вирусом и, в зависимости от этих обстоятельств, развивается через 3-5-7 дней: повышаются уровни сывороточных IgM, а далее IgG, через 2-3 дня появляются специфические IgM к вирусному антигену (АГ), а в более поздние сроки – через 5-7 и более дней специфические IgG к вирусному АГ [3, 7].

При контакте с бактериальными патогенами первыми реагируют нейтрофильные гранулоциты, повышается уровень провоспалительных цитокинов, через 2-3 дня активируются моноциты, а далее – гуморальное звено, – в зависимости от обстоятельств, гуморальный ответ развивается через 3-5-7 дней: повышаются уровни сывороточных IgM, а далее IgG, через 2-3 дня появляются специфические IgM к бактериальному

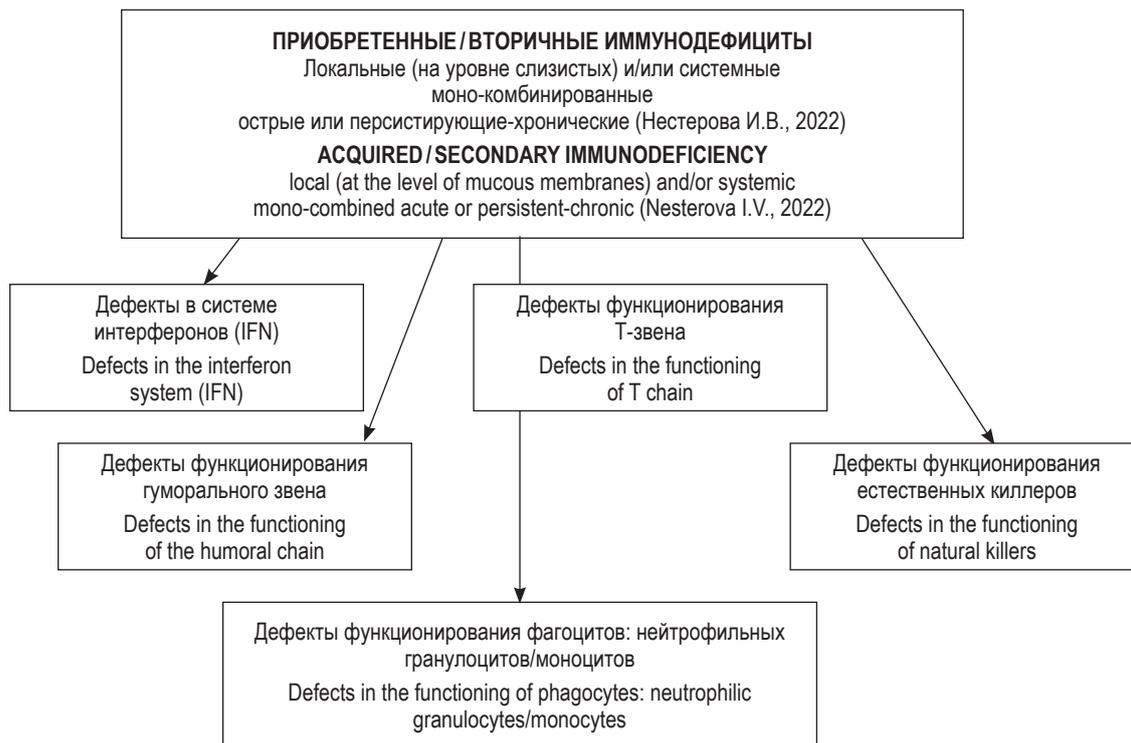


Рисунок 1. Краткая классификация приобретенных иммунодефицитов с учетом повреждений основных звеньев противоифекционного иммунитета

Figure 1. Brief classification of acquired immunodeficiency, taking into account damage to the main chains of anti-infectious immunity

антигену (АГ), а в более поздние сроки — через 5-7 и более дней — специфические IgG к бактериальному АГ. В течение первых 2-3 дней после контакта с бактериальным АГ повышается количество и функциональная активность Т-хелперов CD3⁺CD4⁺, и в частности Th1, продуцирующих провоспалительные цитокины [2, 3, 6].

Отсутствие стереотипного ответа при контакте с вирусными или бактериальными патогенами может являться свидетельством наличия «замаскированного» приобретенного иммунодефицита. Более того, отсутствие адекватного стереотипного ответа иммунной системы и системы IFN при контактах с вирусными или бактериальными патогенами, на фоне которых развился тяжелый инфекционно-воспалительный процесс, т. е. обнаружение при проведении иммунодиагностики «лабораторно неизмененного» иммунного статуса, — свидетельствует о состоянии «парализиса» неадекватно функционирующей иммунной системы. Иными словами, иммунная система индивидуума реагирует на контакт с патогенами в «рамках своих возможностей»: при этом существует «феномен попытки ответа иммунной системы на инфекционный процесс». Так, некоторые показатели, характеризующие приобретенный иммунодефицит при проведении иммунодиагностики, с «уровня дефицита» «до-

тягивают до уровня» нормы на фоне контакта с патогенами.

Длительная персистенция респираторных вирусов у иммунокомпрометированных пациентов с приобретенными иммунодефицитами на фоне имеющихся очагов хронической инфекции верхних и нижних дыхательных путей приводит к развитию бактериальных осложнений при ОРВИ и гриппе. Следует подчеркнуть, что при острой и хронической вирусной респираторной и герпес-вирусной инфекции большую роль играет нарушение барьерных функций поврежденного эпителия дыхательных путей врожденного или приобретенного характера, что приводит к увеличению проницаемости барьерных слизистых для аллергенов, веществ с токсическими свойствами и способствует возникновению гиперчувствительности ирритантных рецепторов подслизистого слоя бронхов и обуславливает бронхообструкцию при ОРВИ. Многими авторами показано, что респираторные вирусные инфекции провоцируют обострение круглогодичного аллергического ринита, бронхиальной астмы у пациентов, страдающих этими аллергическими заболеваниями. А предрасположенность к рекуррентным респираторным вирусным инфекциям на фоне нарушения противовирусной иммунной защиты, в том числе при дисре-

гуляторных нарушениях в системе интерферонов (IFN), усугубляет клинические проявления как аллергического ринита, так и бронхиальной астмы [9]. Рядом авторов установлено, что наиболее характерными нарушениями при сочетании инфекционно-воспалительных и аллергических заболеваний респираторного тракта являются дисбаланс Т-клеточного звена, высокая активность провоспалительных цитокинов, дисрегуляция интерфероногенеза, снижение фагоцитарной и антибактериальной активности нейтрофилов у 70-88% больных. Среди лиц с аллергическими болезнями верхних и нижних дыхательных путей отмечается широкая распространенность инфицирования герпес-вирусами. Сочетание такой аллергической патологии и рецидивирующей ВПГ1-инфекции характеризуется высокой заболеваемостью ОРЗ и требует проведения реабилитационных мероприятий с использованием противовирусных и иммуномодулирующих препаратов [9, 10, 11, 15].

К особенностям нарушений иммунной системы в группе часто и длительно болеющих детей (ЧДБ) относятся нарушения IFN-статуса: дефицит $IFN\alpha$ и $IFN\gamma$, в первую очередь их индуцированной продукции, ассоциированной с низкими уровнями сывороточных $IFN\alpha$ и $IFN\gamma$, снижение уровня sIgA, лизоцима, нарушение в Т- и В-звеньях иммунной системы, дефицит количества и дефекты эффекторной функции нейтрофильных гранулоцитов.

Показано, что среди основных причин затяжного течения респираторной патологии и непрерывного рецидивирования ОРЗ у детей в настоящее время наиболее важными являются [1, 2, 11]:

- негативные анте-/постнатальные факторы, влияющие на работу барьерных органов;
- сопутствующие аллергические заболевания;
- рост резистентности патогенной и условно-патогенной микрофлоры к антибактериальным препаратам;
- ухудшение уровня здоровья детского населения в целом в связи с нарушениями функционирования иммунной системы и отклонениями в физическом развитии детей;
- негативное ятрогенное воздействие, связанное с чрезмерным использованием лекарственных препаратов.

Безусловно, к негативно влияющим факторам относятся возраст детей, сезонность, состояние лимфоузлов и индивидуальные особенности их мукозального иммунитета. У детей раннего возраста особенно важны не только преморбидный фон, но и тесный контакт в микроколлективе с инфицированными родителями, членами семьи и в макроокружении контакт с

инфицированными детьми в детских коллективах. Известны «возрастные периоды иммунологических провалов»: 3 года, 7 лет, пубертатный период как физиологический иммунодефицит, когда мукозальный иммунитет выполняют «сторожевые функции» не вполне эффективно и при этом страдают его барьерные функции. С одной стороны, рецидивирующие заболевания нижних дыхательных путей являются предтечей бронхоспазма в возрастном периоде после 7 лет, с другой — высказывается мнение, что это тренирующий фактор для иммунной системы, способствующий профилактике развития тяжелых аллергических заболеваний [10, 11].

При отсутствии клинических проявлений говорить о вторичном иммунодефиците не представляется возможным. Наличие у человека только измененных или сниженных показателей, характеризующих работу иммунной системы, без клинических проявлений, в первую очередь, различных инфекционных синдромов, следует рассматривать, как состояние «риска развития клинических проявлений этого состояния» в критичной для индивидуума ситуации (сильный психоэмоциональный стресс, политравма, ожоги, предстоящие оперативные вмешательства, длительный наркоз, химио- или лучевая терапия и т.д.). Такие лица, как дети, так и взрослые, нуждаются в диспансерном наблюдении клинического иммунолога, соблюдении рационального режима питания, работы, отдыха и сна, витаминотерапии. В критичные периоды жизни эти лица нуждаются в проведении иммунопрофилактики и реабилитации иммунной системы.

Адаптивная иммунотропная терапия в лечении адаптационных расстройств иммунной системы

В международном консенсусе 2020 года (WAidid) в отношении доступных подходов к профилактике рекуррентных ОРЗ у детей, в том числе страдающих атопическими/аллергическими заболеваниями, а также бронхиальной астмой обсуждается необходимость использования иммуномодулирующей терапии [13].

По мнению экспертов, среди недавно предложенных мер иммунотерапия является перспективной при использовании ОМ-85 (бактериальный лизат — лиофилизат — 40,00 мг: стандартизированный лиофилизат бактериальных лизатов (*Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus viridans*, *Streptococcus pyogenes*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella ozaenae*, *Staphylococcus aureus*, *Moraxella catarrhalis*) — 7 мг имеется достаточное количество хорошо проведенных клинических испытаний, подтверждающих эффективность профилактики ОРЗ. Что же касается использования пробиотиков, то с точки зрения авторов Консенсуса неясно какие

бактерии могут обеспечить наилучшие результаты и какая дозировка и график их введения являются наиболее эффективными. Остается открытым вопрос дозировки и графика витамина D, т. к. сроки и дозы введения также не ясны для авторов, несмотря на некоторые многообещающие результаты эффективности. Пока, во время ожидания получения новых клинических данных, усилия врачей должны быть направлены на устранение воздействия вредных факторов окружающей среды, благоприятствующих возникновению рекуррентных ОРВИ, вакцинацию детей, когда это возможно и/или показано, а также на систематическое применение традиционных методов профилактики инфекций, таких как мытье рук, например, поскольку все вышеперечисленное с точки зрения авторов Консенсуса остается наилучшими мерами для предотвращения повторных инфекций у детей, подверженных рекуррентных ОРВИ [15].

Следует особо отметить, что в Российской Федерации давно озабочены проблемой реабилитации иммунокомпрометированных детей и взрослых, страдающих различными нетипично протекающими острыми и хроническим инфекционно-воспалительными заболеваниями. Поскольку, в отличие от стран дальнего зарубежья, где часто в лечении иммунодефицитов применяют бактериальные лизаты, пидотимод (имунорикс), инозин-пронобекс, ведущими учеными-иммунологами нашей страны создан достаточно большой спектр иммуностропных препаратов с иммуномодулирующей активностью, точечное-таргетное действие которых направлено на коррекцию приобретенных нарушений дефектно функционирующей иммунной системы и системы интерферонов у пациентов с приобретенным иммунодефицитом (Имунофан, Виферон, Тималин, Тимоген, Циклоферон, Ликопид, Полиоксидоний, Беталейкин, Ронколейкин, КСФ, Габриглобин и т. д.). Имеется большое количество научных исследований, посвященных вопросам восстановления иммунной системы и системы интерферонов у иммунокомпрометированных пациентов, детей и взрослых, страдающих такими болезнями иммунной системы, как приобретенные иммунодефициты, на фоне которых развиваются нетипично протекающие инфекционно-воспалительные процессы, которые в ряде случаев могут как сочетаться с аллергическими, так и манифестировать аутоиммунными заболеваниями [2, 12].

При наличии повышенной тревожности, нарушениях сна, постинфекционного синдрома хронической усталости, мягких когнитивных расстройств у иммунокомпрометированных пациентов с приобретенным иммунодефицитом, на

фоне которого имеют место различные иммунозависимые — опосредованные заболевания при отсутствии полноценного ответа на проводимую иммуностропную терапию, с целью улучшения эффективности коррекции иммунной системы при проведении иммуномодулирующей терапии, ряд авторов продемонстрировал позитивную клиническую эффективность при дополнительном включении в интеграционную программу коррекции иммунной системы применение адаптогенов растительного (элеутерококк, жень-шень) или синтетического происхождения (оксиэтиламмония метилфеноксиацетат — трекрезан и тетраметил-тетра-азабицикло-октандион-адаптол). Последний препарат проявляет свое действие через 4 основные нейромедиаторные системы: GABA-, холин-, серотонин- и адренергическую, способствуя их сбалансированности и интеграции, оказывает успокаивающее и ноотропное действие, улучшает когнитивные функции, внимание и умственную работоспособность. При отсутствии позитивного клинического эффекта необходима помощь узких специалистов — неврологов, психотерапевтов. Необходимым дополнением к комплексной интеграционной программе коррекции иммунной системы в ряде случаев является лечение различных эндокринопатий (нарушений эстрогенного фона, на фоне которых страдает Т-клеточное звено иммунной системы (дефицит Т-хелперов), гипотиреоза на фоне аутоиммунного тиреоидита, сахарного диабета 1 и 2 типа и т. д.), осуществляемое специалистом — эндокринологом. Применение междисциплинарного подхода оказывает позитивное модулирующее воздействие как на иммунную систему, так и на нервную и эндокринную системы, восстанавливая баланс их взаимоотношений в «нейроиммунноэндокринном комплексе».

При таком интеграционном междисциплинарном подходе к лечению приобретенных иммунодефицитов становится возможным получение позитивных клинических эффектов иммуномодулирующей терапии у иммунокомпрометированных пациентов: улучшается общее состояние пациента, быстрее происходит эффективная элиминация возбудителя инфекции, уменьшается выраженность и тяжесть клинических проявлений болезни в остром периоде, сокращаются сроки выздоровления, происходит преодоление резистентности к лекарственным препаратам, наступает ускоренная клинико-иммунологическая ремиссия, имеет место предотвращение рецидивов инфекции, при хронической инфекции наблюдается существенное увеличение продолжительности ремиссии, а также увеличивается длительность клинически благополучного периода между обострениями рецидивирующей ин-

фекции, регрессирует синдром хронической усталости и мягких когнитивных расстройств [15].

Адаптивная клиническая иммунология — новое перспективное научное направление

На основе разработанных нами ранее «интеграционных программ коррекции — реабилитации иммунной системы» создано научное направление «адаптивная медицинская иммунология». Целью адаптивной медицинской иммунологии является изучение особенностей нарушений функционирования иммунной системы иммунокомпromетированных пациентов при остром или хроническом воздействии негативных внутренних и внешних, стрессорных, инфекционных и других, в том числе урбанистических, факторов, на фоне которых возникают различные приобретенные иммунодефициты и связанные с ними иммунозависимые заболевания, а также создание новых интеграционных программ, направленных на восстановление НИЭК. Такой подход, с нашей точки зрения, должен способствовать улучшению здоровья и качества жизни иммунокомпromетированных пациентов с различными иммунозависимыми заболеваниями, в первую очередь, с нетипично протекающими инфекционно-воспалительными, в том числе нейроиммуновоспалительными процессами, эндокринопатиями и с приобретенным иммунодефицитом. Для реализации указанной цели была необходима разработка научно-обоснованного междисциплинарного подхода к созданию алгоритма комплексной диагностики иммунных, неврологических и эндокринных расстройств и, на этой основе, создание новых интеграционных терапевтических приемов, направленных на одновременное восстановление нормального взаимодействия нервной, иммунной и эндокринной систем НИЭК, а также на реставрацию адапционных возможностей иммунной системы с постепенной последовательной нормализацией функционирования мукозального и системного иммунитета, нервной и эндокринной систем, на фоне активной элиминации причинно-значимых инфекционных патогенов и параллельного восстановления нарушенного микробиоценоза слизистых и кожи.

Большое значение при этом имеет корректное проведение адаптивной интеграционной медикаментозной коррекции иммунной системы, которая должна носить дифференцированный характер при различных иммунозависимых заболеваниях и зависит от вида и глубины нарушений иммунной системы количественного и качественного характера. Необходимым условием проведения адаптивной интеграционной медикаментозной коррекции иммунной системы является проведение таргетной моно- или ком-

бинированной иммуномодулирующей терапии, действие которой направлено на восстановление адекватного ответа иммунной системы на имеющийся нетипично протекающий острый или хронический инфекционно-воспалительный процесс, а также параллельное терапевтическое нивелирование нарушений нервной и эндокринной систем, входящих в нейроиммуноэндокринный комплекс. Восстановление физиологического баланса во взаимодействиях иммунной, нервной и эндокринной систем должно способствовать формированию позитивной клинической эффективности и выходу пациентов в длительную клиническую ремиссию, значительному улучшению их качества жизни и профилактике возникновения новых инфекционных эпизодов.

Заключение

Мы полагаем, что реалии сегодняшних дней создают предпосылки для создания нового перспективного научного направления: Адаптивная медицинская иммунология.

Мировым научным и врачебным сообществом в International Classification of Diseases — ICD-11 (Международной классификации болезней — МКБ-11) в рубрике 04 зарегистрированы Болезни иммунной системы, среди которых, наряду с первичными иммунодефицитами, появились подробно классифицированные приобретенные иммунодефициты, аутоиммунные заболевания и аутовоспалительные синдромы, аллергические реакции и т. д.

Отечественными и зарубежными исследователями продемонстрирована необходимость создания новых комплексных подходов к лечению приобретенных иммунодефицитов, ассоциированных не только с нетипично протекающими инфекционно-воспалительными заболеваниями вирусной, бактериальной и грибковой этиологии у иммунокомпromетированных пациентов, но и у иммунокомпromетированных пациентов с нейроиммуноэндокринными нарушениями, возникающими на фоне атипично протекающих активных герпес-вирусных инфекций (ВПГ1, ВЭБ, ВЧГ6, ЦМВ), вызывающих нейроиммуновоспаление, которое манифестирует синдромом хронической усталости/миалгическим миелоэнцефалитом.

Ранее нами разработаны, внедрены и опубликованы интеграционные программы реабилитации иммунной системы [3, 4, 5, 6, 7, 8, 14], направленные на ее коррекцию при приобретенных иммунодефицитах с различными нетипично протекающими инфекционно-воспалительными заболеваниями. Эти интеграционные программы хорошо зарекомендовали себя при повторных/рекуррентных ОРВИ и хронических

рецидивирующих герпес-вирусных инфекциях у детей и взрослых, при рецидивирующих хронических инфекционно-воспалительных заболеваниях органов малого таза у женщин детородного возраста, при атипичных хронических активных герпес-вирусных инфекциях (ВЭБ, ВЧГ6, ЦМВ), ассоциированных с нейтроиммуновоспалением, манифестирующим синдромом хронической усталости и миалгическим миелоэнцефалитом [3, 4, 7]. Полученная в результате проведенных исследований позитивная клинико-иммунологическая эффективность после применения Интеграционных программ коррекции-реабилитации иммунной системы у иммунокомпрометированных пациентов с нетипично протекающими инфекционно-воспалительными заболеваниями на фоне приобретенных иммунодефицитов демонстрирует обнадеживающие результаты.

Адаптивная медицинская иммунология предполагает разработку нового междисциплинарного подхода к лечению пациентов с приобретенными иммунодефицитами и различными

нейроиммуноэндокринными нарушениями. Для достижения поставленной цели необходимо создание четкого алгоритма комплексной диагностики иммунных, неврологических и эндокринных нарушений/расстройств и, на этой основе, — разработка новых интеграционных иммунотерапевтических и разнообразных лечебных приемов, направленных на одновременное восстановление нормального функционирования иммунной, нервной и эндокринной систем при различных иммунозависимых заболеваниях, ассоциированных с эндокринопатиями и с нейтроиммуновоспалительными процессами у иммунокомпрометированных пациентов.

Остается еще очень много нерешенных проблем в вопросах лечения сложных иммунокомпрометированных пациентов, и эти проблемы требуют своего незамедлительного решения. Предлагаем, что создание такого научного направления, как адаптивная медицинская иммунология, поможет в решении этих трудных междисциплинарных проблем.

Список литературы / References

1. Намазова Л.С., Ботвиньева В.В., Торшхоева Р.М., Тагизаде Т.Г., Таранушенко Т.Е. Лечение и профилактика острых респираторных инфекций у часто болеющих детей, проживающих в мегаполисе // Детские инфекции, 2007. № 2. С.49-52. [Namazova L.S., Botvinyeva V.V., Torshkhoeva R.M., Tagi-zade T.G., Taranushenko T.E. Treatment and prevention of acute respiratory diseases caused by infections in frequently ailing infants/children residing in megapolises. *Detskie infektsii = Children Infections*, 2007, no. 2, pp. 49-52. (In Russ.)]
2. Нестерова И.В. Глава 4. Вторичные иммунодефициты и методы их коррекции // Иммуноterapia в практике ЛОР-врача и терапевта / Под ред. А.С. Симбирцева, Г.В. Лавреновой. СПб.: Диалог, 2022. С. 116-177. [Nesterova I.V. Chapter 4. Secondary immunodeficiency and methods of their correction. *Immunotherapy in the practice of ENT doctor and therapist*. Ed. Simbirtsev A.S., Lavrenova G.V.]. St. Petersburg: Dialog, 2022, pp. 116-177.
3. Нестерова И.В., Ковалева С.В., Чудилова Г.А., Ломтатидзе Л.В., Пиктурно С.Н., Крутова В.А., Малиновская В.В. Позитивная эффективность интеграционной программы прегравидарной реабилитации иммунной системы женщин с инфекционно-воспалительными заболеваниями генитального тракта // Эффективная фармакотерапия, 2022. Т. 18, № 12. С. 20-27. [Nesterova I.V., Kovaleva S.V., Chudilova G.A., Lomtaticidze L.V., Pikturno S.N., Krutova V.A., Malinovskaya V.V. Positive effectiveness of the integration program of pre-gravidar rehabilitation of the immune system of women with infectious and inflammatory diseases of the genital tract. *Effektivnaya farmakoterapiya = Effective Pharmacotherapy*, 2022, Vol. 18, no. 12, pp. 20-27. (In Russ.)]
4. Нестерова И.В., Ковалева С.В., Чудилова Г.А., Ломтатидзе Л.В., Пиктурно С.Н., Крутова В.А., Малиновская В.В. Роль интеграционной реабилитации иммунной системы будущих матерей в профилактике рекуррентных респираторных инфекций у их детей // Эффективная фармакотерапия, 2022. Т. 18, № 44. С. 8-17. [Nesterova I.V., Kovaleva S.V., Chudilova G. A., Lomtaticidze L.V., Pikturno S.N., Krutova V.A., Malinovskaya V.V. The role of the integration rehabilitation of the immune system of expectant mothers in the prevention of recurrent respiratory infections in their children. *Effektivnaya farmakoterapiya = Effective Pharmacotherapy*, 2022, Vol. 18, no. 44, pp. 8-17. (In Russ.)]
5. Нестерова И.В., Ковалева С.В., Чудилова Г.А., Ломтатидзе Л.В., Шинкарева О.Н., Малиновская В.В. Тактика реабилитации иммунокомпрометированных детей с возвратными респираторными инфекциями: дифференцированные подходы к проведению интерфероно- и иммунотерапии // Фарматека, 2016. № 20. С. 15-23. [Nesterova I.V., Kovaleva S.V., Chudilova G.A., Lomtaticidze L.V., Shinkareva O.N., Malinovskaya V.V. Tactics of rehabilitation of immunocompromised children with recurrent respiratory infections: differentiated approaches to interferono- and immunotherapy. *Farmateka = Pharmateca*, 2016, no. 20, pp. 12-15. (In Russ.)]
6. Нестерова И.В., Митропанова М.Н., Ковалева С.В., Чудилова Г.А., Шувалов А.Н., Малиновская В.В. Дифференцированная иммунотерапия в интеграционной программе реабилитации иммунокомпрометированных детей с врожденными расщелинами губы и нёба // Вопросы практической педиатрии, 2020. Т. 15,

№ 6. С. 7-17. [Nesterova I.V., Mitropanova M.N., Kovaleva S.V., Chudilova G.A., Shuvalov A.N., Malinovskaya V.V. Differentiated immunotherapy in the integration program for the rehabilitation of immunocompromised children with congenital cleft lip and palate. *Voprosy prakticheskoy pediatrii = Clinical Practice in Pediatrics*, 2020, Vol. 15, no. 6, pp. 7-17. (In Russ.)]

7. Нестерова И.В., Халтурина Е.О. Глава 9. Дифференцированная интерфероно- и иммунотерапия в интеграционной программе коррекции иммунной системы при атипичных хронических активных герпес-вирусных инфекциями // Иммунотерапия в практике ЛОР-врача и терапевта / Под ред. А.С. Симбирцева, Г.В. Лавреновой. СПб.: Диалог, 2022. С. 299-329. [Nesterova I.V., Khalturina E.O. Chapter 9. Differentiated interferon- and immunotherapy in the integration program of correction of the immune system in atypical chronic active herpes-viral infections. *Immunotherapy in the practice of ENT doctor and therapist*. Ed. Simbirtsev A.S., Lavrenova G.V.]. St. Petersburg: Dialog, 2022, pp. 299-329.

8. Нестерова И.В., Халтурина Е.О., Малиновская В.В. Клинико-иммунологическая эффективность интеграционной программы реабилитации иммунной системы у пациентов с атипичной хронической активной герпесвирусной коинфекцией до и во время COVID-19, а также в постковидном периоде // Эффективная фармакотерапия, 2022. Т. 18, № 37. С. 30-41. [Nesterova I.V., Khalturina E.O., Malinovskaya V.V. Clinical and immunological effectiveness of integration program of the immune system rehabilitation in patients with atypical chronic active herpes virus coinfection before and during covid-19, as well as in the post-covid period. *Effektivnaya farmakoterapiya = Effective Pharmacotherapy*, 2022, Vol. 18, no. 37, pp. 30-41. (In Russ.)] doi: 10.33978/2307-3586-2022-18-37-30-41.

9. Татаурщикова Н.С., Дегтярева Е.А., Краснов В.В., Романцов М.Г. Иммунокомпрометированный больной. СПб.: Тактик-Студио, 2009. 48 с. [Tataurschikova N.S., Degtyareva E.A., Krasnov V.V., Romantsov M.G. *Immunocompromised patient*]. St. Petersburg: Tactic-Studio, 2009. 48 p.

10. Татаурщикова Н.С. Острое респираторное заболевание у больного аллергией, ключевые участники проблемы: как быть и что делать // Фарматека, 2016. № 18 (331). С. 23-29. [Tataurschikova N.S. Acute respiratory infection in allergic patient, key participants of problem: what's to be done and what to do. *Farmateka = Pharmateca*, 2016, no. 18 (331), pp. 23-29. (In Russ.)]

11. Татаурщикова Н.С. Часто и длительно болеющий ребенок: в фокусе персонализированная иммунотерапия // Педиатрия. Приложение к журналу Consilium Medicum, 2018. № 4. С. 42-47. [Tataurschikova N.S. A frequently and long-term ill child: personalized immunotherapy. *Pediatriya. Prilozhenie k zhurnalu Consilium Medicum = Pediatrics in Focus. Appendix to the Journal Consilium Medicum*, 2018, no. 4, pp. 42-47. (In Russ.)]

12. Филиппова О.Е., Щеголева Л.С., Шашкова Е.Ю., Добродеева Л.К. Иммунологическая реактивность у жителей мегаполиса // Экология человека, 2021. № 1. С. 11-16. [Philippova O.E., Shchegoleva L.S., Shashkova E.Yu., Dobrodeeva L.K. Immunological reactivity in megapolis residents. *Ekologiya cheloveka = Human Ecology*, 2021, no. 7, pp. 11-16. (In Russ.)]

13. Esposito S., Jones M.H., Feleszko W., Martell J.A.O., Falup-Pecurariu O., Geppe N., Martín-Torres F., Shen K.L., Roth M., Principi N. Prevention of new respiratory episodes in children with recurrent respiratory infections: an expert consensus statement. *Microorganisms*, 2020, Vol. 8, no. 11, 1810. doi: 10.3390/microorganisms8111810.

14. Nesterova I.V., Kovaleva S.V., Chudilova G.A., Khalturina E.O., Malinovskaya V.V. Unfavorable impact of the urbanization on the immune antiviral protection in children: the relationship with recurrent respiratory infections. *Springer Geography*, 2021, pp. 171-184.

15. Tataurschikova N.S., Berezhanisky P.V. Some features of the key phenotypes of allergic rhinitis among children in a metropolis. *Advanced Technologies for Sustainable Development of Urban Green Infrastructure. Proceedings of Smart and Sustainable Cities 2020. Cham*, 2021, pp. 202-208.

Авторы:

Нестерова И.В. — д.м.н., профессор кафедры клинической иммунологии, аллергологии и адаптологии факультета непрерывного медицинского образования Медицинского института ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы», Москва, Россия

Татаурщикова Н.С. — д.м.н., заведующая кафедрой клинической иммунологии, аллергологии и адаптологии факультета непрерывного медицинского образования Медицинского института ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы», Москва, Россия

Authors:

Nesterova I.V., PhD, MD (Medicine), Professor, Department of Clinical Immunology, Allergology and Adaptology Faculty of Continuing Medical Education of the Medical Institute, P. Lumumba Peoples' Friendship University of Russia, Moscow, Russian Federation

Tataurschikova N.S., PhD, MD (Medicine), Head, Department of Clinical Immunology, Allergology and Adaptology of the Faculty of Continuing Medical Education of the Medical Institute, P. Lumumba Peoples' Friendship University of Russia, Moscow, Russian Federation

Поступила 27.09.2023
Принята к печати 28.09.2023

Received 27.09.2023
Accepted 28.09.2023

СИНДРОМ АКТИВАЦИИ ТУЧНЫХ КЛЕТОК: НОВОЕ МИРОВОЗЗРЕНИЕ

Микрюкова Н.В.¹, Калинина Н.М.^{1,2}

¹ ФГБУ «Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины имени А.М. Никифорова» МЧС России, Санкт-Петербург, Россия

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

Резюме. Синдром активации тучных клеток (САТК) является тяжелым рецидивирующим заболеванием, требующим стационарного лечения, в клинической картине которого присутствуют признаки анафилаксии. В статье представлены диагностические критерии, позволяющие дифференцировать САТК от других тяжелых, имеющих сходную симптоматику состояний, а также обсуждены локальные формы активации тучных клеток.

Консенсусной группой установлены четкие критерии для диагностики САТК. Эти согласованные критерии включают эпизодическое (рецидивирующее) появление типичных системных симптомов, которые вызываются медиаторами тучных клеток и затрагивают как минимум 2 системы органов; увеличение уровня триптазы в сыворотке крови, по крайней мере на 20% по сравнению с индивидуальным исходным уровнем триптазы плюс 2 нг/мл триптазы в течение 3-4 часов после реакции; положительный ответ на препараты, которые либо нацелены на медиаторы тучных клеток, либо на их эффекты.

Классификация САТК носит этиологический характер и подразделяется на первичный (клональный) САТК, вторичный САТК и идиопатический САТК. Первичный САТК определяется клональной экспансией тучных клеток и является системным мастоцитозом. При вторичном САТК нормальные тучные клетки активируются известными триггерами, например IgE. Если ни клональная экспансия, ни триггер активации тучных клеток не могут быть идентифицированы, состояние определяется как идиопатический САТК.

Особый интерес к САТК привлекла новая коронавирусная инфекция COVID-19, было высказано предположение, что тяжелый вариант течения COVID-19 обусловлен скрытым САТК, однако критерии САТК у этих пациентов не воспроизводились. При наличии локальных симптомов, например крапивницы, либо при поражении 1 органа, например изолированные желудочно-кишечные симптомы, и подозрении на активацию тучных клеток в основе патогенеза был введен термин «расстройство активации тучных клеток». Также в статье обсуждены несколько различных медиаторов, которые предлагаются для использования в диагностике САТК.

Адрес для переписки:

Микрюкова Наталья Васильевна
ФГБУ «Всероссийский центр экстренной и радиационной
медицины имени А.М. Никифорова» МЧС России
197345, Россия, Санкт-Петербург, ул. Оптиков, 54.
Тел.: 8 (812) 702-63-45 (доб. 3331).
E-mail: natalya@mikryukov.info

Address for correspondence:

Natalya V. Mikryukova
A. Nikiforov Russian Center of Emergency
and Radiation Medicine
54 Optikov St
St. Petersburg
197345 Russian Federation
Phone: +7 (812) 702-63-45 (acc. 3331).
E-mail: natalya@mikryukov.info

Образец цитирования:

Н.В. Микрюкова, Н.М. Калинина «Синдром активации тучных клеток: новое мировоззрение» // Медицинская иммунология, 2023. Т. 25, № 6. С. 1289-1298.
doi: 10.15789/1563-0625-MCA-2662

© Микрюкова Н.В., Калинина Н.М., 2023
Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

N.V. Mikryukova, N.M. Kalinina "Mast cell activation syndrome: A new outlook", Medical Immunology (Russia)/ Meditsinskaya Immunologiya, 2023, Vol. 25, no. 6, pp. 1289-1298.
doi: 10.15789/1563-0625-MCA-2662

© Mikryukova N.V., Kalinina N.M., 2023
The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License
DOI: 10.15789/1563-0625-MCA-2662

Однако гипердиагностика САТК влечет за собой риск пропустить основную патологию, не связанную с САТК, и требует дифференциальной диагностики с рядом заболеваний. При отсутствии тяжелых приступов (с гипотонией и шоком) вероятность САТК в целом очень низкая. Безусловно, пациенты с мастоцитозом и/или подтвержденной IgE-зависимой аллергией имеют более высокий риск развития САТК, но ключевым диагностическим маркером является связанное с событием повышение триптазы ТК по сравнению с исходным уровнем, измеренное в бессимптомном интервале. Когда повышение уровня триптазы достигает определенного порога (20% от исходного уровня плюс 2 нг/мл), весьма вероятен диагноз «САТК».

Ключевые слова: синдром активации тучных клеток, расстройство активации тучных клеток, тучные клетки, триптаза, системный мастоцитоз, хроническая крапивница

MAST CELL ACTIVATION SYNDROME: A NEW OUTLOOK

Mikryukova N.V.^a, Kalinina N.M.^{a, b}

^a A. Nikiforov Russian Center of Emergency and Radiation Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

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

Abstract. Mast Cell Activation Syndrome (MCAS) is a severe relapsing disease requiring inpatient treatment, with clinical pattern including the features of anaphylaxis. The article presents diagnostic criteria aimed for differentiation of MCAS from similar severe conditions as well as discusses local forms of mast cell activation. The consensus group has established distinct criteria for diagnosing MCAS. The agreed criteria include episodic (recurrent) occurrence of typical systemic symptoms caused by release of mast cell mediators and involve, at least, two organs; an increase in serum tryptase level by, at least, 20% over individual baseline tryptase plus 2 ng/mL tryptase during 3–4 hours of the pathological reaction; a positive response to drugs that either target mast cells mediators, or their effects. In principle, the classification of MCAS is based on its etiology being subdivided into primary (clonal) MCAS, secondary MCAS, and idiopathic MCAS. The primary MCAS is determined by clonal expansion of mast cells and is considered systemic mastocytosis. In secondary MCAS, normal mast cells are activated by the known triggers, e.g., IgE. If neither clonal expansion nor a trigger for mast cells activation are identified, the condition is defined as idiopathic MCAS.

The new COVID-19 infection has attracted particular interest in MCAS, since the severe course of COVID-19 was thought to develop due to latent MCAS, but the criteria for MCAS in these patients were not reproduced. In the presence of local symptoms, such as urticaria, or in cases of single-organ involvement, e.g., isolated gastrointestinal symptoms, and suspected mast cell activation being basic to pathogenesis, the term mast cell activation disorder was introduced. Moreover, the article discusses several different mediators that are proposed as markers in the diagnosis of MCAS.

However, over-diagnosis of MCAS entails the risk of missing the underlying pathology, which is not associated with MCAS, and requires differential diagnosis with a number of diseases. In the absence of severe attacks (with hypotension and shock), the likelihood of MCAS is generally very low. Of course, the patients with mastocytosis and/or confirmed IgE-dependent allergy are at higher risk of developing MCAS, but a key diagnostic marker is an event-related increase in mast cells tryptase from baseline determined over the asymptomatic period. The diagnosis of MCAS is highly likely if the tryptase level rises above a certain threshold (20% of baseline plus 2 ng/mL).

Keywords: mast cell activation syndrome, mast cell activation disorder, mast cells, tryptase, systemic mastocytosis, chronic urticaria

В последнее время синдром активации тучных клеток (САТК) становится «популярным» заболеванием. Доктора направляют к аллергологам-иммунологам с подозрением на САТК, пациенты сами находят информацию об этом грозном и очень распространенном, по их мнению, синдроме. Тучные клетки локализуются в слизистой оболочке и соединительной ткани во всех орга-

нах, включая дыхательные пути, располагаясь в местах контакта с внешней средой, в местах проникновения антигена. При их активации происходят нарушения во множестве органов и систем, как представлено в таблице 1.

Тучные клетки (ТК) – это фиксированные в тканях многофункциональные клетки иммунной системы, продуцирующие ряд провоспалитель-

ных и вазоактивных медиаторов и цитокинов, принимающие участие в различных патологических состояниях [12]. Их физиологические функции включают регуляцию вазодилатации, сосудистого гомеостаза, врожденных и адаптивных иммунных реакций, ангиогенеза и детоксикации яда. При активации тучные клетки высвобождают предварительно сформированный гистамин, протеазы (химаза, триптаза и карбоксипептидаза типа А), а затем и провоспалительные цитокины, включая IL-1, IL-6, лейкотриены и TNF [1].

Из секреторных гранул ТК α -триптаза в физиологических условиях высвобождается с постоянной низкой скоростью, что приводит к низкой исходной концентрации этого фермента в сыворотке. Во время анафилактического эпизода перекрестное связывание Fc ϵ RI сопровождается

массивным и быстрым высвобождением медиаторов гранул и ферментов из ТК. Кроме того, во время дегрануляции клеточная поверхность и цитоплазматические мембраны ТК перестраиваются, а медиаторы липидного происхождения продуцируются и секретируются [36].

Было показано, что периваскулярные тучные клетки исследуют кожные кровеносные сосуды, образуя филоподии, проникающие через эндотелиальные промежутки и захватывающие иммуноглобулин E (IgE) из кровеносных сосудов [9], что также может позволить ТК захватывать другие циркулирующие молекулы. Также ТК может получать IgE от периваскулярно расположенных дендритных клеток с помощью микровезикул [10]. ТК участвуют в системе врожденного иммунитета (защита хозяина от инфекционных

ТАБЛИЦА 1. СИМПТОМЫ САТК СОГЛАСНО ГЛОБАЛЬНОМУ КОНСЕНСУСУ-2 СИНДРОМА САТК [2] С ИЗМЕНЕНИЯМИ

TABLE 1. MCAS SYMPTOMS ACCORDING TO THE GLOBAL CONSENSUS-2 SYNDROME OF MCAS [2] WITH MODIFICATIONS

Органы и системы Organs and systems	Симптомы Symptoms
Конституциональные Constitutional	Утомляемость, лихорадка, озноб, потеря веса, увеличение веса Fatigue, fever, chills, weight loss, weight gain
ЛОР-органы ENT organs	Ринит, синусит, дисосмия / anosmia, шум в ушах, потеря слуха, дисгевзия/агевзия, боль в горле Rhinitis, sinusitis, dysosmia / anosmia, tinnitus, hearing loss, dysgeusia/ageusia, sore throat
Нервная система Nervous system	Головные боли, мигрени, спутанность сознания, тревога, депрессия, бессонница, судороги, синдром беспокойных ног Headaches, migraines, confusion, anxiety, depression, insomnia, seizures, restless leg syndrome
Сердечно-сосудистая система Cardiovascular system	Боль в груди, сердцебиение, гипотония, ортостатическая гипотензия, лабильность артериального давления и частоты сердечных сокращений Chest pain, palpitations, hypotension, orthostatic hypotension, lability of blood pressure and heart rate
Дыхательная система Respiratory system	Кашель, одышка, явления бронхоспазма Cough, shortness of breath, bronchospasm
Урогенитальная система Urogenital system	Частота, срочность, дизурия, тазовая боль Frequency, urgency, dysuria, pelvic pain
Желудочно-кишечный тракт Gastrointestinal tract	Изжога, дисфагия, комок, боль в груди, диспепсия, тошнота, рвота, вздутие живота, пищевая непереносимость, боль в животе, диарея, запор, повышение трансаминаз, гепатомегалия Heartburn, dysphagia, lump, chest pain, dyspepsia, nausea, vomiting, bloating, food intolerance, abdominal pain, diarrhea, constipation, increased transaminases, hepatomegaly
Слюнные железы Salivary glands	Припухлость Swelling
Лимфатическая система Lymphatic system	Лимфаденопатия Lymphadenopathy
Кожа Skin	Приливы, зуд, крапивница, гемангиомы, узелки, сыпь, алопеция Hot flashes, pruritus, urticaria, hemangiomas, nodules, rash, alopecia
Опорно-двигательная система Musculoskeletal system	Миалгии, артралгии, гипермобильность суставов Myalgia, arthralgia, joint hypermobility

патогенов, нейтрализация токсинов) и в адаптивном иммунном ответе [31], презентировав антиген и в регуляции ответов Т-клеток даже в отсутствие презентации антигена [21]. Mukai К. и соавт. показали роль ТК в аутоиммунитете и воспалении [19].

Термин «синдром активации тучных клеток» описывает состояние, которое, по данным Академии аллергии, астмы и иммунологии США (AAAAI), «проявляется спонтанными эпизодическими признаками и симптомами системной анафилаксии, одновременно поражающей как минимум две системы органов и возникающей в результате секреции медиаторов тучных клеток» [39].

Консенсусная группа Европы и США установила четкие критерии консенсуса для диагностики САТК. Эти согласованные критерии приняты научной общественностью и включают:

1. Эпизодическое (рецидивирующее) появление типичных системных симптомов, которые вызываются медиаторами ТК и затрагивают как минимум 2 системы органов;

2. Увеличение медиаторов тучных клеток, предпочтительно уровня триптазы в сыворотке крови, которое рассчитывается по формуле: повышение на 20% по сравнению с индивидуальным исходным уровнем плюс 2 нг/мл триптазы, полученное в течение 3-4 часов после реакции;

3. Существенный ответ на препараты, которые либо нацелены на медиаторы, происходящие из ТК, либо на их эффекты (например, блокаторы гистаминовых рецепторов) и/или подавляют активацию ТК [34].

Таким образом, прежде чем мы диагностируем САТК, необходимо дождаться результата определения уровня триптазы в сыворотке и ответа на немедленную терапию. Поэтому сначала устанавливается непосредственный диагноз «анафилаксия», и только последующая оценка используемых лабораторных показателей подтвердит (или не подтвердит) САТК. Однако ключевым и первым критерием являются тяжелые, рецидивирующие симптомы анафилаксии.

Когда диагноз «САТК» установлен, следующим важным шагом является определение этиологии и классификация САТК.

Классификация САТК носит этиологический характер и подразделяется на первичный (клональный) САТК, вторичный САТК и идиопатический САТК.

Первичный САТК определяется клональной экспансией ТК и обусловлен существующими мутациями в гене КИТ, кодирующем рецептор фактора роста ТК. Мутация D816V и/или аберрантная экспрессия CD25 на СК, т. е. системный мастоцитоз (СМ) или моноклональный САТК.

При вторичном САТК нормальные ТК активируются известными триггерами, например, IgE. Если ни клональная экспансия, ни триггер аберрантной активации ТК не могут быть идентифицированы, состояние определяется как идиопатический САТК [30].

Диагностика СМ выполняется либо с помощью анализа мутаций КИТ (в настоящее время в значительной степени ограничивается поиском с помощью полимеразной цепной реакции мутаций кодона 816, почти всегда присутствующих при мастоцитозе, но редко обнаруживаемых при САТК), либо с помощью проточной цитометрии для коэкспрессии на поверхности ТК CD117 (внеклеточный домен трансмембранной тирозинкиназы КИТ, доминирующий регуляторный элемент ТК) вместе с CD25 (α -цепь рецептора IL-2, преимущественно экспрессируемая Т-клетками) и/или CD2 (обычно молекула поверхностной адгезии) ограничивается Т-/NK-лимфоцитами) [4].

У пациентов с вторичным САТК тучные клетки обычно присутствуют в тканях в нормальных количествах или могут быть увеличены (реактивная гиперплазия тучных клеток) в ответ на воспалительную среду. Иницирующий триггер для активации тучных клеток может быть опосредован IgE (пища, лекарство, яд перепончатокрылых или ингалянт) и может быть идентифицирован при обследовании на аллергию. Триггеры активации тучных клеток, не опосредованные IgE, включают лекарственные препараты, физические стимулы, в том числе физические упражнения, стресс, острые или хронические инфекции, яды или другое воспалительное или неопластическое заболевание. Через MAS рецептор-X2, связанный с G-белком (MRGPRX2) тучные клетки способны обнаруживать и реагировать на различные триггеры, включая Substance P (SP), лекарства и компоненты яда. Тучные клетки также имеют рецепторы распознавания образов, рецепторы комплемента и рецепторы IgG, которые могут действовать как сенсоры окружающего воспаления. У некоторых пациентов, несмотря на тщательное обследование, четкая причина эпизодов активации тучных клеток не обнаруживается.

В некоторых из этих случаев СМ диагностируют при последующем наблюдении или выявляют при повторных исследованиях.

Таким образом, большинство пациентов, у которых диагностирован вторичный САТК, страдают от лежащей в основе IgE-зависимой аллергии. Однако в некоторых случаях присутствует IgE-независимая аллергия или подозреваемая, но не подтвержденная аллергия (отсутствие аллергена и/или специфический IgE к аллергенам). В редких случаях выявляют аутоиммунное заболева-

ние, хроническую инфекцию, неопластические или преднеопластические заболевания. Когда основное заболевание не обнаруживается, ставится диагноз «идиопатический САТК».

Пациент может страдать как первичным, так и вторичным САТК, что представляет собой ситуацию высокого риска. Например, у некоторых пациентов может быть СМ, а также аллергия на пчелиный или осиный яд. Такие пациенты нуждаются в специфической терапии. В частности, помимо лечения препаратами антимедиаторного типа, этим больным часто требуется специфическая (пожизненная) иммунотерапия или лечение омализумабом [8].

Еще раз рассмотрим этапы диагностики САТК: большинство пациентов с САТК страдают от повторяющихся эпизодов тяжелой гипотензии (анафилаксии). Пациентам с множественной непереносимостью химических веществ и окружающей среды или множественной пищевой непереносимостью не следует ставить диагноз «САТК». Во всех случаях следует проводить детальное обследование. При таком обследовании могут быть выявлены поражения кожи, типичные для мастоцитоза, генерализованная сыпь или признаки атопического дерматита.

Далее врач определяет, является ли реакция системной и затрагивает ли 2 или более системы органов, является ли симптоматика эпизодической и рецидивирующей и могут ли эти эпизоды быть связаны с ТК и медиаторами, происходящими из ТК. Последнее имеет большое значение и требует измерения исходного уровня и связанного с событием уровня специфических для ТК медиаторов, таких как триптаза в сыворотке крови. Когда во время приступа уровень триптазы существенно повышается, реакцию можно рассматривать как связанную с САТК.

На следующем этапе диагноз «САТК» может быть подтвержден путем демонстрации улучшения симптомов (и профилактического эффекта) препаратов, направленных против ТК или эффектов, вызванных медиаторами ТК, например, вызванных гистамином симптомов с использованием блокаторов гистаминовых рецепторов.

Наконец, после подтверждения наличия САТК следует определить основную этиологию. Как упоминалось ранее, пациенты с САТК могут страдать от IgE-зависимой аллергии и/или скрытого мастоцитоза. Кроме того, эти пациенты могут страдать от интоксикаций, пищевой непереносимости или аутоиммунного заболевания. Если триггер САТК не обнаружен, врач устанавливает диагноз «идиопатический САТК».

Во многих случаях выявляются типичные для САТК признаки и симптомы, но критерии консенсуса не позволяют диагностировать САТК.

Это пациенты с тяжелыми симптомами анафилаксии, но не реагирующие на медиаторно-направленные препараты или не обнаруживающие диагностически значимого повышения уровня триптазы. У других пациентов уровни триптазы увеличиваются незначительно. У этих пациентов целесообразно измерить другие медиаторы, такие как гистамин, PGD2 или LTE4.

Существует ряд различных состояний, при которых базальный уровень триптазы в сыворотке крови немного повышен. Такое повышение не обязательно связано с повышенным риском развития САТК. Скорее, повышенный базальный уровень триптазы может быть обнаружен у здоровых людей, у тех, у кого есть семейная гипертриптаземия, у пациентов с бессимптомным СМ и у тех, кто страдает клональным миелоидным новообразованием, не принадлежащим к линии ТК, таким как миелоидный лейкоз. Кроме того, слегка повышенный базальный уровень триптазы выявляется у пациентов с терминальной стадией болезни почек и у тех, кто страдает хронической глистной инвазией.

У пациентов с семейной гипертриптаземией недавно были идентифицированы увеличение числа копий гена TPSAB1, кодирующего α -триптазу [16, 23].

Особый интерес к САТК привлекла новая коронавирусная инфекция COVID-19. Некоторые авторы предполагают, что тяжелый вариант течения COVID-19 обусловлен скрытым САТК [3]. ТК активируются коронавирусом SARS-CoV-2, вызывающим инфекцию COVID-19, что приводит к высвобождению различных медиаторов, таких как биогенные амины (например, гистамин), протеазы (например, триптаза и химаза), цитокины (например, IL-33, IL-6 и TNF), эйкозаноиды (например, простагландины и лейкотриены), гепарин и факторы роста, некоторые из которых, как все чаще считается, играют ключевую роль в развитии гипервоспаления при тяжелом течении заболевания COVID-19 [14, 33].

Кроме активации ТК патоген-ассоциированными молекулярными паттернами посредством активации Toll-подобных рецепторов, ТК экспрессируют ренин-ангиотензиновую систему, эктопротеазу, превращающую ангиотензин-превращающий фермент 2, необходимый для связывания SARS-CoV-2, что приводит к селективной секреции провоспалительных медиаторов без высвобождения гистамина или триптазы. ТК могут синергетически стимулироваться SP и IL-33 для высвобождения больших количеств VEGF или TNF снова без секреции гистамина или триптазы [25].

Неврологическая симптоматика часто встречается как при САТК, так и при болезни

COVID-19, и хотя считается, что острые и подострые неврологические заболевания при заболевании COVID-19 в основном связаны с коагуляцией, вызванной воспалением, авторы предполагают, что хронические нейропсихиатрические симптомы могут быть в большей степени связаны с обострением (и, вероятно, ранее существовавшим) САТК [3]. Однако действительно ранее существовавший неврологический критерий САТК был изменен [34, 35] путем исключения неврологических симптомов и акцентирования внимания на уровне триптазы в сыворотке крови. Однако исследования симптомов мастоцитоза показали, что более 90% пациентов сообщали о «тумане в голове» [29] как о своей основной жалобе и о «стрессе» как о ключевом триггере [22]. В дополнение к уже обсуждавшимся потенциальным триггерам следует включить эффекты плесени и микотоксинов при невропсихических заболеваниях [20, 26]. Например, дрожжи стимулируют тучные клетки к секреции IL-6 и TNF без дегрануляции [30].

Таким образом, существует когорта пациентов, которые не имеют идентифицируемых причин, не имеют аллерген-специфических IgE и не обнаруживаются клональные тучные клетки на основании мутации D816V KIT. Более низкий порог стимуляции или даже «нормальная» секреция медиаторов тучных клеток, но с аномальной реакцией окружающих тканей (например, дефицит катаболических ферментов, таких как диаминооксидаза и гистамин-N-метилтрансфераза). Более того, нестабильные тучные клетки могут сохранять «метаболическую память» о прошлых триггерах, что побуждает их реагировать быстрее и активнее на воздействие тех же или других триггеров, даже если исходный триггер может больше не присутствовать. Одним из таких примеров может быть способность стресса через кортикотропин-рилизинг-гормон (CRH) активировать тучные клетки для действия IgE или нейротензина (NT) [30].

Базофилы могут участвовать в аллергических и других воспалительных процессах так же, как и ТК. Однако не все аллергические эпизоды обязательно затрагивают оба вида клеток, даже если реакция тяжелая и системная. Более того, некоторые медиаторы, вызывающие клинически значимые реакции, в первую очередь синтезируются и высвобождаются тканевыми ТК. Способность ТК и базофилов секретировать медиаторы анафилаксии в ответ на специфический антиген, зависит от нескольких факторов, включая основное состояние (заболевание), количество и тип задействованных рецепторов. На тяжесть результирующей реакции также влияет количество ТК (и базофилов), вовлеченных в событие, природа и количество IgE-реактивных аллергенов, коли-

чество IgE, наличие сопутствующих заболеваний, другие состояния пациента. сопутствующие факторы (алкоголь, никотин, наркотики), тип и количество коактивирующих цитокинов и хемокинов, а также реактивность систем органов на эти медиаторы. Активация ТК может произойти при ряде физиологических и патологических состояний. IgE-опосредованная аллергическая реакция в крайних случаях может привести к системной анафилаксии и может развиваться, когда число ТК велико, когда ТК находятся в «гиперактивированном» состоянии и когда сопутствующие заболевания делают пациента менее толерантным к событиям активации ТК. За последние 50 лет клинические симптомы, возникающие в результате активации ТК, в основном описывались в контексте аллергических заболеваний. Однако в последнее время активацию ТК также рассматривают в контексте патологии ТК [35].

Активация ТК обычно определяется высвобождением медиаторов, и, в случае САТК, мы фокусируемся на повышении уровня триптазы в сыворотке. Однако уровни триптазы в сыворотке могут вводить в заблуждение, поскольку тучные клетки могут секретировать многие медиаторы, особенно цитокины и хемокины, без триптазы [24]. Сообщалось о повышении уровня SP в сыворотке пациентов со СМ [17]. Было показано, что при отсутствии какого-либо воспалительного заболевания сывороточный IL-6 коррелирует с тяжестью заболевания и прогнозом при СМ. Таким образом, несмотря на то, что триптаза специфична для тучных клеток и используется для диагностики СМ, у пациентов, не имеющих высоких показателей триптазы, по мнению Theoharides T.C., требуется измерение других медиаторов тучных клеток в сыворотке, особенно IL-6 и IL-31, метаболитов PGD2 и LTE4 при отсутствии каких-либо других воспалительных заболеваний [30].

Таким образом, идентификация других медиаторов тучных клеток, которые могут быть использованы при диагностике САТК, является областью активных исследований, и пока нельзя убедительно говорить, что показатели SP, IL-1 β , IL-6, IL-31, TNF или VEGF являются «достаточно» специфичными для ТК, чтобы достоверно диагностировать САТК. Возможно, что некоторые медиаторы ТК, хотя и обладают недостаточной специфичностью для диагностических целей, тем не менее суммарно могут полезными для мониторинга терапевтической эффективности, по крайней мере у части пациентов с САТК.

Также были предложены лабораторные обследования для оценки активации ТК и базофилов. Надежные параметры активации базофилов и ТК включают анализ уровней CD63 и/или CD203c

на клеточной поверхности. Оба белка (антигены) увеличиваются на поверхности сшитых FcεR ТК и базофилов. Однако в то время как базофилы легко могут быть использованы для исследований, ТК не доступны без биопсии. Кроме того, многие поверхностные антигены, связанные с активацией, включая CD63 и CD203c, активируются на опухолевых покоящихся тучных клетках при СМ. Таким образом, типирование ТК рекомендуется для диагностики или исключения СМ у пациентов с САТК [37].

Существуют примеры синергетического действия различных триггеров. Некоторыми авторами сообщалось, что комбинация CRH и NT оказывает синергетическое действие в стимуляции секреции VEGF без триптазы, а NT и SP увеличивают экспрессию CRHR-1 на тучных клетках человека [5, 6, 11]. Более того, SP увеличивает экспрессию рецептора IL-33 ST2, а IL-33 увеличивает экспрессию рецептора NK-1 на тучных клетках человека [24].

Многими авторами обсуждается влияние SP на дегрануляцию ТК и базофилов и способность действовать как сенсibilизатор ТК, усиливая их чувствительность к различным триггерам. Также и в нашем исследовании изучалась роль SP в патогенезе хронической крапивницы (ХК), оценка взаимосвязи SP с триггерами крапивницы, наследственностью, сопутствующей патологией. Было выявлено статистически достоверно значимое повышение SP при сопутствующих аутоиммунном тиреоидите, урогенитальной патологии, заболеваниях желудочно-кишечного тракта, пищевой, лекарственной непереносимости и в группе пациентов, описывающих стресс, как триггер обострения ХК ($p < 0,05$).

И наконец, в 2022 году Valent P. и соавт. предложили глобальную классификацию нарушений активации ТК, где разобрали тактику ведения пациентов, у которых активация ТК подозревалась, но не соответствовала критериям САТК. Был предложен термин «расстройство активации тучных клеток» (РАТК). У таких пациентов могут быть локальные симптомы, например крапивница. У других пациентов симптомы могут быть легкими и поражать только 1 орган или быть нетипичными для САТК. Например, изолированные желудочно-кишечные симптомы (спазмы, диарея, запор, пищевая непереносимость), изолированные кожные симптомы (приливы, зуд, отек, не уртикарная сыпь) или изолированные неврологические или психические симптомы (головная боль, утомляемость, туман в голове, депрессия, судороги, очаговые неврологические симптомы, психоз). В большинстве таких случаев уровни триптазы в сыворотке и других медиаторов, происходящих из ТК, существенно не

увеличиваются (диагностическое увеличение по сравнению с исходным уровнем индивидуума не достигается) во время симптоматического события [38]. Тщательным образом требуется проводить дифференциальную диагностику с кожными заболеваниями, проявляющимися крапивницей, желудочно-кишечными расстройствами, непереносимостью или отвращением к пище, хроническими воспалительными (ревматологическими) заболеваниями, острыми или хроническими инфекциями, эндокринологическими заболеваниями, заболеваниями суставов, интоксикациями, неврологическими заболеваниями, отравлениями, побочными эффектами лекарств, психологическими и психическими состояниями и многим другим. Гипердиагностика САТК влечет за собой риск наличия основного заболевания, не связанного с САТК, и задержку в установлении этого диагноза [2].

Данное утверждение подтверждает исследование Buttgerit T. и соавт. в 2021 г.: только у 2 из 100 пациентов, направленных с подозрением на идиопатический САТК, диагноз мог быть подтвержден в соответствии с тремя определяющими критериями [7].

Заключение

Как упоминалось ранее, увеличивается число пациентов, считающих, что их симптомы связаны с активацией ТК и САТК. Однако наиболее вероятно, что они страдают от других (часто невыявленных) проблем или состояний или страдают от менее тяжелой формы активации ТК. Valent P. и соавт. в 2019 г. предложили ответить на следующие вопросы для повышения вероятности САТК:

1. Повторяются ли симптомы в виде тяжелых приступов, требующих немедленного медицинского вмешательства и/или госпитализации?
2. Приводили ли симптомы к анафилактическому шоку, требующему госпитализации?
3. Измерялся ли уровень триптазы в сыворотке крови до, во время и после приступов?
4. Улучшились ли симптомы при непрерывном лечении антигистаминными препаратами?
5. Уменьшилась ли частота тяжелых приступов после приема стероидов или антигистаминных препаратов?
6. Диагностирована ли IgE-зависимая аллергия?
7. Прекратились или уменьшились ли мои приступы после начала приема омализумаба?

Если на большинство этих вопросов ответить «да», вероятность САТК довольно высока. Если на большинство этих вопросов ответить «нет», САТК очень маловероятно или можно практически исключить. При отсутствии тяжелых присту-

пов (с гипотонией и шоком) вероятность САТК в целом очень низкая [32].

Пациенты с мастоцитозом и/или подтвержденной IgE-зависимой аллергией имеют более высокий риск развития САТК. Однако САТК не следует устанавливать как диагноз исключения и только на основании симптомов. САТК — это четко определенное редкое заболевание, которое чаще всего возникает у пациентов с IgE-зависимой аллергией и/или СМ, но редко может возникать и на фоне других состояний. В некоторых случаях основное заболевание не обнаруживается, что приводит к диагнозу «идиопатический САТК». Ключевым диагностическим

маркером является связанное с событием повышение триптазы по сравнению с исходным уровнем индивидуума, измеренное в бессимптомном интервале. Когда повышение уровня триптазы достигает определенного порога (20% от исходного уровня плюс 2 нг/мл), весьма вероятен диагноз «САТК» [32].

Однако данные некоторых исследований, в том числе и нашего, показывают необходимость дальнейшего изучения медиаторов ТК, например SP для использования в диагностике как локальных форм ТК (ХК), так и такого тяжелого заболевания как САТК.

Список литературы / References

1. Мачарадзе Д.Ш. Тучные клетки и триптаза. Современные представления // Медицинская иммунология, 2021. Т. 23, № 6. С. 1271-1284. [Macharadze D.S. Mast cells and tryptase. Modern aspects. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2021, Vol. 23, no. 6, pp. 1271-1284. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-MCA-2193.
2. Afrin L.B., Ackerley M.B., Bluestein L.S., Brewer J.H., Brook J.B., Buchanan A.D., Cuni J.R., Davey W.P., Dempsey T.T., Dorff S.R., Dubravec M.S., Guggenheim A.G., Hindman K.J., Hoffman B., Kaufman D.L., Kratzer S.J., Lee T.M., Marantz M.S., Maxwell A.J., McCann K.K., McKee D.L., Menk Otto L., Pace L.A., Perkins D.D., Radovsky L., Raleigh M.S., Rapaport S.A., Reinhold E.J., Renneker M.L., Robinson W.A., Roland A.M., Rosenbloom E.S., Rowe P.C., Ruhoy I.S., Saperstein D.S., Schlosser D.A., Schofield J.R., Settle J.E., Weinstock L.B., Wengenroth M., Westaway M., Xi S.C., Molderings G.J. Diagnosis of mast cell activation syndrome: A global “consensus-2.” *Diagnosis (Berl.)*, 2021, Vol. 8, no. 2, pp. 137-152.
3. Afrin L.B., Weinstock L.B., Molderings G.J. Covid-19 hyperinflammation and post-Covid-19 illness may be rooted in mast cell activation syndrome. *Int. J. Infect. Dis.*, 2020, Vol. 100, no. 11, pp. 327-332.
4. Altmüller J., Haenisch B., Kawalia A. Mutational profiling in the peripheral blood leukocytes of patients with systemic mast cell activation syndrome using next-generation sequencing. *Immunogenetics*, 2017, Vol. 69, no. 6, pp. 359-369.
5. Asadi S., Alysandratos K.D., Angelidou A., Miniati A., Sismanopoulos N., Vasiadi M., Zhang B., Kalogeromitros D., Theoharides T.C. Substance P (SP) induces expression of functional corticotropin-releasing hormone receptor-1 (CRHR-1) in human mast cells. *J. Invest. Dermatol.*, 2012, Vol. 132, no. 2, pp. 324-329.
6. Asadi S., Theoharides T.C.. Corticotropin-releasing hormone and extracellular mitochondria augment IgE-stimulated human mast-cell vascular endothelial growth factor release, which is inhibited by luteolin. *J. Neuroinflamm.*, 2012, Vol. 9, no. 4, 85. doi: 10.1186/1742-2094-9-85.
7. Buttgerit T., Gu S., Carneiro-Leão L., Gutsche A., Maurer M., Siebenhaar F. Idiopathic mast cell activation syndrome is more often suspected than diagnosed-A prospective real-life study. *Allergy*, 2022, Vol. 77, no. 9, pp. 2794-2802.
8. Castells M., Butterfield J. Mast cell activation syndrome and mastocytosis: initial treatment options and long-term management. *J. Allergy Clin. Immunol. Pract.*, 2019, Vol. 7, no. 4, pp. 1097-1106.
9. Cheng L.E., Hartmann K., Roers A., Krummel M.F., Locksley R.M. Perivascular mast cells dynamically probe cutaneous blood vessels to capture immunoglobulin E. *Immunity*, 2013, Vol. 38, no. 1, pp. 166-175.
10. Choi H.W., Suwanpradit J., Kim I.H., Staats H.F., Haniffa M., MacLeod A.S., Abraham S.N. Perivascular dendritic cells elicit anaphylaxis by relaying allergens to mast cells via microvesicles. *Science*, 2018, Vol. 362, no. 9, 6415. doi: 10.1126/science.aaa0666.
11. Donelan J., Boucher W., Papadopoulou N., Lytinas M., Papaliodis D., Dobner P., Theoharides T.C. Corticotropin-releasing hormone induces skin vascular permeability through a neurotensin-dependent process. *Proc. Natl Acad. Sci USA*, 2006, Vol. 103, no. 20, pp. 7759-7764.
12. Galli S.J. The mast cell-IgE paradox: from homeostasis to anaphylaxis. *Am. J. Pathol.*, 2016, Vol. 186, no. 2, pp. 212-224.
13. Jackson C.W., Pratt C.M., Rupprecht C.P., Pattanaik D., Krishnaswamy G. Mastocytosis and mast cell activation disorders: clearing the air. *Int. J. Mol. Sci.*, 2021, Vol. 22, no. 20, 11270. doi: 10.3390/ijms222011270.

14. Kempuraj D., Selvakumar G.P., Ahmed M.E., Raikwar S.P., Thangavel R., Khan A., Zaheer S.A., Iyer S.S., Burton C., James D., Zaheer A. COVID-19, Mast cells, cytokine storm, psychological stress, and neuroinflammation. *Neuroscientist*, 2020, Vol. 26, no. 5-6, pp. 402-414.
15. Kritas S.K., Ronconi G., Caraffa A., Gallenga C.E., Ross R., Conti P. Mast cells contribute to coronavirus-induced inflammation: new anti-inflammatory strategy. *J. Biol. Regul. Homeost. Agents*, 2020, Vol. 34, no. 1, pp. 9-14.
16. Lyons J.J. Hereditary alpha tryptasemia: genotyping and associated clinical features. *Immunol. Allergy Clin. North Am.*, 2018, Vol. 38, no. 3, pp. 483-495.
17. Maintz L., Wardelmann E., Walgenbach K., Fimmers R., Bieber T., Raap U., Novak N. Neuropeptide blood levels correlate with mast cell load in patients with mastocytosis. *Allergy*, 2011, Vol. 66, no. 7, pp. 862-869.
18. Mehta P., McAuley D.F., Brown M., Sanchez E., Tattersall R.S., Manson J.J., HLH Across Speciality Collaboration, UK. COVID-19: consider cytokine storm syndromes and immunosuppression. *Lancet*, 2020, Vol. 359, no. 10229, pp. 1033-1034.
19. Mukai K., Tsai M., Saito H., Galli S.J. Mast cells as sources of cytokines, chemokines, and growth factors. *Immunol. Rev.*, 2018, Vol. 282, no. 1, pp. 121-150.
20. Ratnaseelan A.M., Tsilioni I., Theoharides T.C. Effects of mycotoxins on neuropsychiatric symptoms and immune processes. *Clin. Ther.*, 2018, Vol. 40, no. 6, pp. 903-917.
21. Rodriguez Cetina B.H., Heinbokel T., Uehara H., Camacho V., Minami K., Nian Y., Koduru S., El Fatimy R., Ghiran I., Trachtenberg A.J., de la Fuente M.A., Azuma H., Akbari O., Tullius S.G., Vasudevan A., Elkhali A. Mast cells regulate CD4(+) T-cell differentiation in the absence of antigen presentation. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2018, Vol. 142, no. 6, pp. 1894-1908.
22. Russell N., Jennings S., Jennings B., Jennings B., Slee V., Sterling L., Castells M., Valent P., Akin C. The mastocytosis society survey on mast cell disorders: part 2-patient clinical experiences and beyond. *J. Allergy Clin. Immunol. Pract.*, 2018, Vol. 7, no. 4, pp. 1157-1165.
23. Sabato V., Chovanec J., Faber M., Milner J.D., Ebo D., Lyons J.J. First identification of an inherited TPSAB1 quintuplication in a patient with clonal mast cell disease. *J. Clin. Immunol.*, 2018, Vol. 38, no. 4, pp. 457-459.
24. Taracanova A., Tsilioni I., Conti P., Norwitz E.R., Leeman S.E., Theoharides T.C. Substance P and IL-33 administered together stimulate a marked secretion of IL-1beta from human mast cells, inhibited by methoxyluteolin. *Proc. Natl Acad. Sci USA*, 2018, Vol. 115, no. 40, pp. 9381-9390.
25. Theoharides T.C. Covid-19, pulmonary mast cells, cytokine storms, and beneficial actions of luteolin. *Biofactors.*, 2020, Vol. 46, no. 3, pp. 306-308.
26. Theoharides T.C. Mold and Immunity. *Clin. Ther.*, 2018, Vol. 40, no. 6, pp. 882-884.
27. Theoharides T.C. Neuroendocrinology of mast cells: challenges and controversies. *Exp. Dermatol.*, 2017, Vol. 26, no. 9, pp. 751-759.
28. Theoharides T.C. Potential association of mast cells with coronavirus disease 2019. *Ann. Allergy Asthma Immunol.*, 2021, Vol. 126, no. 3, pp. 217-218.
29. Theoharides T.C., Stewart J.M., Hatzigelaki E., Kolaitis G. Brain "fog" inflammation and obesity: key aspects of 2 neuropsychiatric disorders improved by luteolin. *Front. Neurosci.*, 2015, Vol. 9, 225. doi: 10.3389/fnins.2015.00225.
30. Theoharides T.C., Tsilioni I., Ren H. Recent advances in our understanding of mast cell activation – or should it be mast cell mediator disorders? *Expert Rev. Clin. Immunol.*, 2019, Vol. 15, no. 6, pp. 639-656.
31. Toniato E., Frydas I., Robuffo I., Ronconi G., Caraffa A.I., Kritas S.K., Conti P. Activation and inhibition of adaptive immune response mediated by mast cells. *J. Biol. Regul. Homeost. Agents*, 2017, Vol. 31, no. 3, pp. 543-548.
32. Valent P., Akin C. Doctor, I Think I Am Suffering from MCAS: Differential Diagnosis and Separating Facts from Fiction. *J. Allergy Clin. Immunol. Pract.*, 2019, Vol. 7, no. 4, pp. 1109-1114.
33. Valent P., Akin C., Bonadonna P. Risk and management of patients with mastocytosis and MCAS in the SARS-CoV-2 (COVID-19) pandemic: expert opinions. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2020, Vol. 146, no. 2, pp. 300-306.
34. Valent P., Akin C., Bonadonna P., Hartmann K., Broesby-Olsen S., Brockow K., Butterfield J.H., Reiter A., Gotlib J., Castells M., Milner J.D., Carter M.C., Komarow H., Radia D., Pardanani A., Sotlar K., Triggiani M., Horny H.P., Arock M., Schwartz L.B., Metcalfe D.D. Mast cell activation syndrome: importance of consensus criteria and call for research. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2018, Vol. 142, no. 3, pp. 1008-1010.
35. Valent P., Akin C., Bonadonna P., Hartmann K., Brockow K., Niedoszytko M., Niedoszytko B., Siebenhaar F., Sperr W.R., Oude Elberink J.N.G., Butterfield J.H., Alvarez-Twose I., Sotlar K., Reiter A., Kluin-Nelemans H.C., Hermine O., Gotlib J., Broesby-Olsen S., Orfao A., Horny H.P., Triggiani M., Arock M., Schwartz L.B., Metcalfe D.D. Proposed Diagnostic Algorithm for Patients with Suspected Mast Cell Activation Syndrome. *J. Allergy Clin. Immunol. Pract.*, 2019, Vol. 7, no. 4, pp. 1125-1133.
36. Valent P., Akin C., Hartmann K., Nilsson G., Reiter A., Hermine O., Sotlar K., Sperr W.R., Escribano L., George T.I., Kluin-Nelemans H.C., Ustun C., Triggiani M., Brockow K., Gotlib J., Orfao A., Kovanen P.T., Hadzijusufovic E., Sadovnik I., Horny H.P., Arock M., Schwartz L.B., Austen K.F., Metcalfe D.D., Galli S.J. Mast

cells as a unique hematopoietic lineage and cell system: from Paul Ehrlich's visions to precision medicine concepts. *Theranostics*, 2020, Vol. 10, no. 23, pp. 10743-10768.

37. Valent P., Akin C., Metcalfe D.D. Mastocytosis: 2016 updated WHO classification and novel emerging treatment concepts. *Blood*, 2017, Vol. 129, no. 11, pp. 1420-1427.

38. Valent P., Hartmann K., Bonadonna P., Gülen T., Brockow K., Alvarez-Twose I., Hermine O., Niedoszytko M., Carter M.C., Hoermann G., Butterfield J.H., Lyons J.J., Sperr W.R., Greiner G., Sotlar K., Kluin-Nelemans H.C., Schwaab J., Lange M., George T.I., Siebenhaar F., Broesby-Olsen S., Jawhar M., Nidoszytko B., Castells M., Orfao A., Gotlib J., Reiter A., Horny H.P., Triggiani M., Arock M., Metcalfe D.D., Akin C. Global Classification of Mast Cell Activation Disorders: An ICD-10-CM-Adjusted Proposal of the ECNM-AIM Consortium. *J. Allergy Clin. Immunol. Pract.*, 2022, Vol. 10, no. 8, pp. 1941-1950.

39. Weiler C.R., Austen K.F., Akin C., Barkoff M.S., Bernstein J.A., Bonadonna P., Butterfield J.H., Carter M., Fox C.C., Maitland A., Pongdee T., Mustafa S.S., Ravi A., Tobin M.C., Vliagoftis H., Schwartz L.B. AAAAI mast cell disorders committee work group report: Mast cell activation syndrome (MCAS) diagnosis and management. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2019, Vol. 144, no. 4, pp. 883-896.

Авторы:

Микрюкова Н.В. – заведующая отделением профилактики и экспертизы профессиональной пригодности поликлиники ФГБУ «Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины имени А.М. Никифорова» МЧС России, Санкт-Петербург, Россия

Калинина Н.М. – д.м.н., профессор, главный научный сотрудник отдела лабораторной диагностики ФГБУ «Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины имени А.М. Никифорова» МЧС России; профессор кафедры иммунологии ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова», Санкт-Петербург, Россия

Authors:

Mikryukova N.V., Head, Outpatient Department of Prevention and Expertise of Professional Suitability, A. Nikiforov Russian Center of Emergency and Radiation Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

Kalinina N.M., PhD, MD (Medicine), Professor, Chief Research Associate, Department of Laboratory Diagnostics, A. Nikiforov Russian Center of Emergency and Radiation Medicine; Professor, Department of Immunology, First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Поступила 05.03.2023

Отправлена на доработку 10.03.2023

Принята к печати 12.03.2023

Received 05.03.2023

Revision received 10.03.2023

Accepted 12.03.2023

РОЛЬ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНОВ TOLL-LIKE РЕЦЕПТОРОВ В ПАТОГЕНЕЗЕ НОВОЙ КОРОНАВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ

Белоглазов В.А., Яцков И.А., Камший А.А., Агзамова Ю.М.

Институт «Медицинская академия имени С.И. Георгиевского» ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет имени В.И. Вернадского», г. Симферополь, Республика Крым, Россия

Резюме. Обзор содержит в себе данные различных литературных источников, дающих представление о роли Toll-подобных рецепторов (TLR) – своего рода сенсоров, играющих ключевую роль в системном реагировании как на бактериальную, так и на вирусную инфекцию, в патогенезе новой коронавирусной инфекции (COVID-19, SARS-CoV-2). С появлением COVID-19, принявшей масштабы пандемии, интерес изучения «факторов-предикторов» тяжести инфекционного процесса приобрел новый виток. Эпидемии прошлых лет, вызванные вирусом тяжелого острого респираторного синдрома (ТОРС, SARS-CoV), а также коронавирусом ближневосточного респираторного синдрома (MERS-CoV), несколько помогли понять степень иммунного реагирования при данных инфекциях, а также какую тактику по отношению к возбудителям данного семейства необходимо предпринять и с какими отдаленными прогнозами вспышки, вызванной SARS-CoV-2, возможно впоследствии столкнуться. Каждый из 10 свойственных человеку TLRs распознает определенную структуру в составе бактериального/вирусного или грибкового патогена. Воздействие на TLR активирует воспалительный сигнальный каскад через посредников – внутриклеточные TIR-домены с участием адаптерных белков. Каскад реакций приводит к продукции важнейших в формировании противовирусного ответа субстанций (интерфероны, провоспалительные цитокины, другие белковые структуры, прямо или опосредованно проявляющие противовирусные свойства). Изменения, влекущие сниженную/повышенную экспрессию генов, кодирующих Toll-рецепторы, полиморфизмы данных генов и другие модификации наследственного аппарата, так или иначе контролирующего работу иммунной системы, будут обуславливать сниженный либо, наоборот, гипертрофический ответ на внедрившуюся в организм инфекцию. Вероятно, что с помощью генетической гетерогенности можно также частично объяснить широкий спектр среди клинических проявлений COVID-19 инфекции в популяции. Таким образом, существует повышенный интерес к изучению этих рецепторов, степени их экспрессии на протяжении всего инфекционного процесса, полиморфизма генов, кодирующих TLR, а следовательно, и возможности использования клинических и лабораторных тестов для качественной и количественной их оценки, а также тактик выбора и перспектив дальнейшего лечения в каждом конкретном случае.

Ключевые слова: COVID-19, TLR, коронавирус, полиморфизм, экспрессия, воспаление

Адрес для переписки:

Яцков Игорь Анатольевич
Институт «Медицинская академия имени
С.И. Георгиевского»
295017, Россия, Республика Крым, г. Симферополь,
ул. 51-й армии, 109, кв. 21.
Тел.: 8 (978) 709-40-15.
E-mail: egermd@yandex.ru

Address for correspondence:

Igor A. Yatskov
S. Georgievsky Medical Academy
109 51st Army St, Apt 21
Simferopol
Republic of Crimea
295017 Russian Federation
Phone: +7 (978) 709-40-15.
E-mail: egermd@yandex.ru

Образец цитирования:

В.А. Белоглазов, И.А. Яцков, А.А. Камший,
Ю.М. Агзамова «Роль полиморфизма генов
Toll-like рецепторов в патогенезе новой коронавирусной
инфекции» // Медицинская иммунология, 2023. Т. 25,
№ 6. С. 1299-1306. doi: 10.15789/1563-0625-ROT-2607

© Белоглазов В.А. и соавт., 2023

Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

V.A. Beloglazov, I.A. Yatskov, A.A. Kamshiy, Yu.M. Agzamova
“Role of Toll-like receptor gene polymorphism in pathogenesis
of new coronavirus infection”, *Medical Immunology
(Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2023, Vol. 25, no. 6,
pp. 1299-1306. doi: 10.15789/1563-0625-ROT-2607

© Beloglazov V.A. et al., 2023

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

DOI: 10.15789/1563-0625-ROT-2607

ROLE OF TOLL-LIKE RECEPTOR GENE POLYMORPHISM IN PATHOGENESIS OF NEW CORONAVIRUS INFECTION

Beloglazov V.A., Yatskov I.A., Kamshiy A.A., Agzamova Yu.M.

S. Georgievsky Medical Academy, V. Vernadsky Crimea Federal University, Simferopol, Republic of Crimea, Russian Federation

Abstract. The review article contains data from literature which concern the role of Toll-like receptors (TLRs), immune sensors that play a key role in the systemic response to both bacterial and viral infections, e.g., in pathogenesis of a new coronavirus infection (COVID-19, SARS-CoV-2 infection). With advent of COVID-19, which has reached the scale of a pandemic, the interest in studying predictive factors for the severity of the infectious process has acquired a new cycle. The previous epidemics caused by severe acute respiratory syndrome virus (SARS-CoV), as well as the Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV), helped us to understand the degree of immune response in these conditions, as well as to suggest medical approaches to the pathogens of this family, i.e., which measures should be taken, and what long-term forecasts may be encountered for the SARS-CoV-2 outbreaks. Each of the 10 human TLRs recognizes a specific structure within a bacterial/viral or fungal pathogen. The effect on TLR activates the inflammatory signaling cascade *via* mediators, i.e., intracellular TIR domains mediated by adapter proteins. These reactions lead to the production of the most important antiviral response substances. The factors that lead to reduced/increased expression of TLR genes include gene polymorphisms which control the functioning of the immune system in some ways, thus causing a reduced, or hyperinflammatory response to an infectious agent. Genetic heterogeneity is likely to explain, at least partially, the wide range of clinical manifestations of COVID-19 infection in general population. Therefore, there is an increased interest in studies of these receptors, the degree of their expression throughout the infectious process, the polymorphisms of the TLR-encoding genes, and, consequently, the opportunity of using clinical and laboratory tests for their qualitative and quantitative assessment, as well as selection and prospects of further treatment in each personal case.

Keywords: COVID-19, TLR, coronavirus, polymorphism, expression, inflammation

Дыхательная система человека — одна из самых доступных мишеней для целого ряда бактериальных, вирусных агентов, а также грибов [6]. Респираторное заболевание, вызванное новой генерацией штаммов семейства *Coronaviridae* и получившее в 2020 году официальное название — COVID-19 инфекции, потрясло человечество еще в 2019 году, а к 2020-му распространилось настолько, что приняло масштабы пандемии. Начавшись на уровне небольшого города Ухань одной из провинций Китайской Народной Республики, инфекция достигла широт, потребовавших новых подходов в лечении, организации, оптимизации предоставляемой медицинской помощи сотрудниками здравоохранения различных звеньев [27, 37, 40].

У большинства пациентов, инфицированных SARS-CoV-2, наблюдается легкое течение инфекционного процесса, относительно быстро купируемое неспецифическим симптоматическим и патогенетическим лечением, у некоторых же — состояние быстро ухудшается на фоне неконтролируемого воспалительного процесса, осложняющегося цитокиновым штормом, что

требует госпитализации пациента, в том числе и в отделение интенсивной терапии [35].

Факторами риска, отягчающими течение коронавирусной инфекции COVID-19, считаются: пожилой возраст пациента, беременность, такие состояния, как бронхиальная астма (БА), сердечно-сосудистые заболевания, сахарный диабет, повышенная масса тела и ожирение [20, 24]. Высокая вариабельность симптомов среди инфицированных пациентов приблизительно одной возрастной категории и с набором подобной сопутствующей патологии навела на мысль о существовании другой, не модифицируемой особенности организма, которая эти различия и будет обуславливать [37]. Поэтому на данный момент речь идет и о генетически обусловленных состояниях, которые так или иначе могут предопределять более тяжелый исход болезни.

Генетические полиморфизмы играют зачастую чуть ли не ключевую роль в восприимчивости/резистентности к различным инфекциям, в том числе и вирусной этиологии [33, 35, 37]. Всего в настоящее время было выявлено около 40 генов, связанных с повышенной восприимчивостью к

вирусным инфекциям, из них 21 ассоциирован с более тяжелыми исходами самой SARS-CoV-2-инфекции. Некоторые кодируют белковые молекулы Toll-подобных рецепторов, другие реализуют себя через С-лектины, третьи регулируют степень выработки ряда цитокинов [18].

С целью узнавания молекулярных структур (так называемых паттернов) патогенов и иммунной защиты от них в организме человека существует полиморфная, но довольно стройная система специфических сигнальных рецепторов (паттерн-распознающих рецепторов, PRR), которые экспрессируются в основном на поверхности клеток миелоидного ряда [28]. Эта функция отведена врожденной системе иммунитета, в частности разным классам Toll-подобных рецепторов (далее – TLR) – первая линия иммунной защиты. На данный момент идентифицировано по крайней мере 13 разновидностей данного семейства рецепторов (из них 10 принадлежащих человеку), каждая персонифицирована для узнавания того или иного структурного компонента чужеродного патогена [2, 12]. Разделены они на группы: трансмембранные структуры (TLR2, TLR4, TLR5, TLR6 и др.), а также внутриклеточные (TLR3, TLR7, TLR8) [28].

Так, для основного компонента клеточной стенки грамотрицательных бактерий – липополисахарида (LPS) в человеческом организме существует рецептор TLR4 [7]. Данный рецептор представляет особую ценность в качестве объекта изучения при новой коронавирусной инфекции, в связи с полученными ранее данными о влиянии LPS на патогенетические звенья SARS-CoV-2, а также были выявлены повышенные уровни косвенных маркеров системной эндотоксинемии у пациентов в остром периоде COVID-19 [8, 9]. TLR9 распознает метилированные пары динуклеотидов цитозин/гуанин (CpG), а также наряду с TLR 7-го и 8-го порядков – структуры капсида и генома вирусных агентов. TLR2 опознает пептидогликаны поверхности грамположительных бактерий, липоарабиноманнан (гликолипид, характерный для представителей рода микобактерий), липопротеины, липопептиды [2].

О роли полиморфизмов, а также нарушения экспрессии сигнальных Toll-рецепторов в качестве «предикторов более тяжелого течения и неблагоприятного прогноза клинических исходов» в литературе идет речь о сепсисе [11], бронхолегочных заболеваний различной этиологии (будь то острые респираторные вирусные инфекции [1] или БА [13, 15]), и даже внутриутробного инфицирования и ассоциированных с ним преждевременных родов [3]. Один из вариантов модифицированного Toll-рецептора 3-й группы

ассоциирован с некоторыми аутоиммунными заболеваниями, в частности аутоиммунным гипотиреозом и болезнью Аддисона [29]. Модификации гена TLR – Arg753Gln и T597C обнаружили среди пациентов, страдающих инфекцией, вызванной *Candida albicans*, *M. tuberculosis*, цитомегаловирусом, а также вирусом герпеса простого 2 типа [26, 38, 41]. Полиморфизмы TLR9 – G1174A, G1635A, A2848G ассоциированы с системной красной волчанкой, инфекцией, вызванной HIV-1 и многими другими заболеваниями [14, 23]. Популяционные исследования, изучающие связь наличия полиморфизмов и изменений в степени иммунной резистентности, проводились в отношении и таких инфекционных заболеваний, как лейшманиоз, малярия, филяриоз и многих других [28]. Самыми значимыми однонуклеотидными полиморфизмами считают: I602S (TLR1), R677W (TLR2), P554S (TLR3), D299G (TLR4), F616L (TLR5), S249P (TLR6), Q11L (TLR7), M1V (TLR8), G1174A (TLR9), G1031T (TLR10) [21]. В связи с вышесказанным, Toll-подобные рецепторы с недавнего времени начали рассматривать не только как предикторы неблагоприятного прогноза, но и как мишени при разработке противовирусных препаратов [5, 25].

Восприимчивость к инфекции COVID-19, развитие самого инфекционного процесса, а также тяжесть течения ассоциированы с полиморфизмами генов следующих звеньев иммунной системы: Toll-подобные рецепторы (TLR), человеческий лейкоцитарный антиген (HLA) I и II классов, цитокины и хемокины, а также клеточные структуры, принимающие непосредственное участие в связывании вирусной частицы и проникновении ее в клетку хозяина – ангиотензин-превращающий фермент-2 (ACE2) и трансмембранная сериновая протеаза (TMPRSS) [9, 10, 36].

В X-хромосоме существует ряд генов и регуляторных элементов врожденного и приобретенного (адаптивного) иммунитета. Речь идет также и о гене, кодирующий синтез TLR7, который наряду с TLR 3-го типа играет отправную роль в распознавании вирусной РНК и инициации синтеза интерферона. Имеются немногочисленные, однако справедливые данные, чтобы полагать, что низкая экспрессия данного гена, влекущая за собой сниженную продукцию и активность интерферонов I и II, будет ассоциирована с тяжелыми формами инфекции COVID-19 у мужчин и, соответственно, более высокой смертности среди мужского пола по сравнению с женским [39].

Однако на данный момент было выяснено, что не только степень экспрессии генов соответствующих рецепторов будет влиять на тяжесть и фор-

му течения инфекции COVID-19, но и их генетически обусловленный полиморфизм. К такому выводу пришли, учитывая, что не только пациенты с комплексом известных факторов риска пережили тяжелые формы заболевания, но подобное встречалось и среди пациентов средних лет с отсутствием до госпитализации каких-нибудь значимых предрасполагающих факторов [30, 44].

Так, в исследовании допандемического периода, среди 112 пациентов (63 из которых с неосложненным течением и 49 – грипп-ассоциированной пневмонией) было проведено генетическое исследование с помощью полимеразной цепной реакции с олигонуклеотидными праймерами, в результате чего выяснилось, что у пациентов как с неосложненной формой, так и с грипп-ассоциированной пневмонией были обнаружены комбинации мутаций генотипов Toll-рецепторов 2-го, 3-го и 4-го порядков; достоверно чаще среди заболевших выявляется мутантный аллель 299Gly TLR-4 и комбинации полиморфизмов Arg753Gln TLR-2, Leu412Phe TLR-3, Asp299Gly TLR-4; а частота 412Phe TLR-3 была выше среди пациентов с осложненной формой гриппозной инфекции [31].

К сожалению, сам механизм, обуславливающий степень тяжести течения инфекционного процесса, вследствие генетической поломки далеко не всегда известен, на данный момент достоверным считается исключительно наличие таких ассоциаций. Так, на основании одного исследования, проведенного среди 1319 итальянцев с подтвержденной ПЦП SARS-CoV-2 вызванной инфекцией, у пациентов экспериментальной группы среди вариантов рецептора TLR 3-го порядка был определен функциональный полиморфизм L412F (rs3775291; c.1234C>T); статистически значимо считать его одним из «факторов тяжести» ковидной инфекции, который обуславливает высокую восприимчивость и риск тяжелого исхода, вплоть до летального. Экспериментальной группой считались пациенты, нуждающиеся в эндотрахеальной интубации и искусственной вентиляции легких (ИВЛ), или респираторной поддержке с помощью CPAP/ViPAP, контрольная группа – пациенты, не нуждающиеся в госпитализации, с легкими симптомами или вовсе без них [37].

Проникая в клетку, SARS-CoV-2, помимо цитоплазматических РНК-рецепторов, связывается и с эндосомальными Toll-рецепторами 3-го и 7-го, а также 8-го и 9-го порядков, играющих центральную роль в распознавании вирусной РНК. За этим следует продукция интерферона – одного из основных субстанций противовирусной врожденной защиты – I и II типов и большое

количество ряда провоспалительных цитокинов – TNF α , IL-1 и IL-6. Передача сигналов от белковых субстанций на поверхности клеток происходит за счет фактора транскрипции «каппа-бета» (NF- κ B) и интерферона (INF) – регуляторного фактора 2 (IRF3). Именно за счет активации этих компонентов и реализуется синтез необходимых цитокинов и сама иммунная реакция [19, 22, 23, 37].

Полиморфизм генов, кодирующих данные молекулы, должен снижать экспрессию самого рецептора на поверхности иммунокомпетентных клеток, и, как следствие, приводить к ухудшению распознавания самого вируса, что необходимо для индукции иммунных процессов с целью элиминации патогена из организма. Кроме того, данный полиморфизм снижает продукцию TNF α . Фактор некроза опухоли-альфа продуцируется иммунокомпетентными клетками, в частности моноцитами и макрофагами и многими другими; при инфекционном процессе в организме участвует в реакциях деструкции и одновременно репарации; индуцирует процесс аутофагии, выполняя защитную роль [37].

Индуцируемый фактором некроза опухоли альфа процесс аутофагии (один из основных механизмов защиты клеток во время инфекционного процесса) также будет нарушен. Аутофагия является физиологическим процессом, который позволяет клеткам организма адекватно реагировать на повреждение путем разрушения и элиминации дисфункциональных органелл, агрегатов неправильно свернутых белков, а также микроорганизмов. В ответ на повреждение клеточные компоненты, заключенные в аутофагосомальную вакуоль, подвергаются разрушению и переработке с выделением АТФ и поддержания основных клеточных функций уцелевших соседних структур. Как было сказано ранее, в этом процессе участвует и TNF α , наряду с некоторыми интерлейкинами и соответствующим пулом иммунных клеток [21, 32, 42]. Таким образом, ингибирование данного процесса приводит к накоплению нелизированных аутофагосом и блокаде вирусного клиренса. Все это, накладываясь поверх иммунной дисфункции и неадекватного количества воспалительных цитокинов, обуславливает еще более тяжелую форму инфекции COVID-19 у пациентов данной категории [37].

Статистически определено, что более высокая частота встречаемости аллелей полиморфизма, речь о котором шла выше, наблюдалась у европейцев и азиатов (около 30,01% и 25,97% соответственно), гораздо меньшая распространенность среди популяции африканских стран (в основном к югу от Сахары; до 0,88%) [37].

Ангиотензин 1-7 продуцируется в здоровом организме на постоянном уровне в почках, а также в легких; играет роль локального иммуносупрессора (ингибирует инфильтрацию воспалительными клетками), регулирует выделение противовоспалительных, а также снижает выработку провоспалительных цитокинов – IL-6 и TNF α , нормализует уровень NF- κ B, снижая, таким образом, силу воспалительного ответа в целом. Реализует противовоспалительную функцию он за счет ингибирующего действия на Toll-подобный рецептор 4 вариации /MAPK/NF- κ B. Из этого следует, что те этнические группы, например населения Ирана, среди которых наиболее распространены определенные однонуклеотидные полиморфизмы в генах TLR4, будут в большей степени подвержены тяжелым клиническим исходам вследствие инфицирования, в том числе и SARS-CoV-2 [4, 17, 34, 43].

С такими модификациями TLR4, как Asp299Gly и Thr399Ile, среди выборки пациентов из Египта, выявлена взаимосвязь с тяжестью самой инфекции (вследствие неконтролируемого воспаления), чрезмерно повышенным уровнем цитокинов в крови пациента (в частности высокие показатели IL-6, а также хемокинов и интерферонов, и, как следствие, формирование цитокинового шторма с исходом в ОРДС), а также более высоким риском летального исхода [35].

Крупный анализ литературы по вопросу «роль генетики и генетически-опосредованная степень тяжести инфекционных заболеваний, в частности новой коронавирусной COVID-19 инфекции» демонстрирует, что не только мутации определенного вида TLR обуславливают тяжесть клиники и состояния пациента после заражения инфекцией. Существуют сообщения и о «поломках» в генах, кодирующих элементы сигнальных

путей, а также так называемых адаптеров Toll-рецепторов. К таким относятся, например, TRIF, TRAF3 и TBK1 – своеобразные посредники между активированным Toll-рецептором и факторами, продуктами иммунного ответа, а также структурами их синтезирующими. Сообщается также и о мутациях, связанных с генами MxA, ингибирующими внутриклеточный транспорт проникшего вируса, и OAS-1, ингибирующего трансляцию вирусных белковых структур [18].

Заключение

Накопленный на данный момент опыт изучения влияния однонуклеотидных полиморфизмов генов, кодирующих ключевые молекулы врожденного иммунитета, на вариабельность клинической картины SARS-CoV-2, в перспективе должен помочь выделить группы пациентов с высоким риском тяжелого течения и летального исхода, однако все же требуется дальнейшее углубленное изучение данного направления в различных популяциях. К тому же, в связи с колоссальным количеством переболевших COVID-19, значительный интерес представляет исследование зависимости проявления постковидного периода от наличия однонуклеотидных полиморфизмов генов, кодирующих Toll-подобные рецепторы. Особо ценными данные исследования могут стать также и потому, что, к сожалению, исключить риск появления новых штаммов, возможно, и более вирулентных и, соответственно, потому более тяжело поддающихся лечению, мы не можем, так что дальнейшее изучение этого направления могут в будущем обусловить лучшую подготовленность медицинских кадров при встрече с новыми формами патогенов.

Список литературы / References

1. Буданова Е.В., Свитич О.А., Шуленина Е.А., Зверев В.В. Ассоциация экспрессии генов врожденного иммунитета TLR2, TLR4, TLR9 с течением острой респираторной инфекции, вызванной *klebsiella pneumoniae in vivo* // Медицинская иммунология, 2018. Т. 20, № 3. С. 425-430. [Budanova E.V., Svitich O.A., Shuleniina E.A., Zverev V.V. Association of TLR2, TLR4, TLR9 gene expression related to innate immunity with *in vivo* acute respiratory infections caused by *klebsiella pneumoniae*. *Meditinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2018, Vol. 20, no. 3, pp. 425-430. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2018-3-425-430.
2. Бурместер Г.Р., Пецутто А. Наглядная иммунология. М.: Лаборатория знаний, 2022. 320 с. [Burmester G.R., Petsutto A. Visual immunology]. Moscow: Laboratoriya znaniy, 2022. 320 p.
3. Ганковская О.А. Исследование ассоциации полиморфных маркеров генов TLR2 и TLR9 с преждевременными родами и внутриутробным инфицированием // Медицинская иммунология, 2010. Т. 12, № 1-2. С. 87-94. [Gankovskaya O.A. Association studies between polymorphic markers TLR2 AND TLR9 preterm delivery and intrauterine infections. *Meditinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2010, Vol. 12, no. 1-2, pp. 87-94. (In Russ.)] doi:10.15789/1563-0625-2010-1-2-.

4. Литвинов А.С., Савин А.В., Кухтина А.А. Долгосрочные перспективы внелегочного персистенция коронавируса SARS-CoV-2 // Медицина, 2020. Т. 8, № 1. С. 51-73. [Litvinov A.S., Savin A.V., Kukhtina A.A. Long-term prospects for extrapulmonary persistence of SARS-CoV-2 coronavirus. *Meditsina = Medicine*, 2020, Vol. 8, no. 1, pp. 51-73. (In Russ.)]
5. Никонова А.А., Хаитов М.Р., Хаитов Р.М. Перспективы использования агонистов и антагонистов Toll-подобных рецепторов для профилактики и лечения вирусных инфекций // Медицинская иммунология, 2019. Т. 21, № 3. С. 397-406. [Nikonova A.A., Khaitov M.R., Khaitov R.M. Prospects of Toll-like receptor agonists and antagonists for prevention and treatment of viral infections. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2019, Vol. 21, no. 3, pp. 397-406. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2019-3-397-406.
6. Царев С.В., Хаитов М.Р. Роль респираторных вирусов при бронхиальной астме // Российский медицинский журнал, 2009. № 2. С. 136-139. [Tsarev S.V., Khaitov M.R. The role of respiratory viruses in bronchial asthma. *Rossiyskiy meditsinskiy zhurnal = Medical Journal of the Russian Federation*, 2009, no. 2, pp. 136-139. (In Russ.)]
7. Яковлев М.Ю. Системная эндотоксинемия. Гомеостаз и общая патология. М.: Наука, 2021. 184 с. [Yakovlev M.Yu. Systemic endotoxemia. Homeostasis and general pathology]. Moscow: Nauka, 2021. 184 p.
8. Яцков И.А., Белоглазов В.А., Ряпова Э.И. Липополисахарид и ОРДС, вызванный новой коронавирусной инфекцией: гипотезы и факты // Медицинская иммунология, 2022. Т. 24, № 1. С. 7-18. [Yatskov I.A., Beloglazov V.A., Ryapova E.I. Lipopolysaccharide and ARDS caused by new coronavirus infection: hypotheses and facts. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2022, Vol. 24, no. 1, pp. 7-18. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-LAA-2229.
9. Яцков И.А., Белоглазов В.А., Кубышкин А.В., Николаева А.П., Зяблицкая Е.Ю., Куницкая Ю.Е., Лавренчук Э.Н. Концентрация липополисахарид-связывающего белка и пресепсина у пациентов с вирусным поражением легких SARS-CoV-2, проживающих в Республике Крым // Пульмонология, 2022. Т. 32, № 2. С. 162-170. [Yatskov I.A., Beloglazov V.A., Kubyshekin A.V., Nikolaeva A.P., Zyablitskaya E.Yu., Kunitskaya J.E., Lavrenchuk E.N. Lipopolysaccharide-binding protein and presepsin in patients with SARS-CoV-2 viral lung disease in the Republic of Crimea. *Pulmonologiya = Russian Pulmonology*, 2022, Vol. 32, no. 2, pp. 162-170. (In Russ.)]
10. Anastassopoulou C., Gkizarioti Z., Patrinos G.P., Tsakris A. Human genetic factors associated with susceptibility to SARS-CoV-2 infection and COVID-19 disease severity. *Hum. Genomics*, 2020, Vol. 14, no. 1, 40. doi: 10.1186/s40246-020-00290-4.
11. Armstrong L., Medford A.R.L., Hunter K.J., Uppington K.M., Millar A.B. Differential expression of Toll-like receptor (TLR)-2 and TLR-4 on monocytes in human sepsis. *Clin. Exp. Immunol.*, 2004, Vol. 136, no. 2, pp. 312-319.
12. Beutler B.A. TLRs and innate immunity. *Blood*, 2009, Vol. 113, no. 7, pp. 1399-1407.
13. Bezemer G.F.G., Sagar S., van Bergenhenegouwen J., Georgiou N.A., Garssen J., Kraneveld A.D., Folkerts G. Dual role of Toll-like receptors in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Pharmacol. Rev.*, 2012, Vol. 64, no. 2, pp. 337-358.
14. Bochud P.Y., Hersberger M., Taffé P., Bochud M., Stein C.M., Rodrigues S.D., Calandra T., Francioli P., Telenti A., Speck R.F., Aderem A., Swiss HIV Cohort Study. Polymorphisms in Toll-like receptor 9 influence the clinical course of HIV-1 infection. *AIDS*, 2007, Vol. 21, no. 4, pp. 441-446.
15. Crespo-Lessmann A., Mateus E., Vidal S., Ramos-Barbón D., Torrejón M., Giner J., Soto L., Juárez C., Plaza V. Expression of toll-like receptors 2 and 4 in subjects with asthma by total serum IgE level. *Respir. Res.*, 2016, Vol. 17, pp. 2-8.
16. Debnath M., Banerjee M., Berk M. Genetic gateways to COVID-19 infection: Implications for risk, severity, and outcomes. *FASEB J.*, 2020, Vol. 34, no. 7, pp. 8787-8795.
17. Devaux C.A., Rolain J-M, Raoult D. ACE2 receptor polymorphism: susceptibility to SARS-CoV-2, hypertension, multi-organ failure, and COVID-19 disease outcome. *J. Microbiol. Immunol. Infect.*, 2020, Vol. 53, no. 3, pp. 425-435.
18. Elhabyan A., Elyaacoub S., Sanad E., Abukhadra A., Elhabyan A., Dinu V. The role of Host Genetics in susceptibility to severe viral infections in humans and INSIGHTS into host genetics of severe COVID-19: A systematic review. *Virus Res.*, 2020, Vol. 289, 198163. doi: 10.1016/j.virusres.2020.198163.
19. Freeman T.L., Swartz T.H. Targeting the NLRP3 Inflammasome in Severe COVID-19. *Front. Immunol.*, 2020, Vol. 11, 1518. doi: 10.3389/fimmu.2020.01518.
20. Gebhard C., Regitz-Zagrosek V., Neuhauser, H.K., Morgan R., Klein S.L. Impact of sex and gender on COVID-19 outcomes in Europe. *Biol. Sex Differ.*, 2020, Vol. 11, no. 1, 29. doi: 10.1186/s13293-020-00304-9.
21. Guo L., Yu H., Gu W., Luo X., Li R., Zhang J., Xu Y., Yang L., Shen N., Feng L., Wang Y. Autophagy negatively regulates transmissible gastroenteritis virus replication. *Sci. Rep.*, 2016, Vol. 6, 23864. doi: 10.1038/srep23864.
22. Hadjadj J., Yatim N., Barnabei L., Corneau A., Boussier J., Smith N., Péré H., Charbit B., Bondet V., Chenevier-Gobeaux C., Breillat P., Carlier N., Gauzit R., Morbieu C., Pène F., Marin N., Roche N., Szebel T.-A., Merklings S.H., Treluyer J.-M., Veyer D., Mouthon L., Blanc C., Tharaux P.-L., Rozenberg F., Fischer A., Duffy D., Rieux-Laucat F., Kernéis S., Terrier B. Impaired type I interferon activity and inflammatory responses in severe COVID-19 patients. *Science*, 2020, Vol. 369, no. 6504, pp. 718-724.

23. Hur J.W., Shin H.D., Park B.L., Kim L.H., Kim S-Y., Bae S-C. Association study of Toll-like receptor 9 gene polymorphism in Korean patients with systemic lupus erythematosus. *Tissue Antigens*, 2005, Vol. 65, no. 3, pp. 266-270.
24. Izquierdo J.L., Ancochea J., Soriano J.B. Clinical characteristics and prognostic factors for intensive care unit admission of patients with COVID-19: retrospective study using machine learning and natural language processing. *J. Med. Internet Res.*, 2020, Vol. 22, no. 10, e21801. doi: 10.2196/21801.
25. Kawai T., Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: Update on Toll-like receptors. *Nat. Immunol.*, 2011, Vol. 11, no. 5, pp. 373-384.
26. Kijpittayarit S., Eid A.J., Brown R.A., Paya C.V., Razonable R.R. Relationship between Toll-like receptor 2 polymorphism and cytomegalovirus disease after liver transplantation. *Clin. Infect. Dis.*, 2007, Vol. 44, no. 10, pp. 1315-1320.
27. Lu R., Zhao X., Li J., Niu P., Yang B., Wu H., Wang W., Song H., Huang B., Zhu N., Bi Y., Ma X., Zhan F., Wang K., Hu T., Hu Z., Zhou W., Zhao L., Chen J., Meng Y., Wang J., Lin Y., Yuan J., Xie Z., Ma J., Liu W.J., Wang D., Xu W., Holmes E.C., Gao G.F., Wu G., Chen W., Shi W., Tan W. Genomic characterization and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. *Lancet*, 2020, Vol. 395, no. 10224, pp. 565-574.
28. Mukherjee S., Huda S., Sinha Babu S.P. Toll-like receptor polymorphism in host immune response to infectious diseases: A review. *Scand J. Immunol.*, 2019, Vol. 90, no. 1, e12771. doi: 10.1111/sji.12771.
29. Nahum A., Dadiac H., Batesac A., Roifman C.M. The biological significance of TLR3 variant, L412F, in conferring susceptibility to cutaneous candidiasis, CMV and autoimmunity. *Autoimmun. Rev.*, 2012, Vol. 11, no. 5, pp. 341-347.
30. Nakeshbandi M., Maini R., Daniel P., Rosengarten S., Parmar P., Wilson C., Kim J.M., Oommen A., Mecklenburg M., Salvani J., Joseph M.A., Breitman I. The impact of obesity on COVID-19 complications: a retrospective cohort study. *Int. J. Obes (Lond.)*, 2020, Vol. 44, no. 9, pp. 1832-1837.
31. Pryimenko N.O., Kotelevska T.M., Koval T.I., Syzova L.M., Dubynska H.M., Kaidashev I.P. Genetic polymorphism ARG753GLN of TLR-2, LEU412PHE of TLR-3, ASP299GLY of TLR-4 in patients with influenza and influenza-associated pneumonia. *Wiad. Lek.*, 2019, Vol. 72, no. 12, pp. 2324-2328.
32. Prentice E., Jerome W.G., Yoshimori T., Mizushima N., Denison M.R. Coronavirus replication complex formation utilizes components of cellular autophagy. *J. Biol. Chem.*, 2004, Vol. 279, no. 11, pp. 10136-10141.
33. Ramos-Lopez O., Daimiel L., Ramirez de Molina A., Martinez-Urbistondo D., Vargas J.A., Martinez J.A. Exploring host genetic polymorphisms involved in SARS-CoV infection outcomes: implications for personalized medicine in COVID-19. *Int. J. Genomics*, 2020, Vol. 2020, 6901217. doi: 10.1155/2020/6901217.
34. Santos R.O.S., Sampaio W.O., Alzamora A.C., Motta-Santos D., Alenina N., Bader M., Campagnole-Santos M.J. The ACE 2/Angiotensin-(1-7)/MAS axis of the renin-angiotensin system: Focus on angiotensin-(1-7). *Physiol. Rev.*, 2018, Vol. 98, no. 1, pp. 505-553.
35. Taha S.I., Shata A.K., Baioumy S.A., Fouad S.H., Anis S.G., Mossad I.M., Moustafa N.M., Abdou D.M., Youssef M.K. Toll-like receptor 4 polymorphisms (896A/G and 1196C/T) as an indicator of COVID-19 severity in a convenience sample of Egyptian patients. *J. Inflamm. Res.*, 2021, Vol. 2021, no. 14, pp. 6293-6303.
36. SeyedAlinaghi S., Mehrtak M., MohsseniPour M., Mirzapour P., Barzegary A., Habibi P., Moradmand-Badie B., Masoud Afsahi A., Karimi A., Heydari M., Mehraeen E., Dadras O., Sabatier J.-M., Voltarelli F. Genetic susceptibility of COVID-19: a systematic review of current evidence. *Eur. J. Med. Res.*, 2021, Vol. 26, no. 1, 46. doi: 10.1186/s40001-021-00516-8.
37. Croci S., Venneri M.A., Mantovani S., Fallerini C., Benetti E., Picchiotti N., Campolo F., Imperatore F., Palmieri M., Daga S., Gabbi C., Montagnani F., Beligni G., Farias T.D.J., Carriero M.L., Sarno L.D., Alaverdian D., Aslaksen S., Cubellis M.V., Spiga O., Baldassarri M., Fava F., Norman P.J., Frullanti E., Isidori A.M., Amoroso A., Mari F., Furini S., Mondelli M.U., Multicenter Study G.-C., Chiariello M., Renieri A., Meloni I. The polymorphism L412F in TLR3 inhibits autophagy and is a marker of severe COVID-19 in males. *Autophagy*, 2022, Vol. 18, no. 7, pp. 1662-1672.
38. Thuong N.T.T., Hawn T.R., Thwaites G.E., Chau T.T.H., Lan N.T.N., Quy H.T., Hieu N.T., Aderem A., Hien T.T., Farrar J.J., Dunstan S.J. A polymorphism in human TLR2 is associated with increased susceptibility to tuberculous meningitis. *Genes Immun.*, 2007, Vol. 8, no. 5, pp. 422-428.
39. van der Made C.I., Simons A., Schuurs-Hoeijmakers J., van den Heuvel G., Mantere T., Kersten S., van Deuren R.C., Stehouwer M., van Reijmersdal S.V., Jaeger M., Hofste T., Astuti G., Galbany J.C., van der Schoot V., van der Hoeven H., Wanda Hagmolen Of Ten Have, Klijn E., van den Meer C., Fiddelaers J., de Mast Q., Bleeker-Rovers C.P., Joosten L.A.B., Yntema H.G., Gilissen C., Nelen M., van der Meer J.W.M., Brunner H.G., Netea M.G., van de Veerdonk F.L., Hoischen A. Presence of Genetic Variants Among Young Men With Severe COVID-19. *JAMA*, 2020, Vol. 324, no. 7, pp. 663-673.
40. WHO. WHO director-general's opening remarks at the media briefing on COVID-19, 2020. Available at: <https://www.who.int/dg/speeches/detail/who-director-general-s-opening-remarks-at-the-media-briefing-on-covid-19>.

41. Woehrle T., Du W., Goetz A., Hsu H.-Y., Joos T.O., Weiss M., Bauer U., Brueckner U.B., Schneider E.M. Pathogen specific cytokine release reveals an effect of TLR2 Arg753Gln during Candida sepsis in humans. *Cytokine*, 2008, Vol. 41, no. 3, pp. 322-329.
42. Yin Z., Pascual C., Klionsky D.J. Autophagy: machinery and regulation. *Microb. Cell*, 2016, Vol. 3, no. 12, pp. 588-596.
43. Zakeri S., Pirahmadi S., Mehrizi A.A., Djadid N.D. Genetic variation of TLR-4, TLR-9 and TIRAP genes in Iranian malaria patients. *Malar. J.*, 2011, Vol. 10, 77. doi: 10.1186/1475-2875-10-77.
44. Zhou F., Yu T., Du R., Fan G., Liu Y., Liu Z., Xiang J., Wang Y., Song B., Gu X., Guan L., Wei Y., Li H., Wu X., Xu J., Tu S., Zhang Y., Chen H., Cao B. Clinical course and risk factors for mortality of adult inpatients with COVID-19 in Wuhan, China: a retrospective cohort study. *Lancet*, 2020, Vol. 395, no. 10229, pp. 1054-1062.

Авторы:

Белоглазов В.А. — д.м.н., профессор, заведующий кафедрой внутренней медицины № 2, Институт «Медицинская академия имени С.И. Георгиевского» ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет имени В.И. Вернадского», г. Симферополь, Республика Крым, Россия

Яцков И.А. — ассистент кафедры внутренней медицины № 2, Институт «Медицинская академия имени С.И. Георгиевского» ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет имени В.И. Вернадского», г. Симферополь, Республика Крым, Россия

Камшиев А.А. — студентка кафедры внутренней медицины № 2, Институт «Медицинская академия имени С.И. Георгиевского» ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет имени В.И. Вернадского», г. Симферополь, Республика Крым, Россия

Агзамова Ю.М. — студентка кафедры внутренней медицины № 2, Институт «Медицинская академия имени С.И. Георгиевского» ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет имени В.И. Вернадского», г. Симферополь, Республика Крым, Россия

Authors:

Beloglazov V.A., PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Department of Internal Medicine No. 2, S. Georgievsky Medical Academy, V. Vernadsky Crimea Federal University, Simferopol, Republic of Crimea, Russian Federation

Yatskov I.A., Assistant Professor, Department of Internal Medicine No. 2, S. Georgievsky Medical Academy, V. Vernadsky Crimea Federal University, Simferopol, Republic of Crimea, Russian Federation

Kamshiy A.A., Student, Department of Internal Medicine No. 2, S. Georgievsky Medical Academy, V. Vernadsky Crimea Federal University, Simferopol, Republic of Crimea, Russian Federation

Agzamova Yu.M., Student, Department of Internal Medicine No. 2, S. Georgievsky Medical Academy, V. Vernadsky Crimea Federal University, Simferopol, Republic of Crimea, Russian Federation

Поступила 07.11.2022

Отправлена на доработку 08.11.2022

Принята к печати 16.02.2023

Received 07.11.2022

Revision received 08.11.2022

Accepted 16.02.2023

К НЕКОТОРЫМ АСПЕКТАМ ИММУНОСУПРЕССОРОВ И ИХ АЭРОЗОЛЬНОЙ ДОСТАВКЕ В ЛЕГКИЕ ПРИ ЛЕЧЕНИИ COVID-19

Кобылянский В.И.

ФГБУ «Научно-исследовательский институт пульмонологии Федерального медико-биологического агентства России», Москва, Россия

Резюме. Ключевым патогенетическим звеном COVID-19 являются нарушения иммунного гомеостаза, которые часто проявляются гипериммунным ответом на патоген, приводящим к тяжело-му неконтролируемому воспалению в легких, осложнениям и летальному исходу. Соответственно, определенный терапевтический потенциал заложен в средствах разных фармакологических групп с различными механизмами действия, но имеющими некоторую общность по направленности подавления иммунного ответа, что не редко отражено в классификациях объединяющим понятием иммуносупрессоры. Наиболее перспективными из них являются иммунобиологические препараты, к которым относятся моноклональные антитела, а также средства пуринаргической регуляции. Имеются единичные попытки использования путем применения определенного подхода «классических» иммуносупрессоров, цитостатиков и ингибиторов кальциневрина, нашедших место в трансплантологии и онкологии, но от применения, которых с целью лечения неконтролируемого воспаления дыхательных путей отказались еще в конце прошлого столетия. Аэрозольный путь введения лекарственных средств оптимизирует лечение как по эффективности их воздействия, так и по уменьшению побочных эффектов и находит соответствующее применение при использовании ИС с целью лечения неконтролируемого воспаления дыхательных путей. Однако анализ возможностей подобного спектра иммуносупрессоров и их аэрозольной доставки в легкие при лечении COVID-19 не осуществлялся, что и явилось целью настоящей работы.

Анализ в методологическом плане проводился с использованием различных баз данных биомедицинской научной информации, включая такие, как: Index Medicus, PubMed, Embase, Cochrane реестр клинических исследований Clinical Trials gov и патентные базы.

В результате дана оценка эффективности воздействия различных подгрупп ИС при COVID-19, в том числе при ингаляционном их введении в дыхательные пути. Проанализирована роль центрального регулятора иммунного ответа, регуляторных Т-клеток в патогенезе COVID-19, охарактеризован их терапевтический потенциал в зависимости от фазы и тяжести заболевания, дозы препарата. Отражены методы и подходы использования иммуносупрессоров, преимущества и недостатки. Определены целесообразность и перспективы их применения.

Адрес для переписки:

Кобылянский Вячеслав Иванович
ФГБУ «Научно-исследовательский институт
пульмонологии Федерального медико-биологического
агентства России»
115682, Россия, Москва, Ореховый б-р, 28.
Тел./факс: 8 (495) 395-62-93.
E-mail: kobylyansky@mail.ru

Address for correspondence:

Vyacheslav I. Kobylyansky
Research Institute of Pulmonology, Federal Medical
and Biological Agency of Russia
28 Orekhovy Blvd
Moscow
115682 Russian Federation
Phone/fax: +7 (495) 395-62-93.
E-mail: kobylyansky@mail.ru

Образец цитирования:

В.И. Кобылянский «К некоторым аспектам
иммуносупрессоров и их аэрозольной доставке в легкие
при лечении COVID-19» // Медицинская иммунология,
2023. Т. 25, № 6. С. 1307-1318.
doi: 10.15789/1563-0625-SRO-2613

© Кобылянский В.И., 2023
Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

V.I. Kobylyansky "Some reflections on immunosuppressants
and their delivery to the lungs by aerosol in the treatment
of COVID-19", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya
Immunologiya, 2023, Vol. 25, no. 6, pp. 1307-1318.
doi: 10.15789/1563-0625-SRO-2613

© Kobylyansky V.I., 2023
The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License
DOI: 10.15789/1563-0625-SRO-2613

В заключении отмечается, что эффективность цитостатиков и ингибиторов кальциневрина при лечении воспаления дыхательных путей при COVID-19 остается неподтвержденной и бесперспективной. Большие надежды в этом плане подают биологические препараты, включая моноклональные антитела и средства пуринаргической регуляции.

Ключевые слова: COVID-19, воспаление, цитокины, цитостатики, ингибиторы кальциневрина, иммуносупрессоры, моноклональные антитела, пуринаргическая регуляция, аэрозоль, регуляторные T-клетки

SOME REFLECTIONS ON IMMUNOSUPPRESSANTS AND THEIR DELIVERY TO THE LUNGS BY AEROSOL IN THE TREATMENT OF COVID-19

Kobylyansky V.I.

Research Institute of Pulmonology, Federal Medical and Biological Agency of Russia, Moscow, Russian Federation

Abstract. Disorders of immune homeostasis represent the key pathogenetic link of COVID-19, which often manifests as a hyperimmune response to the pathogen, leading to severe uncontrolled inflammation in lungs, followed by complications and death. Accordingly, a certain therapeutic potential is provided by different pharmacological drugs with distinct mechanisms of action, This class of drugs should, however, act in common direction by suppressing the immune response, thus being often classified as immunosuppressants (IS). Of them, the most promising are immunobiological preparations, which include monoclonal antibodies, as well as purinergic regulatory agents. There are several attempts to use the “classical” IS by a certain way, e.g., cytostatics and calcineurin inhibitors which found clinical application in transplantology and oncology. However, their usage for treatment of uncontrolled inflammation of respiratory tract was abandoned by the end of XX century. Meanwhile, the aerosol route of drug administration optimizes treatment, both in terms of their effectiveness, and the reduction of side effects thus promoting usage of IS for treatment of uncontrolled airway inflammation. Previously, the analysis of therapeutic opportunities for some IS delivered as aerosols to the lungs in COVID-19 therapy was not carried out, thus being the purpose of our work. Methodological analysis was carried out using various databases of biomedical scientific information, including Index Medicus, PubMed, Embase, Cochrane Clinical Trials gov registry and patent databases.

The efficiency of the impact of various IS subgroups in COVID-19, including their administration by inhalations into the respiratory ways, was assessed. The role of regulatory T cells considered the central regulator of immune response, in pathogenesis of COVID-19 was considered, and their therapeutic potential was characterized, dependent on phase and severity of the disease as well as drug dose dependence. Methods and approaches to the use of IP, advantages and disadvantages are discussed. The expediency and future prospects of their application are considered.

One may conclude that the effectiveness of cytostatics and calcineurin inhibitors in the treatment of airway inflammation in COVID-19 remains unconfirmed and seems to be unpromising. Meanwhile, biological preparations, including monoclonal antibodies and purinergic regulatory agents, offer great promise in this respect.

Keywords: COVID-19, inflammation, cytokines, cytostatics, calcineurin inhibitors, immunosuppressants, monoclonal antibodies, purinergic regulation, aerosol, regulatory T cells

Введение

Способность SARS-CoV-2 вызывать тяжелую иммунно-воспалительную реакцию обуславливает трудно контролируемое лечение, длительные госпитализации и высокий уровень смертности. Характерной особенностью патогенеза COVID-19 является наличие повышения уровня цитокинов, нередко до критического уровня [1, 28]. Подобное состояние обуславливает системное повреждение микрососудов с полиорганной недостаточностью и выраженный острый респи-

раторный дистресс-синдром с высокой летальностью [27]. Более 50% пациентов COVID-19 нуждаются в респираторной поддержке из-за подобного иммунного ответа, предрасполагающего к развитию тяжелой распространенной пневмонии [21]. Поэтому стратегия лечения COVID-19, помимо противовирусной, предусматривает направленность на купирование медиаторов воспаления и требует совершенствования в этом плане, так как имеющиеся способы и подходы не удовлетворяют клиницистов.

С этой позиции интерес представляют различные классы химических соединений и биологические препараты, обладающие разными механизмами действия и степенью влияния на те или иные звенья иммуногенеза и позволяющие его корректировать, оказывая супрессивный эффект, в результате чего их и относят к иммуносупрессорам (ИС) [5]. Обычно ими считают препараты, применяемые с 1950-х годов в трансплантологии и для химиотерапии, а также используемые в ревматологии для лечения васкулитов, псориатического артрита и волчаночного нефрита. Ими являются цитостатики, включая алкирующие соединения (например, циклофосфамид, мелфалан), антиметаболиты (метотрексат) и ингибиторы кальциневрина (циклоспорин). Согласно существующим классификациям, к ИС относят также биологические препараты, включая моноклональные антитела (МКАТ), в частности тоцилизумаб, а также средства пуринергической регуляции (СПР), в том числе аденозин, и другие, учитывая подобную их направленность действия, обеспечивающую подавление гипериммунной реакции со стороны органа-мишени на патоген. И если анализ возможностей использования некоторых ИС относительно коррекции неконтролируемого воспаления в дыхательных путях (ДП), имеющего место при тяжелой бронхиальной астме, недавно проведены [2], то касательно COVID-19 он не осуществлялся.

Целью настоящей работы явился анализ эффективности ИС из разных групп фармакологических препаратов и их аэрозольной доставки в

легкие при лечении COVID-19 и оценка целесообразности и перспективности их использования.

Для анализа использовались литературные источники, включая оригинальные исследования и обзорные работы, найденные в базах данных PubMed, Embase, Cochrane, Index Medicus, открытых источниках по патентам, а также Clinical Trials.gov с использованием таких ключевых слов и словосочетаний, как COVID-19, воспаление, цитокины, цитостатики, ингибиторы кальциневрина, иммуносупрессоры, моноклональные антитела, пуринергическая регуляция, аэрозоль, регуляторные Т-клетки. В анализ были включены 60 публикации (рис. 1). Анализировались полнотекстовые литературные источники с сужением на каждом этапе, а затем выбранные данные были структурированы и использованы для подготовки обзорной статьи.

Иммуносупрессоры и их аэрозольная доставка в легкие при лечении COVID-19

К некоторым патогенетическим особенностям COVID-19

Лишь кратко коснемся некоторых принципиальных особенностей, во многом определяющих терапевтическую стратегию для данной патологии. С позиции разных концепций COVID-19 представляет собой двухфазное заболевание [52]. Ранняя фаза характеризуется интенсивной репликацией вируса SARS-CoV-2, приводящей к прямому повреждению тканей, на фоне широкой экспрессии основных связанных с инфекцией генов человека ACE2, TMPRSS2 и CTSB/L в тканях респираторного и желудочно-кишечного тракта. Последующая, поздняя фаза, характери-

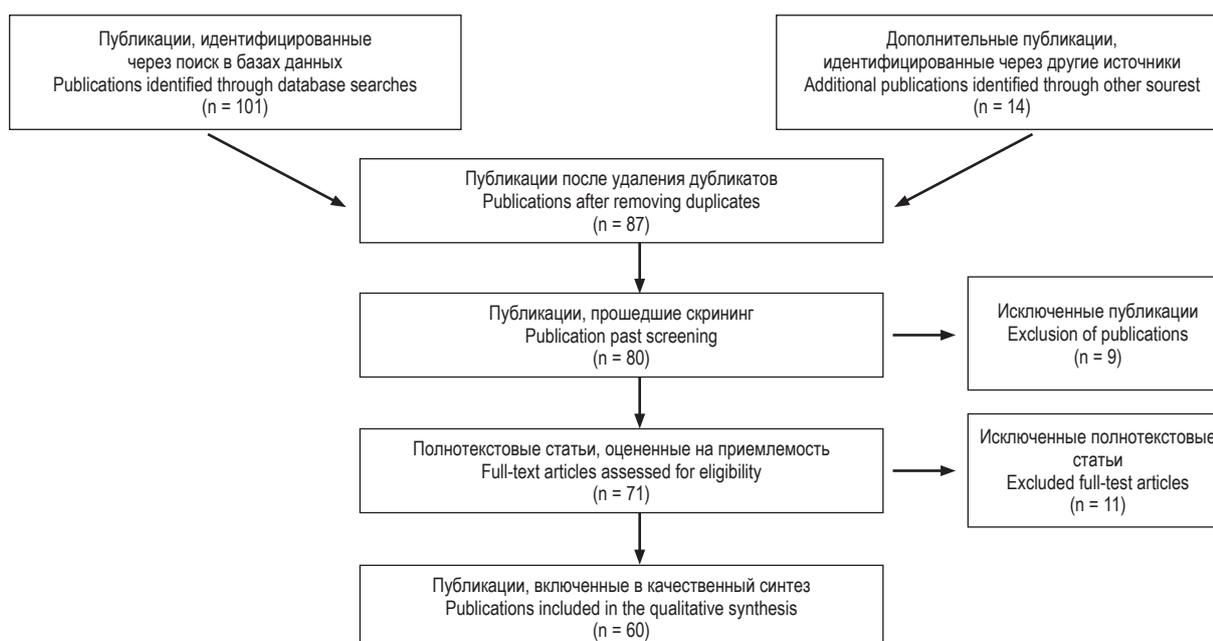


Рисунок 1. Схема отбора публикаций

Figure 1. Scheme for selecting publications

зуется неконтролируемым гиперовоспалительным состоянием, цитокиновым штормом и широким органотропизмом SARS-CoV-2. Это состояние характеризуется гиперцитокинемией, включая фактор некроза опухоли- α , гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор, IL-6 и IL-1, интерферон- γ , и повреждением тканей, а также активацией системы свертывания, приводящей к протромботическому состоянию. Соответственно, основными составляющими стратегии лечения COVID-19 являются прекращение прогрессирования репликации вируса SARS-CoV-2 и раннее купирование его гиперовоспалительной фазы, определяющей тяжесть состояния пациента и его летальность. В фазу репликации вируса, вероятно, будут более эффективными противовирусные препараты, которые продолжают создаваться. В фазу гиперовоспалительного состояния больше могут помочь противовоспалительные препараты, которые далеко не всегда приносят ожидаемый результат и могут сопровождать серьезными побочными эффектами. В этом плане представляют интерес ИС, учитывая целесообразность влияния с их помощью на гипериммунный ответ. Но прежде чем перейти к осмыслению особенностей центрального регулятора иммунного ответа, регуляторных Т-клеток (Treg), являющихся базисным звеном, обеспечивающим иммунный гомеостаз и имеющим прямое отношение к проблеме, которой посвящена настоящая работа. Анализ показал, как продемонстрировано на рисунке 2, что Treg, обладающие супрессорным феноменом, спо-

собствуют подавлению цитокинового шторма, более легкому течению вирусной пневмонии и острого повреждения легких, в том числе и при COVID-19 [36, 54]. Поэтому степень рекрутирования Treg в легкие пациентов с COVID-19 может определять тяжесть заболевания. На это указывают факты о том, что у пациентов с более значительным количеством этих клеток болезнь протекает легче и у выздоравливающих пациентов с COVID-19 экспрессия транскрипционного фактора FoxP3 в циркулирующих Treg, являющегося их молекулярным маркером, была в 4,4 раза выше, чем у неинфицированных людей [47, 59]. В то время как Treg увеличиваются при легкой COVID-19, значительное снижение имеет место у пациентов в критическом состоянии и при тяжелой COVID-19 [30, 56]. Наряду с этим в некоторых исследованиях, проведенных ранее, не наблюдалось изменений Treg [31]. Такая противоречивость может быть связана с различными критериями, используемыми при идентификации Treg, проведением исследований на разных фазах заболевания и с разной степенью его тяжести. Так, показано, что на ранней стадии развития инфекции повышенное количество активированных Treg может снизить противовирусную защиту, оказывая иммуносупрессорный эффект на защитные иммунные клетки и подавляя иммунный ответ против SARS-CoV-2 (рис. 2А).

Но подавляющее большинство исследований свидетельствуют об активации Treg у пациентов с COVID-19, что представляет собой по сути защитный механизм. Он обеспечивает за счет ин-

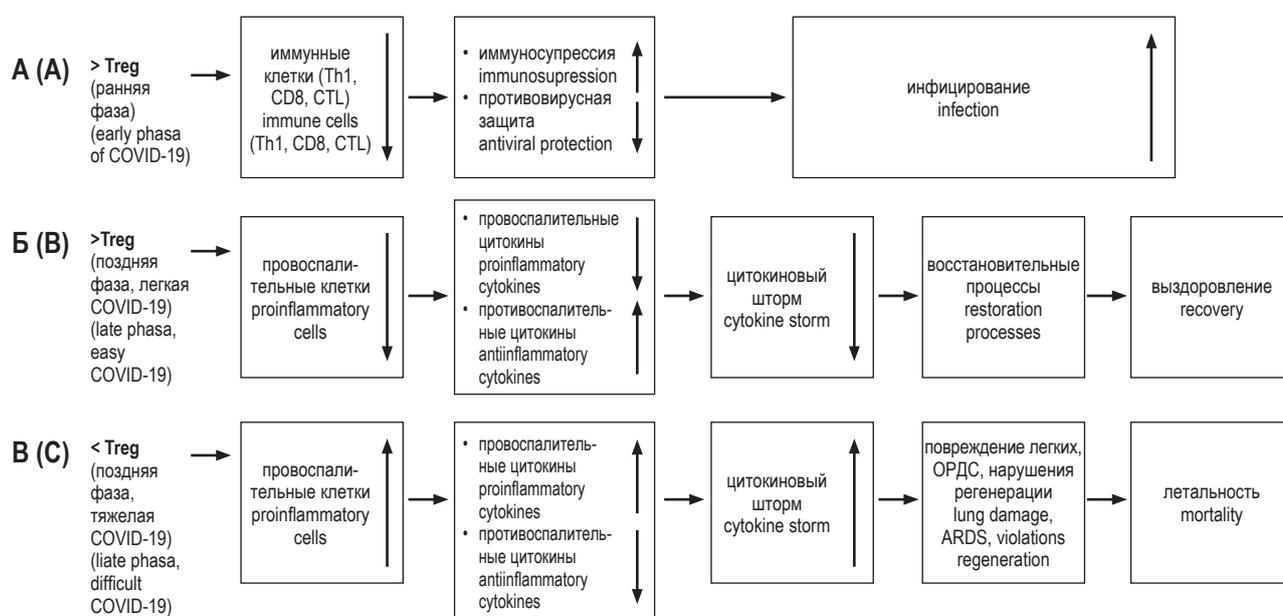


Рисунок 2. Роль Treg в патогенезе COVID-19 (схема)

Примечание. \uparrow стрелка вверх – активация/возрастание; \downarrow стрелка вниз – подавление/снижение.

Figure 2. Role of Treg in the pathogenesis of COVID-19 (scheme)

Note. \uparrow up arrow, activation/increase; \downarrow down arrow, suppression/reduction.

гибирующего воздействия на провоспалительные клетки, включая макрофаги и Т-лимфоциты, и оптимизации баланса провоспалительных и противовоспалительных цитокинов ослабление воспалительных реакций и погашение цитокинового шторма, ведущих к выздоровлению (рис. 2Б). Снижение Treg на поздней фазе COVID-19, гипервоспаления, и особенно их истощение под влиянием какого-либо направленного воздействия характеризуются обратным эффектом. При этом имеют место активация провоспалительных иммунных клеток и повышенная выработка провоспалительных цитокинов, что обуславливает или усугубляет цитокиновый шторм и повреждение собственных тканей, приводя к острому респираторному дистресс-синдрому (ОРДС), нарушениям процессов регенерации/репарации и не редко к смерти (рис. 2В, 3А). Именно соотношение двух основных подмножеств Т-клеток CD4, иммуносупрессорных Treg и провоспалительных клеток Th17, во многом определяет ход воспалительного процесса. Смещение баланса этих клеток в сторону Th17 имеет место при COVID-19, тем самым стимулируя продукцию других провоспалительных цитокинов и способствуя раз-

витию гипервоспалительных реакций или усугублению их и развитию цитокинового шока [54, 55]. И наоборот, стимуляция и повышение Treg со смещением баланса в сторону Treg снижает воспалительные реакции, способствуя развитию восстановительных, регенераторных процессов и повышению частоты выздоровления, снижению летальности (рис. 2Б, 3В). Убедительным подтверждением подобному представлению является, например, факт существенной положительной иммунологической динамики и клинической картины при направленном прямом стимулирующем воздействии на механизмы воспаления, непосредственно касающиеся Treg. Подобное воздействие осуществлялось адоптивным переносом аллогенных HLA-совместимых Treg, полученных из пуповинной крови, а также с помощью рекомбинантного IL-2, который является для них не только фактором роста, но и выживания [23]. Возможность этого может быть использована для эффективной терапии COVID-19, что продемонстрировано на рисунке 3В.

Цитостатики и ингибиторы кальциневрина

Попытки использования препаратов данных групп с целью контроля над воспалительным

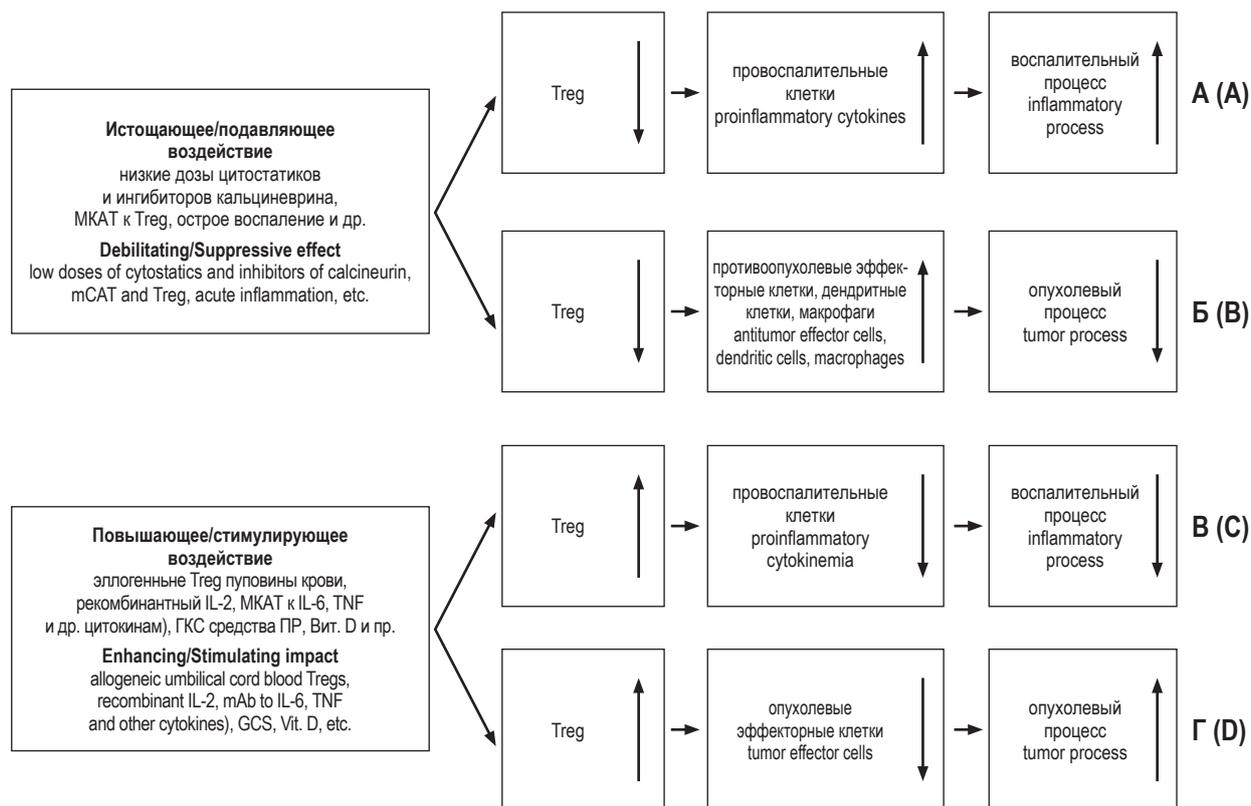


Рисунок 3. Терапевтический потенциал модулирующих воздействий на Treg при COVID-19 и онкопатологии (схема)

Примечание. ↑ стрелка вверх – активация/возрастание; ↓ стрелка вниз – подавление/снижение; А – при воспалении, Б – при онкологии; А, В – при воспалении при COVID-19; Б, Г – при онкологии.

Figure 3. Therapeutic potential of modulating effects on Treg in COVID-19 and oncopathology (scheme)

Note. ↑ up arrow, activation/increase; ↓ down arrow, suppression/reduction; A, for inflammation, B, for oncology; A, C, for inflammation with COVID-19; B, D, for oncology.

процессом в ДП началось еще в 70-е годы прошлого столетия с препаратов системного действия, традиционно используемых для лечения злокачественных заболеваний и в трансплантологии [4]. К ним можно отнести алкирующие цитостатики, обладающие антипролиферативным действием, в частности циклофосфан и мелфалан, и ингибиторы кальциневрина, действующие на иммунофилины, например, циклоспорин. Однако их терапевтический потенциал оказался недостаточным, не позволяя компенсировать их побочные эффекты. С целью уменьшения последних на протяжении десятилетий разрабатывались различные технологии аэрозольной доставки в легкие данных препаратов, обеспечивающие повышение их локальных концентраций и терапевтических свойств и снижение тем самым эффективных доз. Для этого учитывался целый ряд факторов, от которых значительно зависит степень проникновения ингалируемого аэрозоля и эффективность воздействия данных препаратов, включая аэродинамические свойства воздухоносных путей и ингалируемого аэрозоля, физико-химические свойства ингалянта, режим ингаляции по дыханию и работе ингалятора, характер патологии и др. Однако, несмотря на это, осталась неподтвержденной эффективность лечения неконтролируемого воспаления в ДП с помощью цитостатиков и ингибиторов кальциневрина, и с начала 2000-х годов исследования по их воздействию с целью коррекции воспаления в ДП при астме были прекращены в силу бесперспективности [2]. Исключение составили единичные работы, в которых произведены попытки использования цитостатиков в значительно сниженных дозах с целью нивелирования побочных эффектов при сохранении иммуносупрессивного влияния [10]. При этом исходное количество вводимого в легкие препарата снижалось не за счет повышения эффективности его воздействия, достигаемого разными способами, как это осуществлялось в выше отраженных усовершенствованных аэрозольных технологиях, а путем простого разведения препарата, что, наоборот, снижало эффективность его воздействия. При этом не учитывалось влияние всех тех выше перечисленных факторов, от которых зависит эффект воздействия этих препаратов, что значительно снижает их терапевтическое влияние и подробно рассмотрено нами ранее [2]. Наряду с этим сохраняется неисследованной канцерогенность данных препаратов при краткосрочном использовании их в низких дозах, хотя они входят в самую активную, 1-ю группу канцерогенов, относительно которой и необходимо учитывать, что даже самые малые дозы цитостатиков обладают необратимым и кумулятивным действием [6, 11, 19]. Однако подобный подход предложен также и для лечения COVID-19 наряду с тем, что имеются принципиальные сомнения относи-

тельно целесообразности этого и рекомендации его неиспользования. Вместе с тем необходимо иметь в виду то, что COVID-19 значительно отличается особенностями патогенеза и воздействие цитостатиков при данной патологии, согласно их фармакодинамике, направлено на две фазы заболевания, характерных для COVID-19. Прежде всего, оно касается ранней фазы COVID-19 и ориентировано на ингибирование репликации вируса, что требует значительного, в разы, повышения их концентрации, сопряженного с серьезными побочными эффектами [41]. Тогда как при рассматриваемом подходе, предусматривающем использование, наоборот, низких доз, подобное целевое воздействие данных препаратов исключается, нивелируя тем самым эффект, а следовательно, и смысл их применения. В отличие от COVID-19, при бронхиальной астме подобное воздействие не предусматривается в силу существенного отличия ее патогенеза. Мало того, воздействие низких доз цитостатиков может играть обратную негативную роль также и на поздней фазе COVID-19, характеризующейся неконтролируемым гипервоспалительным состоянием. Так, результаты работ различных исследователей, как правило, указывают на истощение Treg (функция которых подавлять физиологические и патологические иммунные реакции) под воздействием низких доз цитостатиков (рис. 3А), что может индуцировать провоспалительные цитокины, иммунную гиперреактивность и аутоиммунитет [22, 25, 40, 57] (рис. 2В). Как известно, ультранизкие дозы цитостатиков, в частности мелфалана, блокируют цепь IL-2R и проведение сигнала для IL-2, а следовательно, селективно ингибируют Treg поскольку IL-2 является для них фактором не только роста, но и выживания [7]. При этом аналогично это касается и других поверхностных клеточных рецепторов, в частности TNFR II и Fas-рецептора. Т. е. здесь имеет место акцентированная избирательная элиминация Treg, способствующая усилению провоспалительного действия, не допустимого в данной ситуации, учитывая принципиальную положительную роль Treg в купировании воспаления. Кроме того, истощение Treg не только мешает разрешению воспаления, но и нарушает легочный эпителий и его репарацию [37, 48]. Однако в рассматриваемых работах, использующих низкие дозы цитостатиков, декларируется положительный эффект относительно процессов воспаления и регенерации. Указание в экспериментальной работе на депрессивное влияние на воспалительный процесс в ДП низких доз цитостатиков не находит подтверждения, так как практически все последующие экспериментальные исследования по COVID-19 свидетельствуют об обратном [22, 25, 40, 57]. Убедительные данные об иницирующем влиянии на воспалительный процесс при истощении Treg получены на модели системного

воспаления при сепсисе и остром дистресс-синдроме [17, 37, 48, 58] (рис. 2В). Истощение Treg приводило к изменению экспрессии 49 генов в клетках пневмоцитов II и снижению скорости пролиферации эпителия после повреждения, тогда как их совместное культивирование с первичными пневмоцитами II усиливало регенераторные процессы [37, 38]. Подтверждению роли истощающего эффекта Treg соответствовало отсутствие клинических доказательств эффективности низких доз препаратов не только при цитотином штурме или остром респираторном дистресс-синдроме при COVID-19, но и при значительно более низком уровне цитокинемии, способной сопровождать воспаление, например, при бронхиальной астме [2, 56]. Поэтому попытки некоторых исследователей использовать цитостатики по аналогии с бронхиальной астмой для лечения COVID-19, являющейся более тяжелой и проблематичной патологией, особенно с наличием того же ряда недостатков, рассмотренных выше на модели астмы, и не изученностью и противоречивостью взглядов относительно патогенеза данной патологии, являются явно нецелесообразными [39]. К тому же необходимо учитывать, что использовать при лечении воспалительного процесса в ДП идентичный подход для разных заболеваний, включая COVID-19, бронхиальную астму, бронхоэктатическую болезнь вряд ли можно, так как они принципиально отличаются между собой по патогенезу, хотя и имеется некоторая схожесть между ними, в частности по наличию гиперцитокинемии.

Вероятно, единственной точкой приложения низких доз цитостатиков и ингибиторов кальциневрина является онкопатология. При этом, с одной стороны, учитывается роль Treg в подавлении противоопухолевого иммунитета, оцениваемая при их большом количестве как прогностически плохой фактор в развитии многих типов опухолей (меланомы, плоскоклеточного рака головы и шеи, рака яичников и колоректальной карциномы) (рис. 3Г). С другой – учитываются также иммуномодулирующие свойства подобных доз данных препаратов, которые истощают Treg и способствуют тем самым иммунной активации и восстановлению противоопухолевого иммунитета и регрессии опухоли (рис. 3Б). Т. е. воздействие низких доз цитостатиков имеет разнонаправленный эффект при остром воспалении и онкологическом процессе, усугубляя первое и действуя во втором случае. Этому не соответствуют представления некоторых единичных исследователей, считающих, что данный эффект носит односторонний характер для этих разных патологически процессов [7]. При этом подчеркнем, что избирательная элиминация Treg при дачи низких доз цитостатиков и ингибиторов кальциневрина является риском так называемых нежелательных иммуноопосредованных реакций и может при-

вести к опасным для жизни аутоиммунным или воспалительным осложнениям [39, 43].

Моноклональные антитела и средства пуринергической регуляции

Вместе с тем необходимо иметь в виду, что за последние годы появились средства, в частности МКАТ, напрямую и специфически блокирующие или путем регуляции межклеточных взаимодействий модифицирующие влияние провоспалительных IL, гиперпродукция которых является ключевым звеном в патогенезе цитокинового шторма [14]. Прецизионный гипоиmmунный эффект, оказываемый с их помощью, рассматривается как эффективный способ коррекции данного гипериммунного состояния (рис. 3В). Антагонисты IL-рецепторов относительно хорошо переносятся, но противопоказаны при гиперчувствительности к ним и лицам с нарушениями функции печени. Данное направление в медицине относительно терапии COVID-19 с использованием МКАТ только получает развитие, учитывая, что патофизиология COVID-19 изучена недостаточно. Однако установлено, что ведущее значение в формировании цитокинового шторма играют IL-6 и IL-1 β , фактор некроза опухоли и интерферон- γ и другие цитокины. Блокирование цитокинов с помощью МКАТ способствует нормализации иммунного гомеостаза и активности воспалительного процесса, имея некоторую аналогию с антиревматической стратегией лечения [44]. Вместе с тем результаты различных исследований, касающихся эффективности МКАТ, характеризуются неоднозначностью. Так, относительно наиболее изученного и актуального из них по механизму действия, блокирующего рецептор IL-6, тоцилизумаб, по данным одних исследователей, явно имеет место положительный эффект [42], тогда как по другим результатам, данный эффект по показателям смертности не отмечают [24]. По данным ретроспективного когортного исследования отечественных ученых, как более раннее введение тоцилизумаба у неинтубированных пациентов с тяжелой формой COVID-19 пневмонией, так и поздняя инфузия препарата после начала ИВЛ не сопровождались снижением летальности от всех причин [3]. Вероятно, такая неоднозначность связана с различиями в методологии этих исследований и учете особенностей патологического процесса, на фоне которых вводился тоцилизумаб. Так, например, установлено, что на ответную реакцию при воздействии данного препарата влияют пороговые уровни С-реактивного белка, которая отличается от реакции в ответ на кортикостероиды, что указывает на целесообразность совместного назначения данных препаратов [15, 32]. При этом кортикостероиды значительно снижают смертность тогда, когда у пациента наблюдается интенсивная системная воспалительная реакция, оцениваемая по относительно высокому содер-

жанию С-реактивного белка. Но в то же время имело место указание на, возможно, более высокую смертность при их назначении пациентам с низкой системной воспалительной реакцией после поправки на основные факторы риска, уже описанные в литературе [32]. Наряду с этим, тоцилизумаб продемонстрировал положительный эффект у пациентов со значительно более низким пороговым значением С-реактивного белка по сравнению с кортикостероидами. Это предполагает и обосновывает более оптимальным совместное назначение данных препаратов. Такое представление находит подтверждение в данных ВОЗ, отраженных выше и указывающих на повышение эффективности лечения при сочетанном применении МКАТ и кортикостероидов, что, очевидно, связано с более широким диапазоном влияния, охватывающим разные пороговые уровни С-реактивного белка.

Учитывая частые мутации вируса, определенную целесообразность видят в совместном использовании разных МКАТ. Так, управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США выдано разрешение на использование: бамланивимаб-этесевимаб, казиривимаб-имдевивимаб, сотровимаб, тиксагевимаб-силгавимаб и беттеловимаб. Первые три одобрены для лечения пациентов с COVID-19 легкой и средней степени тяжести, которые подвержены высокому риску прогрессирования COVID-19 с переходом в тяжелую форму и/или госпитализации, тогда как казиривимаб-имдевивимаб и бамланивимаб-этесевимаб предлагают использовать для пациентов, недавно перенесших COVID-19, с ослабленным иммунитетом, не привитых [16]. Однако, согласно обновлению, эффективность совместного использования бамланивимаба и этесевимаба, а также казиривимаба и имдевивимаба против варианта «Омикрон» маловероятна. Предполагается, что наибольшая активность будет сохраняться у препарата сотровимаб. В России подобные препараты пока не зарегистрированы. Их назначение возможно только с согласия врачебной комиссии при наличии разрешения на временное обращение.

Важно отметить, что антагонисты IL-рецепторов обладают комплексом разнонаправленных положительных терапевтических влияний, могущих корректировать разные звенья патогенеза COVID-19, его осложнения. Так, внутрисосудистая активация и их агрегация и тромбоз – два важных патогенных фактора, обусловленных COVID-19. Помимо участия в рекрутинге и трансмиграции иммунных клеток в воспаленную ткань, активированные тромбоциты также высвобождают множество воспалительных молекул, которые поддерживают активацию и рекрутирование иммунных клеток, а также увеличение проницаемости сосудов и провоспалительную среду [29]. Тромбоциты экспрессируют воспа-

лительные и иммунные реакции, в том числе и интерлейкиновые и лейкотриеновые рецепторы и, соответственно, использование их антагонистов может оказывать положительный терапевтический эффект, особенно в сочетании с антитромбоцитарными препаратами [8]. При этом они могут снижать повреждение не только ткани легкого, но и нервной системы, почек и других органов и систем, которые часто проявляются осложнениями при COVID-19.

Исследования относительно аэрозольтерапии на основе антител подтвердили, что это эффективный и безопасный подход к профилактике и лечению заболеваний дыхательных путей. Введение нейтрализующих антител на модели пневмонии с использованием вируса гриппа интраназальным и аэрозольным путями их доставки в легкие показало лучшую защиту и более высокий терапевтический эффект по сравнению с системными путями и позволило контролировать позднюю стадию инфекции с помощью значительно сниженной дозы введенного препарата [35]. При этом оценка эффективности аэрозольной доставки МКАТ в ДП свидетельствовала, что целевые концентрации вводимого препарата, в два раза превышали те, которые достигаются после внутривенной доставки и являются фармакологически более действенными и эффективными, несмотря на уменьшение исходного количества препарата, вводимого системным путем и сводящего на нет возможность побочных эффектов. В июне 2021 года было сообщено об ингаляционном применении нового МКАТ, демонстрирующем высокую аффинность к шиповидному белку всех штаммов вируса, для лечения COVID-19, AUG-3387, являющегося продуктом совместной деятельности компаний Augmenta Bioworks и TFF Pharmaceuticals Inc. Он предназначен для лечения уже инфицированных SARS-CoV-2, которые имеют высокий риск тяжелого заболевания, но еще не были госпитализированы, а также для профилактики инфекции SARS-CoV-2 у лиц с высоким риском тяжелого заболевания. Это предусматривает разработку технологии тонкопыльчатой заморозки для производства сухих высокодисперсных (среднемассовый аэродинамический диаметр – $3,4 \pm 0,73$ мкм) порошковых составов для ингаляционной доставки непосредственно в наиболее скомпromетированные вирусом терминальные ДП [13].

В последнее время приобретает популярность использования средства пуринергической регуляции (СПР) физиологических и патологических процессов и реакций, включая воспаление, опухолевый рост, реакции отторжения трансплантата и др., которое осуществляется благодаря пуринергической сигнальной системе. Данная система выполняет ключевую роль в регуляции межклеточных взаимодействий в микроциркуляторном русле и представляет собой систему

взаимодействия АТФ и его метаболитов с соответствующими рецепторами — поверхностными рецепторными молекулами, участвующими в регулировании уровня внеклеточной АТФ. Последняя участвует в иницировании воспаления за счет разных механизмов, включая ускорение активации Т-клеток, повышение синтеза и секреции провоспалительных цитокинов [20]. Поэтому средства, обладающие эффектами, противоположными влиянию АТФ за счет ингибирования соответствующих рецепторов, рассматриваются как весьма эффективные для инактивирования воспалительного процесса и с позиции некоторых классификаций и относятся к ИС [5]. В результате воздействия подобных СПР, в частности аденозина, ограничивается иммунный ответ, так как подавляется адгезия лейкоцитов к эндотелиальным клеткам микроциркуляторного русла, снижается передача внутриклеточных сигналов к нейтрофилам и их активация, а следовательно, и продукция активных форм кислорода нейтрофилами и угнетается синтез и секреция провоспалительных цитокинов [12, 34]. Все это в конечном итоге способствует купированию воспаления (рис. 3В) и снижению потребности в кортикостероидах, столь уместных для терапии COVID-19. Наряду с этим аденозин способствует выходу противовоспалительного IL-10 из моноцитов, а также запускает продукцию фактора роста эндотелия сосудов, являющегося мощным индуктором ангиогенеза и сосудистой проницаемости [26]. Большинство данных эффектов реализуется через А2-рецепторы, которые экспрессируются при воспалительном процессе в различных клетках иммунной системы, включая лимфоциты, макрофаги, дендритные клетки, гранулоциты. Супрессивный эффект аденозина в значительной мере опосредован через эти рецепторы (А2А и А2В) (А2АR/А2ВR), что продемонстрировано на модели сепсиса [9]. Таким образом, в этом случае задействуется Treg, роль которых является ключевой в работе механизма иммунного гомеостаза с обоюдозависимым влиянием Treg и аденозина. Они генерируют внеклеточный аденозин, который увеличивает количество Treg и способствует повышению их иммунорегуляторной активности, а следовательно, и иммуносупрессивного эффекта и снижению воспаления [46].

Подчеркнем, что СПР, в частности аденозин, также обладают комплексом положительных терапевтических влияний, расширяющих возможности лечения COVID-19. Так, например, транспорт аденозина может быть направлен на повышение его уровня и снижение активации тромбоцитов, уменьшение тромбоза и ослабления воспаления для улучшения результатов терапии COVID-19, при котором значительный удельный вес смертей связан с нарушением свертывания крови и тромбоза [49, 50]. Еще одним важным механизмом действия аденозина является то,

что он активирует рецепторы А2В на апикальной мембране реснитчатых клеток, вызывая изменения во внутриклеточных вторичных мессенджерах, которые способствуют высвобождению хлоридов и ингибируют абсорбцию натрия. В результате вода попадает в просвет ДП, происходит реституция их перипициарного слоя, стимулируется частота биения ресничек [18, 33]. Это, в свою очередь, способствует нормализации мукоцилиарного клиренса, нарушения которого, в том числе и по причине нарушений пуринергической регуляции, являются ведущим патогенетическим звеном как при хронической обструктивной патологии легких, включая бронхиальную астму и ХОБЛ, так и при остром поражении легких, в частности при COVID-19 [53]. Тем более что при COVID-19 имеются существенные предпосылки для нарушения взаимодействия мукоцилиарного и альвеолярного клиренсов, обеспечивающего элиминацию вируса SARS-CoV-2, что еще в большей степени способствует его проникновению в ДП и патогенному воздействию [1]. Используя регуляторные эффекты аденозина на медиаторы воспаления с целью его уменьшения и улучшения прогноза, для исключения побочных эффектов была внедрена ингаляционная технология его целевой доставки в легкие при COVID-19. В результате удалось уменьшить тяжесть воспаления и сократить продолжительность пребывания пациентов данного контингента в стационаре [45]. Однако подобные исследования носят единичный и предварительный характер и проведены на относительно небольшой группе больных. В настоящее время осуществляются более масштабные клинические испытания данного препарата с целью более объективной оценки его практической перспективы [51].

Таким образом, имеет место существенное повышение эффективности лечения и предусматриваются дальнейшие его перспективы в терапии COVID-19 при использовании ИС, представленные МКАТ и СПР.

Заключение

Использование ИС для лечения воспаления в ДП при COVID-19 является важным. Оно во многом может определять состояние центрального регулятора иммунного ответа, Treg, и его взаимоотношения с другими составляющими патологического процесса, от которых зависит исход заболевания, что связано с фазой и тяжестью заболевания, дозой препарата. Однако возможности их существенно варьируют. Несоответствие эффекта цитостатиков и ингибиторов кальциневрина, предполагаемому наряду с вероятностью побочных эффектов и неизученностью характерного для цитостатиков карциногенного влияния при краткосрочном их использовании в низких дозах, в том чис-

ле и при прямом ингаляционном воздействии, указывают на отсутствие целесообразности их применения. Перспективными в этом плане представляются возможности применения биологических препаратов, включая МКАТ, СПР на основе учета роли Трег, что представляется

инновационным подходом. Это обеспечивает лечебное прямое, прецизионное воздействие на процессы воспаления при COVID-19, обладающее терапевтическим мультикомплексом и оптимизирующее персонализированный подход при лечении.

Список литературы / References

1. Кобылянский В.И. Морфофункциональные изменения в проводящих и респираторных отделах бронхолегочной системы при COVID-19 // Инфекционные болезни: новости, мнения, обучение, 2021. Т. 10, № 2. С. 69-77. [Kobylyansky V.I. Morphological and functional changes in the conductive and respiratory sections of the bronchopulmonary system in COVID-19. *Inktsionnyye bolezni: novosti, mneniya, obuchenie = Infectious Diseases: News, Opinions, Training*, 2021, Vol. 10, no. 2, pp. 69-77. (In Russ.)]
2. Кобылянский В.И. Возможности использования иммуносупрессоров и их аэрозольной доставки в легкие при лечении тяжелой бронхиальной астмы // Клиническая фармакология и терапия, 2022. Т. 31, № 2. С. 69-75. [Kobylyansky V.I. Possibilities of using immunosuppressants and their aerosol delivery to the lungs in the treatment of severe bronchial asthma. *Klinicheskaya farmakologiya i terapiya = Clinical Pharmacology and Therapy*, 2022, Vol. 31, no. 2, pp. 69-75. (In Russ.)]
3. Моисеев С.В., Авдеев С.Н., Тао Е.А., Бровко М.Ю., Яворовский А.Г., Умбетова К.Т., Буланов М.Н., Зыкова А.Н., Акулкина Л.А., Смирнова И.Г., Фомин В.В. Эффективность тоцилизумаба у пациентов с COVID-19, госпитализированных в ОРИТ: ретроспективное когортное исследование // Клиническая фармакология и терапия, 2020. Т. 29, № 4. С. 17-25. [Moiseev S.V., Avdeev S.N., Tao E.A., Brovko M.Yu. Yavorovsky A.G., Umbetova K.T., Bulanov M.N., Zyкова A.N., Akulkina L.A., Smirnova I.G., Fomin V.V. Efficacy of tocilizumab in ICU hospitalized COVID-19 patients: a retrospective cohort study. *Klinicheskaya farmakologiya i terapiya = Clinical Pharmacology and Therapy*, 2020, Vol. 29, no. 4, pp. 17-25. (In Russ.)]
4. Немчинов Н.Н. Применение тиофосамида при лечении больных бронхиальной астмой // Врачебное дело, 1973. № 9. С. 9-11. [Nemchinov N.N. The use of thiophosamide in the treatment of patients with bronchial asthma. *Vrachebnoye delo = Medical Affair*, 1973, no. 9, pp. 9-11. (In Russ.)]
5. Оковитый С.В. Клиническая фармакология иммуносупрессантов // Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии, 2003. Т. 20, № 2. С. 2-34. [Okovity S.V. Clinical pharmacology of immunosuppressants. *Obzory po klinicheskoy farmakologii i lekarstvennoy terapii = Reviews of Clinical Pharmacology and Drug Therapy*, 2003, Vol. 20, no. 2, pp. 2-34. (In Russ.)]
6. Публикация 103 Международной Комиссии по радиационной защите (МКРЗ). Пер с англ. Под общей ред. М.Ф. Киселева и Н.К. Шандалы. М.: ООО ПКФ «Алана», 2009. 328 с. [Publication 103 of the International Commission on Radiation Protection (ICRP). Per from English. Under the general editorship. M.F. Kiseleva and N.K. Shandals]. Moscow: LLC PKF "Alana", 2009. 328 p.
7. Пухальский А.Л., Шмарина Г.В., Алешкин В.А. Иммунологические нарушения и когнитивный дефицит при стрессе и физиологическом старении. Часть II: новые подходы к профилактике и лечению когнитивных расстройств // Вестник Российской академии медицинских наук, 2014. № 7-8. С. 30-37. [Pukhalsky A.L., Shmarina G.V., Alyoshkin V.A. Immunological disorders and cognitive deficits in stress and physiological aging. Part II: new approaches to the prevention and treatment of cognitive disorders. *Vestnik Rossiyskoy akademii meditsinskikh nauk = Bulletin of the Russian Academy of Medical Sciences*, 2014, no. 7-8, pp. 30-37. (In Russ.)]
8. Серебряная Н.Б., Шанин С.Н., Фомичева Е.Е. Тромбоциты как активаторы и регуляторы воспалительных иммунных реакций. Часть 2. Тромбоциты как участники иммунных реакций // Медицинская иммунология, 2019. Т. 21, № 1. С. 9-20. [Serebryanaya N.B., Shanin S.N., Fomicheva E.E., Yakutseni P.P. Platelets as activators and regulators of inflammatory immune responses. Part 2. Platelets as participants in immune responses. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2019, Vol. 21, no. 1, pp. 9-20. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2019-1-9-20.
9. Сивак К.В., Васин А.В., Егоров В.В., Цветков В.Б., Кузьмич Н.Н., Савина В.А., Кисел О.И. Аденозиновый рецептор A2A как лекарственная мишень для терапии сепсиса // Молекулярная биология, 2016. Т. 50, № 2. С. 231-245. [Sivak K.V., Vasin A.V., Egorov V.V. A2A adenosine receptor as a drug target for sepsis therapy. *Molekulyarnaya biologiya = Molecular Biology*, 2016, Vol. 50, no. 2, pp. 231-245. (In Russ.)]
10. Синицын Е.А., Зыкова А.А., Шамин Р.В., Рвачева А.В., Богатырева А.О., Шаповаленко Т.В., Марьин Г.Г., Зыков К.А. Эффективность и безопасность применения ингаляций ультранизких доз мелфалана в лечении госпитализированных пациентов с COVID-19 // Acta Biomedica Scientifica, 2022. Т. 7, № 2. С. 12-23. [Sinityn E.A., Zyкова A.A., Shamin R.V., Rvacheva A.V., Bogatyreva A.O., Shapovalenko T.V., Maryin G.G., Zykov K.A. Efficacy and safety of ultra-low-dose inhaled melphalan in the treatment of hospitalized patients with COVID-19. *Acta Biomedica Scientifica*, 2022, Vol. 7, no. 2, pp. 12-23. (In Russ.)]
11. Тюляндин С.А., Самоilenko И.В., Измерова Н.И. Руководство для медицинского персонала по безопасному обращению с противоопухолевыми препаратами. М.: НИИ медицины труда РАН, 2012. 243 с. [Tyulyandin S.A., Samoilenko I.V., Izmerova N.I. Guidance for medical personnel on the safe handling of anticancer drug. Moscow: Research Institute of Occupational Medicine RAS, 2012. 243 p.]
12. Barletta K.E., Ley K., Mehrad B. Regulation of neutrophil function by adenosine. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 2012, Vol. 32, no. 4, pp. 856-864.

13. Bryne J. Inhaled mAb therapy against COVID-19 in the works: 'The product is not dependent on cold chain distribution and storage'. *BioPharma*, 2021. Available at: <https://www.biopharma-reporter.com/Article/2021/06/25/Inhaled-mAb-therapy-against-COVID-19-in-the-works-The-product-is-not-dependent-on-cold-chain-distribution-and-storage>. Accessed: August 18, 2020.
14. Busse W.W. Biological treatments for severe asthma: a major advance in asthma care. *Allergol. Int.*, 2019, Vol. 68, pp. 158-166.
15. Byrn J. WHO endorses IL-6 receptor blockers for COVID-19, Roche engaging with agency on guideline implications. *BioPharma*, 2021. Available at: <https://www.biopharma-reporter.com/Article/2021/07/07/WHO-endorses-IL-6-receptor-blockers-for-COVID-19-Roche-engaging-with-agency-on-guideline-implications>. Accessed: August 18, 2020.
16. COVID-19. Treatment Guidelines. Anti-SARS-CoV-2 Monoclonal Antibodies. Available at: <https://www.covid19treatmentguidelines.nih.gov/therapies/antivirals-including-antibody-products/anti-sars-cov-2-monoclonal-antibodies/>.
17. d'Alessio F.R., Tsushima K., Aggarwal N.R., West E.E., Willett M.H., Britos M.F., Pipeling M.R., Brower R.G., Tuder R.M., McDyer J.F., King L.S. CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Tregs resolve experimental lung injury in mice and are present in humans with acute lung injury. *J. Clin. Invest.*, 2009, Vol. 119, pp. 2898-2913.
18. Davis C.W., Lazarowski E. Coupling of airway ciliary activity and mucin secretion to mechanical stresses by purinergic signaling. *Respir. Physiol. Neurobiol.*, 2008, Vol. 163, pp. 208-213.
19. Eitel A., Scherrer M., Kummerer K. Handling cytostatic drugs. A practical guide. 1999. Bristol-Myers Squibb. 41 p.
20. Faas M.M., Sáez T., de Vos P. Extracellular ATP and adenosine: the Yin and Yang in immune responses? *Mol. Aspects Med.*, 2017, Vol. 55, pp. 9-19.
21. Fehr A.R., Perlman S. Coronaviruses: an overview of their replication and pathogenesis. *Methods Mol. Biol.*, 2015, Vol. 1282, pp. 1-23.
22. Flores C., Fouquet G., Cruz Moura I., Maciel T.T., Hermine O. Lessons to learn from low-dose cyclosporin-A: A new approach for unexpected clinical applications. *Front. Immunol.*, 2019, Vol. 10, 588. doi: 10.3389/fimmu.2019.00588.
23. Gladstone D.E., Kim B.S., Mooney K., Karaba A.H., D'Alessio F.R. Regulatory T cells for treating patients with covid-19 and acute respiratory distress syndrome: two case reports. *Ann. Intern. Med.*, 2020, Vol. 173, pp. 852-853.
24. Hermine O., Mariette X., Tharaux P.-L., Resche-Rigon M., Porcher R., Ravaut P.; CORIMUNO-19 collaborative group effect of tocilizumab vs usual care in adults hospitalized with COVID-19 and moderate or severe pneumoniaa randomized clinical trial. *JAMA Intern. Med.*, 2021, Vol. 181, no. 1, pp. 32-40.
25. Heylmann D, Bauer M, Becker H, van Gool S, Bacher N, Steinbrink K, Kaina B. Human CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells are sensitive to low dose cyclophosphamide: Implications for the immune response. *PLoS One*, 2013, Vol. 8, no. 12, e83384. doi: 10.1371/journal.pone.0083384.
26. Hill L.M., Gavala M.L., Lenertz L.Y., Bertics P.J. Extracellular ATP may contribute to tissue repair by rapidly stimulating purinergic receptor X7-dependent vascular endothelial growth factor release from primary human monocytes. *J. Immunol.*, 2010, Vol. 185, no. 5, pp. 3028-3034.
27. Hojyo S., Uchida M., Tanaka K., Hasebe R., Tanaka Y., Murakami M., Hirano T. How COVID-19 induces cytokine storm with high mortality. *Inflamm. Regen.*, 2020, Vol. 40, 37. doi: 10.1007/s00262-020-02822-2.
28. Huang C., Wang Y., Li X., Ren L., Zhao J., Hu Y., Zhang L., Fan G., Xu J., Gu X., Cheng Z., Yu T., Xia J., Wei Y., Wu W., Xie X., Yin W., Li H., Liu M., Xiao Y., Gao H., Guo L., Xie J., Wang G., Jiang R., Gao Z., Jin Q., Wang J., Cao B. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet*, 2020, Vol. 395, pp. 497-506.
29. Jayarangaiah A., Kariyanna P.T., Chen X., Jayarangaiah A., Kumar A. COVID-19-Associated Coagulopathy: An Exacerbated Immunothrombosis Response. *Clin. Appl. Thromb. Hemost.*, 2020, Vol. 26, pp. 1- 11.
30. Jia R., Wang X., Liu P., Liang X., Ge Y., Tian H., Chang H., Zhou H., Zeng M., Xu J. Mild cytokine elevation, moderate CD4⁺ T cell response and abundant antibody production in children with COVID-19. *Virolog. Sin.*, 2020, Vol. 35, no. 6, pp. 734-743.
31. Jonuleit H., Schmitt E. The regulatory T cell family: distinct subsets and their interrelations. *J. Immunol.*, 2003, Vol. 171, no. 12, pp. 6323-6327.
32. Keller M.J., Kitsis E.A., Arora S., Chen J.T., Agarwal S., Ross M.J., Tomer Y., Southern W. Effect of systemic glucocorticoids on mortality or mechanical ventilation in patients with COVID-19. *J. Hosp. Med.*, 2020, Vol. 15, pp. 489-493.
33. Lazarowski E.R., Boucher R.C. Purinergic receptors in airway epithelia. *Curr. Opin. Pharmacol.*, 2009, Vol. 9, pp. 262-267.
34. Le T.T., Berg N.K., Harting M.T., Li X., Eltzschig H.K., Yuan X. Purinergic signaling in pulmonary inflammation. *Front. Immunol.*, 2019, Vol. 10, 1633. doi: 10.3389/fimmu.2019.01633.
35. Leyva-Grado V.H., Tan G.S., Leon P.E., Yondola M., Palese P., Yondola M., Palese P. Direct administration in the respiratory tract improves efficacy of broadly neutralizing anti-influenza virus monoclonal antibodies. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2015, Vol. 59, pp. 4162-4172.
36. Lin S., Wu H., Wang C., Xiao Z., Xu F. Regulatory T Cells and Acute Lung Injury: Cytokines, Uncontrolled Inflammation, and Therapeutic Implications. *Front. Immunol.*, 2018, Vol. 9, 1545. doi: 10.3389/fimmu.2018.01545.

37. Mock J.R., Garibaldi B.T., Aggarwal N.R., Jenkins J., Limjunyawong N., Singer B.D., Chau E., Rabold R., Files D.C., Sidhaye V., Mitzner W., Wagner E.M., King L.S., D'Alessio F.R. Foxp3⁺ regulatory T cells promote lung epithelial proliferation. *Mucosal Immunol.*, 2014, Vol. 7, pp. 1440-1451.
38. Mock J.R., Dial C.F., Tune M.K., Gilmore R.C., O'Neal W.K., Dang H., Doerschuk C.M. Impact of regulatory T cells on type 2 alveolar epithelial cell transcriptomes during resolution of acute lung injury and contributions of IFN- γ . *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, 2020, Vol. 63, pp. 464-477.
39. Overacre-Delgoffe A.E., Chikina M., Dadey R.E., Yano H., Brunazzi E.A., Shayan G., Horne W., Moskovitz J.M., Kolls J.K., Sander C., Shuai Y., Normolle D.P., Kirkwood J.M., Ferris R.L., Delgoffe G.M., Bruno T.C., Workman C.J., Vignali D.A.A. Interferon- γ drives T_{reg} fragility to promote anti-tumor immunity. *Cell*, 2017, Vol. 169, no. 6, pp. 1130-1141.e11.
40. Panoskaltsis N. Are all cytokine storms the same? *Cancer Immunol. Immunother.*, 2021, Vol. 8, pp. 1-6.
41. Poulsen N.N., Brunn A., Hornum M., Jensen M.B. Cyclosporine and COVID-19: Risk or favorable? *Am. J. Transplant.*, 2020, Vol. 20, no. 11, pp. 2975-2982.
42. Radulescu A., Istrate A., Muntean M. Treatment with tocilizumab in adult patients with moderate to critical COVID-19 pneumonia: a single-center retrospective study. *Int. J. Infect. Dis.*, 2022, Vol. 117, pp. 1-7.
43. Rajendiran A., Tenbrock R. Regulatory T cell function in autoimmune disease. *J. Transl. Autoimmun.*, 2021, Vol. 4, 100130. doi: 10.1016/j.jtauto.2021.100130.
44. Santos C.S., Fernández X.C., Moriano Morales C., Álvarez E.D., Álvarez Castro C., López Robles A., Pérez Sandoval T. Biological agents for rheumatic diseases in the outbreak of COVID-19: Friend or foe? *RMD Open*, 2021, Vol. 7, no. 1, e001439. doi: 10.1136/rmdopen-2020-001439.
45. Spiess B.D., Sitkovsky M., Correale P., Gravenstein N., Garvan C., Morey T.E., Fahy B.G., Hendeles L., Pliura T.G., Martin T.G., Wu V., Astrom C., Nelson D.S. Case report: can inhaled adenosine attenuate COVID-19? *Front. Pharmacol.*, 2021; 2021, Vol. 12, 676577. doi: 10.3389/fphar.2021.676577.
46. Su W., Chen X., Zhu W., Yu J., Li W., Li Y., Li Z., Olsen N., Liang D., Zheng S.G. The cAMP-adenosine feedback loop maintains the suppressive function of regulatory T cells. *J. Immunol.*, 2019, Vol. 203, no. 6, pp. 1436-1446.
47. Taefehshokr N., Taefehshokr S., Heit B. Mechanisms of dysregulated humoral and cellular immunity by SARS-CoV-2. *Pathogens*, 2020, Vol. 9, no. 12, 1027. doi: 10.3390/pathogens9121027.
48. Tan W., Zhang C., Liu J., Miao Q. Regulatory T-cells promote pulmonary repair by modulating T helper cell immune responses in lipopolysaccharide-induced acute respiratory distress syndrome. *Immunology*, 2019, Vol. 157, pp. 151-162.
49. Tang N., Li D., Wang X., Sun Z. Abnormal coagulation parameters are associated with poor prognosis in patients with novel coronavirus pneumonia. *J. Thromb. Haemost.*, 2020, Vol. 18, no. 4, pp. 844-847.
50. Tang N., Bai H., Chen X. Anticoagulant treatment is associated with decreased mortality in severe coronavirus disease 2019 patients with coagulopathy. *J. Thromb. Haemost.*, 2020, Vol. 18, no. 5, pp. 1094-1099.
51. The ARCTIC Trial: Aerosolized Inhaled Adenosine Treatment in Patients With Acute Respiratory Distress Syndrome (ARDS) The Caused by COVID-19. 2021. Available at: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04588441>.
52. Trougakos I.P., Stamatelopoulos K., Terpos E., Tsitsilonis O.E., Aivalioti E., Paraskevis D., Kastiris E., Pavlakis G.N., Dimopoulos M.A. Insights to SARS-CoV-2 life cycle, pathophysiology, and rationalized treatments that target COVID-19 clinical complications. *J. Biomed. Sci.*, 2021, Vol. 28, no. 1, 9. doi: 10.1186/s12929-020-00703-5.
53. Varani K., Caramori G., Vincenzi F. Alteration of adenosine receptors in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 2006, Vol. 173, pp. 398-406.
54. Veiga-Parga T., Sehrawat S., Rouse B.T. Role of regulatory T cells during virus infection. *Immunol. Rev.*, 2013, Vol. 255, no. 1, pp. 182-196.
55. Wang F., Hou H., Luo Y., Tang G., Wu S., Huang M., Liu W., Zhu Y., Lin Q., Mao L., Fang M., Zhang H., Sun Z. The laboratory tests and host immunity of COVID-19 patients with different severity of illness. *JCI Insight*, 2020, Vol. 5, no. 10, e137799. doi: 10.1172/jci.insight.137799.
56. Wang W., Su B., Pang L., Qiao L., Feng Y., Ouyang Y., Guo X., Shi H., Wei F., Su X., Yin J., Jin R., Chen D. High-dimensional immune profiling by mass cytometry revealed immunosuppression and dysfunction of immunity in COVID-19 patients. *Cell. Mol. Immunol.*, 2020, Vol. 17, no. 6, pp. 650-652.
57. Wang H., Wang Z., Cao W., Wu Q., Yuan Y., Zhang X. Regulatory T cells in COVID-19. *Aging Dis.*, 2021, Vol. 12, no. 7, pp. 1545-1553.
58. Wang B., Wang H., Li P., Wang L., Liu H., Liu J., Wang L. Relationships of interleukin-10 with the regulatory T cell ratio and prognosis of cervical cancer patients. *Clinics (Sao Paulo)*, 2018, Vol. 3, no. 73, e679. doi: 10.6061/clinics/2018/e679.
59. Zheng H., Li H., Guo L., Liang Y., Li J., Wang X., Hu Y., Wang L., Liao Y., Yang F., Li Y., Fan S., Li D., Cui P., Wang Q., Shi H., Chen Y., Yang Z., Yang J., Shen D., Cun W., Zhou X., Dong X., Wang Y., Chen Y., Dai Q., Jin W., He Z., Li Q., Liu L. Virulence and pathogenesis of SARS-CoV-2 infection in rhesus macaques: A nonhuman primate model of COVID-19 progression. *PLoS Pathog.*, 2020, Vol. 16, no. 11, e1008949. doi: 10.1371/journal.ppat.1008949.

Автор:

Кобылянский В.И. — д.м.н., профессор образовательного центра ФГБУ «Научно-исследовательский институт пульмонологии Федерального медико-биологического агентства России», Москва, Россия

Author:

Kobylyansky V.I., PhD, MD (Medicine), Professor, Educational Center, Research Institute of Pulmonology, Federal Medical and Biological Agency of Russia, Moscow, Russian Federation

Поступила 18.11.2022

Отправлена на доработку 19.11.2022

Принята к печати 24.02.2023

Received 18.11.2022

Revision received 19.11.2022

Accepted 24.02.2023

ПРОТИВООПУХОЛЕВЫЕ И ИММУНОМОДУЛИРУЮЩИЕ ЭФФЕКТЫ ОКСИГЕНОТЕРАПИИ

Селедцов В.И.¹, Доржиева А.Б.², Селедцова Г.В.²

¹ ФГБНУ «Российский научный центр хирургии имени академика Б.В. Петровского», Москва, Россия

² ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии»,
Новосибирск, Россия

Резюме. Известно, что ишемия и гипоксия в опухолевом микроокружении способствует опухолевой прогрессии. Дефицит кислорода сдвигает метаболизм раковых клеток от окислительного фосфорилирования к аэробному (эффект Варбурга) и анаэробному гликолизу. Этот измененный углеводный обмен характеризуется низкой энергетической эффективностью и чрезмерным использованием глюкозы. В условиях гипоксии в злокачественных клетках ослабевает антиоксидантная защита и, соответственно, повышается их чувствительность к прямому токсическому действию активных форм кислорода (АФК). На практике насыщение опухолей кислородом обычно достигается применением водорастворимого озона или гипербарической оксигенацией. АФК и свободные радикалы вызывают повышенную текучесть мембран (липопероксидация фосфолипидов), повреждают энергетическую функцию митохондрий и вызывают окислительное повреждение ДНК и РНК. Показано, что АФК, генерируемые в результате оксидативного взрыва, способны усиливать противоопухолевый эффект химиолучевой терапии. Показано, что АФК, продуцируемые иммунными клетками, способны прямо ингибировать опухолевый рост. Кроме того, АФК обеспечивают дополнительную иммуностимуляцию посредством индукции мутагенеза в опухоли и появления иммуногенных неоантигенов. АФК способны также усиливать противоопухолевую иммунную защиту за счет стимуляции продукции иммунными клетками интерферона- γ , фактора некроза опухоли- α , IL-2 и IL-6. С другой стороны, АФК могут оказывать негативное влияние на противоопухолевый иммунитет. В частности, они могут: 1) способствовать накоплению регуляторных Т-клеток (Treg) и миелоидных супрессорных клеток в опухолевом микроокружении, 2) поддерживать функциональную активность альтернативно активированных (M2) макрофагов и (N2) нейтрофилов и 3) нарушать презентацию иммуногенных антигенов дендритными клетками. Так, было показано, что относительно низкие концентрации АФК способны поддерживать активацию, пролиферацию и дифференцировку Т-лимфоцитов, тогда как высокие концентрации АФК обладают обратным эффектом. Есть основания полагать, что максимально возможный клинический эффект оксигенотерапии может быть достигнут в случае ее одно-временного или последовательного комбинирования с иммунотерапевтическими вмешательствами.

Адрес для переписки:

Селедцова Галина Викторовна
ФГБНУ «Научно-исследовательский институт
фундаментальной и клинической иммунологии»
630099, Россия, г. Новосибирск, ул. Ядринцевская, 14.
Тел.: 8 (913) 980-52-25.
E-mail: galina-seledtsova@yandex.ru

Address for correspondence:

Galina V. Seledtsova
Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology
14 Yadrintsevskaya St
Novosibirsk
630099 Russian Federation
Phone: +7 (913) 980-52-25.
E-mail: galina-seledtsova@yandex.ru

Образец цитирования:

В.И. Селедцов, А.Б. Доржиева, Г.В. Селедцова
«Противоопухолевые и иммуномодулирующие эффекты
оксигенотерапии» // Медицинская иммунология, 2023.
Т. 25, № 6. С. 1319-1328.
doi: 10.15789/1563-0625-AAI-2562
© Селедцов В.И. и соавт., 2023
Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

V.I. Seledtsov, A.B. Dorzhieva, G.V. Seledtsova “Antitumor
and immunomodulatory effects of oxygen therapy”, *Medical
Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2023,
Vol. 25, no. 6, pp. 1319-1328.
doi: 10.15789/1563-0625-AAI-2562
© Seledtsov V.I. et al., 2023
The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License
DOI: 10.15789/1563-0625-AAI-2562

Таким образом, на основании представленных данных делается заключение, что:

- активные формы кислорода, индуцированные окислительным стрессом, могут повреждать опухолевые клетки, не оказывая при этом существенного влияния на нормальные клетки;
- кислородная терапия способна усиливать противоопухолевые эффекты химиолучевой терапии;
- кислородную терапию целесообразно сочетать с иммунотерапией для достижения максимального противоопухолевого эффекта с минимальными побочными эффектами.

Ключевые слова: опухоль, гипоксия, активные формы кислорода, окислительный стресс, химиолучевая терапия, иммунотерапия, гипербарическая оксигенация, ишемия-реперфузия, опухолевое микроокружение

ANTITUMOR AND IMMUNOMODULATORY EFFECTS OF OXYGEN THERAPY

Seledtsov V.I.^a, Dorzhieva A.B.^b, Seledtsova G.V.^b

^a B. Petrovsky Russian Research Center for Surgery, Moscow, Russian Federation

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

Abstract. It is well known that ischemia and hypoxia in the tumor microenvironment promote tumor progression. Oxygen deficiency in tumor microenvironment polarizes cancer cell metabolism from oxidative phosphorylation to the aerobic mode (Warburg effect) and anaerobic glycolysis. This altered carbohydrate metabolism is characterized by low energy efficiency and excessive glucose consumption. Under hypoxic conditions, the antioxidant protection of malignant cells becomes weaker, thus causing a sufficient increase of their susceptibility to direct toxic effects of reactive oxygen species (ROS). In clinical practice, oxygen saturation of tumors is usually achieved by using water-soluble ozone or hyperbaric oxygen. The ROS are shown to be produced by oxidative burst, thus being able to enhance antitumor effects of chemoradiotherapy. The immune cell-derived ROS were shown to directly inhibit tumor growth. In addition, ROS provide additional immune stimulation through the induction of mutagenesis in the tumor cells and production of immunogenic neoantigens. ROS may also enhance antitumor immune defense by inducing synthesis of interferon- γ , tumor necrosis factor- α , IL-2 and IL-6 by immune cells. Moreover, ROS may exert a negative effect on antitumor immunity. In particular, they are able to: (I) favor the recruitment and accumulation of regulatory T cells (Treg) and myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) in the tumor microenvironment; (II) promote accumulation of alternatively activated (M2) macrophages and (N2) neutrophils, and, (III) impair presentation of immunogenic antigens (Ag) by dendritic cells. We suggest that the maximal clinical effect of oxygen therapy could be achieved in case of its simultaneous or sequential combination with immunotherapeutic interventions.

The authors conclude that:

- oxidative stress-induced reactive oxygen species may preferentially damage tumour cells without significantly affecting normal cells;
- oxygen therapy may potentiate anti-tumour effects of chemoradiotherapy;
- oxygen therapy could be effectively combined with immunotherapy to achieve maximal anticancer effects with minimal side effects.

Keywords: tumor, hypoxia, active oxygen radicals, oxidative stress, chemo-radiation therapy, immunotherapy, hyperbaric oxygenation, ischemia reperfusion, reactive oxygen species, tumor microenvironment

Введение

Известно, что микроциркуляторные нарушения и опухолевое воспаление приводят к дефициту кислорода в опухолевом микроокружении (ОМО). В свою очередь, дефицит кислорода сдвигает метаболизм раковых клеток от окислительного фосфорилирования к аэробному (эффект Варбурга) и анаэробному гликолизу.

В отсутствие кислорода пируват восстанавливается до лактата посредством анаэробного гликолиза, таким образом, обходя образование ацетил-кофермента

А и его дальнейшее окисление по циклу Кребса до CO_2 и H_2O [28]. Этот измененный углеводный обмен характеризуется низкой энергетической эффективностью и чрезмерным использованием глюкозы [33]. Опухолевые клетки накапливают молочную кислоту, которая способствует клеточному ацидозу и в сочетании с гипоксией стимулирует транскрипцию протуморогенного фактора, индуцируемого гипоксией фактора 1А (HIF1A, hypoxia-inducing factor 1A), который, в свою очередь, индуцирует транскрипцию нескольких генов, кодирующих гликолитические ферменты (гексокиназа, альдолаза, фосфофруктокиназа и лактатдегидрогеназа), опосредующие адаптивные клеточные реакции на гипоксический стресс [35]. Кроме того, HIF1A активирует транскрипцию генов нескольких ангиогенных факторов, в частности фактора роста эндотелия сосудов (VEGF, vascular endothelial growth factor) и его рецептора (VEGFR) и, тем самым, стимулирует в опухоли аномальный рост сосудов. Эти сосуды не способны обеспечивать нормальной кровоснабжение опухолевой ткани, поэтому опухоль даже с высокой васкуляризацией содержит гипоксичные области [28].

Высокий уровень ишемии и гипоксии в опухоли способствует ее прогрессии и является неблагоприятным прогностическим фактором. Например, парциальное давление кислорода (PO_2) в опухоли молочной железы составляет в среднем 10 мм рт. ст. (для сравнения в нормальной ткани молочной железы > 60 мм рт. ст.) [28, 49]. В целом гипоксия способствует отбору опухолевых клеток с повышенной анти-апоптотической устойчивостью [28].

Длительная гипоксия приводит к значительному снижению продукции антиоксидантов в опухолевых клетках. Снижение содержания антиоксидантов в клетках резко повышает чувствительность этих клеток к окислительному стрессу. Установлено, что индуцированный активными формами кислорода окислительный стресс подавляет злокачественный рост и повышает чувствительность опухоли к действию как химиолучевой терапии [44], так и иммунотерапевтического лечения [47]. Ниже мы обсудим механизмы противоопухолевых эффектов АФК и очертим нишу и перспективы использования кислородной терапии в комплексном лечении рака.

Противоопухолевые цитотоксические свойства АФК

АФК образуются преимущественно в митохондриях. Они включают в себя супероксид (*O_2^-), перекись водорода (H_2O_2), гидроксильный радикал (*OH^-), синглетный кислород (1O_2),

альфа-кислород ($\alpha\text{-O}$), а также активные формы азота такие, как оксид азота (NO^*), диоксид азота (NO_2^*), и пероксинитрит (ONOO^-). АФК запускают цепи реакций, приводящих к повреждению ДНК и РНК, а также окислению белков и липидов (перекисное окисление липидов) [36, 51]. Важно отметить, что АФК образуются не только в патологических, но и нормальных условиях, являясь важными физиологическими продуктами нормальной жизнедеятельности клеток. Эти продукты усиливают активность Nrf2, который, в свою очередь, стимулирует транскрипцию генов, кодирующих ряд антиоксидантных ферментов таких, как супероксиддисмутаза, глутатионпероксидаза, глутатион-S-трансфераза, каталаза, гемоксигеназа-1, NADPH-хинооксидоредуктаза, а также белки теплового шока [22, 28, 45]. Эти продукты защищают клетки от повреждающего действия АФК и свободных радикалов, превращая их в безвредные молекулы (например, воду).

Ишемию-реперфузию (ИР) или реоксигенационное повреждение ткани можно рассматривать как модельную систему окислительного стресса. ИР-повреждение возникает при восстановлении прерванного кровоснабжения ткани, например, при инфаркте миокарда, инсульте, дисфункции желудочно-кишечного тракта, синдроме системной воспалительной реакции и синдроме полиорганной дисфункции.

Внутриопухолевая гипоксия ослабляет антиоксидантную защиту опухолевых клеток [2, 25, 39, 43, 53] и тем самым значительно повышают чувствительность этих клеток к цитотоксическому действию АФК, образующихся в ответ на оксигенацию опухоли. АФК и свободные радикалы вызывают повышенную текучесть мембран (липопероксидация фосфолипидов), повреждают энергетическую функцию митохондрий и вызывают окислительное повреждение ДНК и РНК. Прямая реактогенность малонового диальдегида приводит к мутациям, сдвигающим в ДНК рамки считывания [10, 55]. Опосредованное АФК окисление белков вызывает образование межбелковых поперечных связей и фрагментацию белков. Таким образом, АФК способны индуцировать разнонаправленное повреждение клеточных структур, поэтому клетки не могут достичь абсолютной устойчивости к опосредованной АФК цитотоксичности. Чтобы вызывать гибель клеток, повреждения, вызванные АФК, должны достигать определенных пороговых уровней. В сравнении с нормальными клетками опухолевые клетки обладают более высокой метаболической и пролиферативной активностью, поэтому они должны легче (быстрее) достигать критических уровней

вызванных АФК повреждений. Действительно, в нескольких экспериментальных моделях было показано, что АФК могут разрушать опухолевые клетки, не оказывая, при этом, существенного влияния на нормальные клетки [11, 28, 45, 52]. Эти данные строго подтверждают тот факт, что в сравнении с нормальными клетками, опухолевые клетки гораздо более чувствительны к токсическому действию АФК. Нужно также иметь в виду, что нормальные клетки, как правило, лучше в сравнении с опухолевыми клетками снабжаются кислородом крови, и, вследствие чего, они постоянно поддерживают выработку антиоксидантных молекул, нейтрализующих АФК. Теоретически оксигенация опухоли должна приводить к ингибированию активности HIF-1 α в опухолевой ткани и, тем самым, снижать опухолевый неангиогенез и метастазирование. Действительно, в модели немелкоклеточного рака легкого было показано, что гипербарическая оксигенация (ГБО) подавляет активность HIF-1 α и тормозит опухолевую прогрессию [54].

Оксигенация в традиционном лечении опухолевых заболеваний

Озонотерапия и ГБО традиционно используются для лечения заболеваний, приводящих к тканевой ишемии. Озон (O_3) представляет собой форму кислорода с тремя атомами и двумя неспаренными электронами. Растворимость озона в воде и плазме превышает в 10 раз водную растворимость кислорода. Перед использованием озонированный физиологический раствор обычно смешивают с кровью пациента [12]. Токсичность и клинические эффекты озона зависят главным образом от его концентрации и способа доставки в опухолевое микроокружение. Озонотерапия не применяется путем прямого вдыхания, поскольку озон значительно увеличивает сопротивление дыхательных путей без изменения эластичности легочной ткани, приводя к непроизвольному торможению вдоха и другим нарушениям функции легких [7]. Трансфузия насыщенной озоном крови может повышать оксигенацию опухоли без повышения артериального pO_2 . Хотя озон непосредственно не контактирует с опухолевыми клетками, он оказывает противоопухолевое действие главным образом через вторичные мессенджеры (такие как O_2 , H_2O_2 и 4-гидроксинон-наль) [11]. Поскольку озон является стимулятором трансмембранного потока O_2 , озонотерапия также способствует увеличению внутриклеточного уровня O_2 [29].

В качестве альтернативы, озонотерапия может применяться путем введения озонированной воды непосредственно в опухолевую зону *in situ*.

Показано, что такое введение может приводить к дозозависимой ингибции пролиферации и некрозу опухолевых клеток, существенно не затрагивая при этом жизнедеятельность нормальных клеток [27, 28]. В медицинской практике также используется ректальное введение озонированного раствора. Доставка кислорода может быть осуществлена через носовую полость. Возможны также варианты введения озонированного раствора в плевральную и брюшную полости. Мы предполагаем, что пероральный прием озонированной воды мог бы эффективно использоваться при лечении опухолей верхних отделов желудочно-кишечного тракта и рака печени. Однако мы не нашли опубликованных данных о пероральном использовании озона в практической онкологии. Важно то, что локальное введение озонированного раствора не несет рисков эмболизации кровеносных сосудов [5, 45].

ГБО заключается в введении чистого (100%) кислорода под повышенным давлением (в 1,5-3 раза выше нормального атмосферного давления). ГО повышает уровень O_2 в плазме, улучшает гемоглобин-независимый перенос O_2 в нормальные и опухолевые ткани [6, 16]. Было показано, что, как и озон, гипербарический O_2 способен повреждать раковые клетки посредством АФК-зависимых механизмов [16]. ГБО способна: 1) снижать пролиферацию раковых клеток; 2) оказывать антиангиогенный эффект; 3) снижать агрессивность опухоли; 4) улучшать результативность радиохимиотерапии [1, 17, 30], а также сглаживать негативное влияние гипоксии на Т-клеточный иммунитет [19].

В принципе, ингаляции O_2 (не O_3), широко используемые в клинической практике, могли бы быть использованы для лечения разных форм рака. Теоретически, эффекты ингаляционного O_2 должны быть аналогичны эффектам ГБО и опосредоваться через стимуляцию окислительного фосфорилирования и продукции АФК в митохондриях. Однако в открытой литературе нет данных, подтверждающих возможность эффективного противоопухолевого применения ингаляционного O_2 .

Теоретически хорошо васкуляризированные участки опухоли должны быть относительно устойчивы к действию АФК за счет выработки антиоксидантов, инактивирующих АФК. В этой связи окклюзия крупных кровеносных опухолевых сосудов в сочетании с последующей оксигенотерапией представляется перспективным методом лечения. В таких случаях гипоксия, вызванная окклюзией сосудов, будет призвана снижать выработку антиоксидантов в опухолевых

клетках и, тем самым, повышать их чувствительность к последующему токсическому действию кислорода. Сходный подход мог бы быть использован при назначении препаратов-ингибиторов неоваскуляризации.

Цитотоксичность химиолучевой терапии в значительной степени связывают с усилением внутриклеточной продукции АФК и свободных радикалов. В гипоксических условиях опухолевые клетки могут быть в три раза более устойчивы к лучевой и химиотерапии в сравнении с опухолевыми клетками, находящимися в среде, насыщенной кислородом [11, 18, 20]. Очевидно, что искусственная оксигенация опухоли должна приводить к приросту уровня АФК в опухолевых клетках и, тем самым, усиливать цитотоксический эффект химиолучевой терапии. В этой связи важно отметить, что современная онкология допускает комбинированное применение оксигенации опухоли с различными вариантами химиолучевой терапии [10], основываясь в основном на неожиданных наблюдениях того, что оксигенотерапия способна снижать побочные интоксикационные эффекты химиотерапии, тем самым предоставляя дополнительные возможности для оптимизации (усиления) системного лечения [42].

Оксигенация в иммунотерапевтическом лечении опухолевых заболеваний

Гипоксия резко снижает иммунотерапевтические возможности лечения опухолевого заболевания. Показано, что гипоксия способствует накоплению в ОМО иммуносупрессорных миелоидных клеток (MDSCs, myeloid-derived suppressor cells) и регуляторных Т-клеток (Treg), ингибирует Т-клеточную активацию, а также снижает количество цитотоксических Т-клеток [13]. Поэтому представляется целесообразным кислородную терапию комбинировать с иммунотерапией для того, чтобы максимально эффективно противодействовать иммуносупрессивным эффектам гипоксии.

Согласно современным представлениям, опухоль посредством стимуляции воспаления и регенеративного иммунитета создает благоприятные условия для своего развития. Поэтому лечение запущенных форм рака должно в обязательном порядке включать в себя противовоспалительную терапию, направленную на «охлаждение» чрезмерно воспаленной опухоли. Показано, что АФК могут способствовать накоплению иммунных клеток в воспалительных очагах [26, 40]. С другой стороны, получены убедительные доказательства того, что АФК обладают противовоспалительными свойствами [30]. Противовоспалительные меха-

низмы действия АФК пока четко не определены. Возможно, они обусловлены способностью АФК: 1) улучшать кровообращение [5]; 2) ингибировать синтез простагландинов [32]; 3) стимулировать выработку антиоксидантов в иммунных клетках и 4) снижать ацидоз в ОМО [15, 45].

Показано, что АФК, продуцируемые иммунными клетками, способны прямо ингибировать прогрессирование опухоли [24]. АФК также могут усиливать противоопухолевую иммунную защиту за счет стимуляции продукции интерферона- γ , фактора некроза опухоли- α , интерлейкина-2 (IL-2) и IL-6 [26, 28, 45], а также за счет усиления активности противоопухолевых Т-лимфоцитов и натуральных киллеров [28]. Кроме того, кислородная терапия может обеспечить дополнительную иммуностимуляцию посредством индукции мутагенеза в опухоли, который приводит к появлению новых иммуногенных неоантигенов. Следует, однако, иметь в виду, что АФК способны также негативно влиять на противоопухолевый иммунитет. В частности, окислительный стресс может: 1) способствовать накоплению регуляторных Т-клеток (Treg) и миелоидных супрессорных клеток в ОМО; 2) поддерживать функциональную активность альтернативно активированных (M2) макрофагов и (N2) нейтрофилов, поддерживающих опухолевый рост; а также 3) нарушать презентацию иммуногенных антигенов дендритными клетками [26].

Фактически доминирующее влияние АФК (положительное или отрицательное) на иммунитет, зависит от их дозы. Как было показано ранее [26, 50], относительно низкие концентрации АФК способны поддерживать активацию, пролиферацию и дифференцировку Т-лимфоцитов, тогда как высокие концентрации АФК обладают обратным эффектом. В частности, низкие уровни АФК в ОМО усиливают функциональную активность Th1- и Th17-клеток [3], в то время как высокие уровни АФК поддерживают жизнеспособность Th2-клеток [14]. Теоретически, для получения максимального противоопухолевого эффекта низкодозную оксигенотерапию следует сочетать с иммунотерапией, усиливающей кислородную иммуностимуляцию, а высокодозную оксигенотерапию следует дополнять иммунотерапией, снижающей кислородную иммуносупрессию. В принципе, уровень окислительного стресса можно регулировать антиоксидантами. В частности, было показано, что N-ацетилцистеин способен поддерживать жизнеспособность и функциональную активность лимфоцитов, инфильтрирующие опухоль (TIL) [38].

Ингибиторы иммунных контрольных точек обеспечили революционный прорыв в современной онкологии [34]. Имеются данные о синергетическом эффекте лекарственной активации митохондрий (и продукции АФК) и антительной ингибцией PD-1 на стимуляцию противоопухолевого Т-клеточного иммунитета [8]. В другом исследовании показана прямая корреляция между способностью опухолевых клеток потреблять кислород и их чувствительностью к функциональной блокаде PD-1 [37]. Эти данные позволяют предположить наличие противоопухолевого синергизма контролируемой оксигенотерапии не только с ингибированием иммуносупрессорных молекул, но и с другими иммунотерапевтическими вмешательствами (рис. 1). В целом эти вмешательства должны быть направлены на стимуляцию опосредованных Th1-клетками иммунных реакций, которые, в свою очередь, усиливают противоопухолевую активность N1-

гранулоцитов и M1-макрофагов, стимулируют цитотоксическую активность естественных киллерных клеток, а также создают необходимые условия для генерации цитотоксических Т-лимфоцитов [41]. В дополнение к этому, оксигенация ОМО может обеспечить энергетическую поддержку противоопухолевым иммунным механизмам за счет усиления выработки аденозинтрифосфата (АТФ) в иммунных клетках [40].

Гипертермия (или термотерапия) – это иммуностропный неинвазивный метод лечения рака, часто применяемый в сочетании с химиолучевой терапией. Гипертермия подразделяется на локальную, регионарную и общую (нагревание всего тела). Показана связь гипертермических реакций организма с продукцией АФК [21, 48]. Умеренная гипертермия (39-41 °С) вызывает термотолерантность – адаптивное состояние организма, характеризующееся повышенной устойчивостью к действию повышенных температур

КИСЛОРОДНАЯ ТЕРАПИЯ / OXYGEN THERAPY

+

ИММУНОТЕРАПИЯ / IMMUNOTHERAPY

Озонотерапия / Ozone therapy
Гиперпарическая оксигенация / Hyperbaric oxygenation
Кислородная ингаляция / Oxygen inhalation



Блокада иммуносупрессорных молекул
Blockade of immunosuppressive molecules
Медикаментозная иммуностимуляция
Drug-mediated immunostimulation
Адоптивная клеточная иммунотерапия
Adoptive cellular immunotherapy
Гипертермия / Hyperthermia

ПРЕДОТВРАЩЕНИЕ (ИЛИ ТОРМОЖЕНИЕ) ОПУХОЛЕВОЙ ПРОГРЕССИИ PREVENTION (OR INHIBITION) OF TUMOR PROGRESSION

Усиление внутриклеточной продукции АФК / Enhancement of intracellular ROS production
Повышение чувствительности опухоли к цитотоксическим воздействиям / Increasing the sensitivity of the tumor to cytotoxic effects
Снижение индуцируемого опухолью воспаления / Reducing tumor-induced inflammation
Снижение лактатного ацидоза / Decreasing lactic acidosis
Подавление опухолевой неоваскуляризации / Suppression of tumor neovascularization
Стимуляция противоопухолевых иммунных реакций / Stimulation of antitumor immune responses

Рисунок 1. Комбинированная биологическая терапия опухолевых заболеваний

Примечание. Оксигенация опухоли в комбинации с иммунотерапевтическими воздействиями может быть использована для усиления выработки АФК и повышения чувствительности опухоли к цитотоксическим воздействиям, для подавления индуцируемого опухолью воспаления и снижения лактатного ацидоза, а также для торможения процессов неоваскуляризации и усиления противоопухолевых иммунных реакций. Подробное описание в тексте.

Figure 1. Schematic representation of a combined biological cancer therapy paradigm based on various forms of oxygen therapy and immunotherapy

Note. We maintain that such combination protocols would be safe and effective in down-regulating tumour-protective inflammation, lactate acidosis and neovascularisation, while on the other hand enhancing anti-tumour immunity, intracellular ROS production and tumour sensitivity to immunotherapy-induced cytotoxicity. See detailed explanation in the text.

Жесткая гипертермия (42 °С и выше) вызывает в клетках тепловой стресс, который стимулирует митохондриальную продукцию АФК и вызывает повреждение клеток [4]. Совместное применение оксигенотерапией и гипертермии может улучшать микроциркуляцию и, тем самым, облегчать доставку кислорода в ОМО. Теоретически, такая лечебная комбинация должна стимулировать миграцию иммунных клеток в ОМО, а также усиливать цитотоксическое действие химиотерапии. В соответствии с этим предположением было показано, что ГБО, совмещенная с гипертермией, может усиливать цитотоксические эффекты карбоплатины в мышинной модели карциномы SCCVII [31]. Кроме того, установлено, что повышенные температуры стимулируют иммунные реакции в ОМО, а также повышают общую иммунную реактивность. В частности, умеренная гипертермия способствует созреванию дендритных клеток и повышает Т-клеточную реактивность. Такая гипертермия также усиливает противоопухолевую активность НК-клеток [9, 42]. Комбинация гипертермии с ГБО оказалась эффективной в лечении распространенного рака желудка [23]. Важно то, что иммуностимулирующая гипертермия (39,5-40,5 °С) не имеет с серьезными побочными эффектами.

Из сказанного выше следует, что оксигенотерапия обладает высоким, пока еще до конца не-

использованным потенциалом в борьбе с раком. Наиболее перспективным представляется ее использование в сочетании с различными иммунотерапевтическими вмешательствами, включая гипертермию. Как очерчено на рисунке 1, различные биологические методы лечения могут мобилизовать разные противоопухолевые механизмы и их совместное действие может обеспечить достижения максимально возможного клинического эффекта с минимальными побочными эффектами.

Заключение

Известно, что гипоксия способствует прогрессированию рака. Оксигенация опухоли приводит к окислительному стрессу и повышению уровней АФК в опухолевой ткани. В сравнении с нормальными клетками, опухолевые клетки намного более чувствительны к прямому цитотоксическому действию АФК. Установлено, что кислородная терапия способна повысить эффективность стандартной химиолучевой терапии. Мы предполагаем, что комбинирование оксигенотерапии с иммунотерапевтическими воздействиями позволит получить максимально возможный клинический эффект с минимальными побочными эффектами.

Список литературы / References

1. Abdelhakim H., Shune L., Bhatti S., Cantilena A.R., Baran A., Lin T.L., Ganguly S., Singh A.K., Abhyankar S., Divine C., Lipe B., McGuirk J., Allin D., Aljitiawi O.S. Results of the first clinical study in humans that combines hyperbaric oxygen pretreatment with autologous peripheral blood stem cell transplantation. *Biol. Blood Marrow Transplant.*, 2019, Vol. 25, no. 9, pp. 1713-1719.
2. Ahmed Amar S.A., Eryilmaz R., Demir H., Aykan S., Demir C. Determination of oxidative stress levels and some antioxidant enzyme activities in prostate cancer. *Aging Male*, 2019, Vol. 22, no. 3, pp. 198-206.
3. Abimannan T., Peroumal D., Parida J.R., Barik P.K., Padhan P., Devadas S. Oxidative stress modulates the cytokine response of differentiated Th17 and Th1 cells. *Free Radic. Biol. Med.*, 2016, Vol. 99, pp. 352-363.
4. Ba M.C., Long H., Wang S., Wu Y.B., Zhang B.H., Yan Z.F., Yu F.H., Cui S.Z. Hyperthermia enhances radiosensitivity of colorectal cancer cells through ROS inducing autophagic cell death. *J. Cell. Biochem.*, 2018, Vol. 119, no. 4, pp. 3763-3774.
5. Bocci V.A. Scientific and medical aspects of ozone therapy. State of the art. *Arch. Med. Res.*, 2006, Vol. 37, no. 4, pp. 425-435.
6. Brizel D.M., Lin S., Johnson J.L., Brooks J., Dewhirst M.W., Piantadosi C.A. The mechanisms by which hyperbaric oxygen and carbogen improve tumour oxygenation. *Br. J. Cancer*, 1995, Vol. 72, no. 5, pp. 1120-1124.
7. Bromberg P.A. Mechanisms of the acute effects of inhaled ozone in humans. *Biochim. Biophys. Acta*, 2016, Vol. 1860, no. 12, pp. 2771-2781.
8. Chamoto K., Chowdhury P.S., Kumar A., Sonomura K., Matsuda F., Fagarasan S., Honjo T. Mitochondrial activation chemicals synergize with surface receptor PD-1 blockade for T cell-dependent antitumor activity. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 2017, Vol. 114, no. 5, pp. E761-E770.
9. Cheng Y., Weng S., Yu L., Zhu N., Yang M., Yuan Y. The role of hyperthermia in the multidisciplinary treatment of malignant tumors. *Integr. Cancer Ther.*, 2019, Vol. 18, 1534735419876345. doi: 10.1177/1534735419876345.

10. Clavo B., Rodríguez-Esparragón F., Rodríguez-Abreu D., Martínez-Sánchez G., Llontop P., Aguiar-Bujanda D., Fernández-Pérez L., Santana-Rodríguez N. Modulation of oxidative stress by ozone therapy in the prevention and treatment of chemotherapy-induced toxicity: review and prospects. *Antioxidants (Basel)*, 2019, Vol. 8, no. 12, 588. doi: 10.3390/antiox8120588.
11. Clavo B., Santana-Rodríguez N., Llontop P., Gutiérrez D., Suárez G., López L., Rovira G., Martínez-Sánchez G., González E., Jorge I.J., Perera C., Blanco J., Rodríguez-Esparragón F. Ozone therapy as adjuvant for cancer treatment: is further research warranted? *Evid. Based Complement Alternat. Med.*, 2018, Vol. 2018, 7931849. doi: 10.1155/2018/7931849.
12. Clavo B., Pérez J.L., López L., Suárez G., Lloret M., Rodríguez V., Macías D., Santana M., Hernández M.A., Martín-Oliva R., Robaina F. Ozone therapy for tumor oxygenation: a pilot study. *Evid Based Complement Alternat Med.*, 2004, Vol. 1, no. 1, pp. 93-98.
13. Daniel S.K., Sullivan K.M., Labadie K.P., Pillarisetty V.G. Hypoxia as a barrier to immunotherapy in pancreatic adenocarcinoma. *Clin. Transl. Med.*, 2019, Vol. 8, no. 1, 10. doi: 10.1186/s40169-019-0226-9.
14. Frossi B., de Carli M., Piemonte M., Pucillo C. Oxidative microenvironment exerts an opposite regulatory effect on cytokine production by Th1 and Th2 cells. *Mol. Immunol.*, 2008, Vol. 45, no. 1, pp. 58-64. doi: 10.1016/j.molimm.2007.05.008.
15. Galiè M., Covi V., Tabaracci G., Malatesta M. The Role of Nrf2 in the antioxidant cellular response to medical ozone exposure. *Int. J. Mol. Sci.*, 2019, Vol. 20, no. 16, 4009. doi: 10.3390/ijms20164009.
16. Gill A.L., Bell C.N. Hyperbaric oxygen: its uses, mechanisms of action and outcomes. *QJM*, 2004, Vol. 97, no. 7, pp. 385-395.
17. Gore A., Muralidhar M., Espey M.G., Degenhardt K., Mantell L.L. Hyperoxia sensing: from molecular mechanisms to significance in disease. *J. Immunotoxicol.*, 2010, Vol. 7, no. 4, pp. 239-254.
18. Gray L.H., Conger A.D., Ebert M., Hornsey S., Scott O.C. The concentration of oxygen dissolved in tissues at the time of irradiation as a factor in radiotherapy. *Br. J. Radiol. Dec.*, 1953, Vol. 26, no. 312, pp. 638-648.
19. Hegde A., Jayaprakash P., Couillault C.A., Piha-Paul S., Karp D., Rodon J., Pant S., Fu S., Dumbrava E.E., Yap T.A., Subbiah V., Bhosale P., Coarfa C., Higgins J.P., Williams E.T., Wilson T.F., Lim J., Meric-Bernstam F., Sumner E., Zain H., Nguyen D., Nguyen L.M., Rajapakshe K., Curran M.A., Hong D.S. A phase I dose-escalation study to evaluate the safety and tolerability of evofosfamide in combination with ipilimumab in advanced solid malignancies. *Clin. Cancer Res.*, 2021, Vol. 27, no. 11, pp. 3050-3060.
20. Horsman M.R., Vaupel P. Pathophysiological basis for the formation of the tumor microenvironment. *Front. Oncol.*, 2016, Vol. 6, 66. doi: 10.3389/fonc.2016.00066.
21. Hou C.H., Lin F.L., Hou S.M., Liu J.F. Hyperthermia induces apoptosis through endoplasmic reticulum and reactive oxygen species in human osteosarcoma cells. *Int. J. Mol. Sci.*, 2014, Vol. 15, no. 10, pp. 17380-17395.
22. Inal M., Dokumacioglu A., Özcelik E., Ucar O. The effects of ozone therapy and coenzyme Q₁₀ combination on oxidative stress markers in healthy subjects. *Ir. J. Med. Sci.*, 2011, Vol. 180, no. 3, pp. 703-707.
23. Iyikesici M.S. Survival outcomes of metabolically supported chemotherapy combined with ketogenic diet, hyperthermia, and hyperbaric oxygen therapy in advanced gastric cancer. *Niger J. Clin. Pract.*, 2020, Vol. 23, no. 5, pp. 734-740.
24. Kalafati L., Kourtzelis I., Schulte-Schrepping J., Li X., Hatzioannou A., Grinenko T., Hagag E., Sinha A., Has C., Dietz S., de Jesus Domingues A.M., Nati M., Sormendi S., Neuwirth A., Chatzigeorgiou A., Ziogas A., Lesche M., Dahl A., Henry I., Subramanian P., Wielockx B., Murray P., Mirtschink P., Chung K.J., Schultze J.L., Netea M.G., Hajishengallis G., Verginis P., Mitroulis I., Chavakis T. Innate immune training of granulopoiesis promotes anti-tumor activity. *Cell*, 2020, Vol. 183, no. 3, pp. 771-785.e12.
25. Korenaga D., Takesue F., Kido K., Yasuda M., Inutsuka S., Honda M., Nagahama S. Impaired antioxidant defense system of colonic tissue and cancer development in dextran sulfate sodium-induced colitis in mice. *J. Surg. Res.*, 2002, Vol. 102, no. 2, pp. 144-149.
26. Kotsafti A., Scarpa M., Castagliuolo I., Scarpa M. Reactive oxygen species and antitumor immunity—from surveillance to evasion. *Cancers (Basel)*, 2020, Vol. 12, no. 7, 1748. doi: 10.3390/cancers12071748.
27. Kuroda K., Azuma K., Mori T., Kawamoto K., Murahata Y., Tsuka T., Osaki T., Ito N., Imagawa T., Itoh F., Okamoto Y. The safety and anti-tumor effects of ozonated water *in vivo*. *Int. J. Mol. Sci.*, 2015, Vol. 16, no. 10, pp. 25108-25120.
28. Luongo M., Brigida A.L., Mascolo L., Gaudino G. Possible therapeutic effects of ozone mixture on hypoxia in tumor development. *Anticancer Res.*, 2017, Vol. 37, no. 2, pp. 425-435.
29. Madej P., Plewka A., Madej J.A., Nowak M., Plewka D., Franik G., Golka D. Ozonotherapy in an induced septic shock. I. Effect of ozonotherapy on rat organs in evaluation of free radical reactions and selected enzymatic systems. *Inflammation*, 2007, Vol. 30, no. 1-2, pp. 52-58.

30. Moen I., Stuhr L.E. Hyperbaric oxygen therapy and cancer – a review. *Target. Oncol.*, 2012, Vol. 7, no. 4, pp. 233-242.
31. Ohguri T., Kunugita N., Yahara K., Imada H., Uemura H., Shinya N., Youjirou G., Takashi C., Okazaki R., Ootsuyama A., Korogi Y. Efficacy of hyperbaric oxygen therapy combined with mild hyperthermia for improving the anti-tumour effects of carboplatin. *Int. J. Hyperthermia*, 2015, Vol. 31, no. 6, pp. 643-648.
32. Orakdogan M., Uslu S., Emon S.T., Somay H., Meric Z.C., Hakan T. The effect of ozone therapy on experimental vasospasm in the rat femoral artery. *Turk. Neurosurg.*, 2016, Vol. 26, no. 6, pp. 860-865.
33. Otto A.M. Warburg effect(s)-a biographical sketch of Otto Warburg and his impacts on tumor metabolism. *Cancer Metab.*, 2016, Vol. 4, 5. doi: 10.1186/s40170-016-0145-9.
34. Pan C., Liu H., Robins E., Song W., Liu D., Li Z., Zheng L. Next-generation immuno-oncology agents: current momentum shifts in cancer immunotherapy. *J. Hematol. Oncol.*, 2020, Vol. 13, no. 1, 29. doi: 10.1186/s13045-020-00862-w.
35. Payen V.L., Brisson L., Dewhirst M.W., Sonveaux P. Common responses of tumors and wounds to hypoxia. *Cancer J.*, 2015, Vol. 21, no. 2, pp. 75-87.
36. Pham-Huy L.A., He H., Pham-Huy C. Free radicals, antioxidants in disease and health. *Int. J. Biomed. Sci.*, 2008, Vol. 4, no. 2, pp. 89-96.
37. Scharping N.E., Menk A.V., Whetstone R.D., Zeng X., Delgoffe G.M. Efficacy of PD-1 blockade is potentiated by metformin-induced reduction of tumor hypoxia. *Cancer Immunol. Res.*, 2017, Vol. 5, no. 1, pp. 9-16.
38. Scheffel M.J., Scurti G., Simms P., Garrett-Mayer E., Mehrotra S., Nishimura M.I., Voelkel-Johnson C. Efficacy of adoptive T-cell therapy is improved by treatment with the antioxidant N-acetyl cysteine, which limits activation-induced T-cell death. *Cancer Res.*, 2016, Vol. 76, no. 20, pp. 6006-6016.
39. Shen Z.Y., Shen W.Y., Chen M.H., Shen J., Zeng Y. Reactive oxygen species and antioxidants in apoptosis of esophageal cancer cells induced by As₂O₃. *Int. J. Mol. Med.*, 2003, Vol. 11, no. 4, pp. 479-484.
40. Seledtsov V.I., von Delwig A. Clinically feasible and prospective immunotherapeutic interventions in multidirectional comprehensive treatment of cancer. *Expert Opin. Biol. Ther.*, 2020, Vol. 21, no. 3, pp. 323-342.
41. Seledtsov V.I., Seledtsova G.V. A balance between tissue-destructive and tissue-protective immunities: a role of toll-like receptors in regulation of adaptive immunity. *Immunobiology*, 2012, Vol. 217, no. 4, pp. 430-435.
42. Skitzki J.J., Repasky E.A., Evans S.S. Hyperthermia as an immunotherapy strategy for cancer. *Curr. Opin. Investig. Drugs*, 2009, Vol. 10, no. 6, pp. 550-558
43. Skrzycki M., Czczot H., Chrzanowska A., Otto-Ślusarczyk D. The level of superoxide dismutase expression in primary and metastatic colorectal cancer cells in hypoxia and tissue normoxia. *Pol. Merkur. Lekarski*, 2015, Vol. 39, no. 233, pp. 281-286. (In Polish)
44. Sosa V., Moliné T., Somoza R., Paciucci R., Kondoh H., LLeonart M.E. Oxidative stress and cancer: an overview. *Ageing Res. Rev.*, 2013, Vol. 12, no. 1, pp. 376-390.
45. Smith N.L., Wilson A.L., Gandhi J., Vatsia S., Khan S.A. Ozone therapy: an overview of pharmacodynamics, current research, and clinical utility. *Med. Gas Res.*, 2017, Vol. 7, no. 3, pp. 212-219.
46. Tchouagué M., Grondin M., Glory A., Averill-Bates D. Heat shock induces the cellular antioxidant defenses peroxiredoxin, glutathione and glucose 6-phosphate dehydrogenase through Nrf2. *Chem. Biol. Interact.*, 2019, Vol. 310, 108717. doi: 10.1016/j.cbi.2019.06.030.
47. Teppo H.R., Soini Y., Karihtala P. Reactive oxygen species-mediated mechanisms of action of targeted cancer therapy. *Oxid. Med. Cell. Longev.*, 2017, Vol. 2017, 1485283. doi: 10.1155/2017/1485283.
48. Terasaki A., Kurokawa H., Ito H., Komatsu Y., Matano D., Terasaki M., Bando H., Hara H., Matsui H. Elevated production of mitochondrial reactive oxygen species via hyperthermia enhanced cytotoxic effect of doxorubicin in human breast cancer cell lines MDA-MB-453 and MCF-7. *Int. J. Mol. Sci.*, 2020, Vol. 21, no. 24, E9522. doi: 10.3390/ijms21249522.
49. Vaupel P., Mayer A., Höckel M. Tumor hypoxia and malignant progression. *Methods Enzymol.*, 2004, Vol. 381, pp. 335-354.
50. Weinberg S.E., Sena L.A., Chandel N.S. Mitochondria in the regulation of innate and adaptive immunity. *Immunity*, 2015, Vol. 42, no. 3, pp. 406-417.
51. Wu D., Yotnda P. Production and detection of reactive oxygen species (ROS) in cancers. *J. Vis. Exp.*, 2011, no. 57, 3357. doi: 10.3791/3357.
52. Yan J., Kloecker G., Fleming C., Bousamra M. 2nd, Hansen R., Hu X., Ding C., Cai Y., Xiang D., Donniger H., Eaton J.W., Clark G.J. Human polymorphonuclear neutrophils specifically recognize and kill cancerous cells. *Oncoimmunology*, 2014, Vol. 3, no. 7, e950163. doi: 10.4161/15384101.2014.950163.
53. Yigitbasi O.G., Guney E., Haghighi N., Dogan P., Saraymen R., Balkanli S. Oxidant and antioxidant status in larynx squamous cell carcinomas. *J. Exp. Clin. Cancer Res.*, 2000, Vol. 19, no. 4, pp. 447-451.

54. Zhang L., Ke J., Min S., Wu N., Liu F., Qu Z., Li W., Wang H., Qian Z., Wang X. Hyperbaric oxygen therapy represses the Warburg effect and epithelial-mesenchymal transition in hypoxic NSCLC cells *via* the HIF-1 α /PFKP axis. *Front. Oncol.*, 2021, Vol. 11, 691762. doi: 10.3389/fonc.2021.691762.
55. Zuo L., Prather E.R., Stetskiy M., Garrison D.E., Meade J.R., Peace T.I., Zhou T. Inflammaging and oxidative stress in human diseases: from molecular mechanisms to novel treatments. *Int. J. Mol. Sci.*, 2019, Vol. 20, no. 18, 4472. doi: 10.3390/ijms20184472.

Авторы:

Селедцов В.И. – д.м.н., профессор, главный научный сотрудник ФГБНУ «Российский научный центр хирургии имени академика Б.В. Петровского», Москва, Россия

Доржиева А.Б. – аспирант ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», Новосибирск, Россия

Селедцова Г.В. – д.м.н., главный научный сотрудник ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», Новосибирск, Россия

Authors:

Seledtsov V.I., PhD, MD (Medicine), Professor, Chief Research Associate, B. Petrovsky Russian Research Center for Surgery, Moscow, Russian Federation

Dorzhiyeva A.B., Postgraduate Student, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

Seledtsova G.V., PhD, MD (Medicine), Chief Research Associate, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

Поступила 01.08.2022

Отправлена на доработку 14.08.2022

Принята к печати 04.04.2023

Received 01.08.2022

Revision received 14.08.2022

Accepted 04.04.2023

ВЛИЯНИЕ ГЛИКОДЕЛИНА НА CCR6⁺ СУБПОПУЛЯЦИИ Т-ХЕЛПЕРОВ, ПОЛЯРИЗОВАННЫХ В ФЕНОТИП Th17

Тимганова В.П.¹, Заморина С.А.^{1,2}, Бочкова М.С.^{1,2}, Шардина К.Ю.¹,
Ужвиюк С.В.¹, Кропанева М.Д.^{1,2}, Раев М.Б.^{1,2}

¹ Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук – филиал ФГБУН «Пермский федеральный исследовательский центр Уральского отделения Российской академии наук» г. Пермь, Россия

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

Резюме. Гликоделины, белки репродуктивного тракта, отличающиеся гликозилированием и обладающие иммуномодулирующими функциями, представляют интерес в связи с их ролью в формировании иммунной толерантности. Интерлейкин-17-продуцирующие Т-хелперы (Th17), несущие поверхностный маркер CCR6, являются гетерогенной клеточной популяцией с повышенной пластичностью и функциональной дихотомией. С одной стороны, эти клетки поддерживают антимикробный и противогрибковый иммунитет, состав микробиоты, а с другой – участвуют в патогенезе аутоиммунных заболеваний, отторжении трансплантата и осложнениях беременности. Несмотря на достаточно высокий научный интерес к гликоделину как к иммуномодулятору, его прямые эффекты на провоспалительные Th17 не изучались. Поэтому целью нашей работы было исследовать влияние рекомбинантного гликоделина человека на Th17-поляризацию наивных Т-хелперов человека, оценивая экспрессию ими поверхностных молекул CCR6, CCR4 и CXCR3. Наивные Т-хелперы поляризовали в Th17 *in vitro* при помощи активатора TCR и цитокинов в течение 7 дней с добавлением гликоделина в концентрациях, характерных для первого-второго триместров беременности. После этого определяли процент популяции CD4⁺CCR6⁺ клеток (Th17), и ее CCR4⁺CXCR3⁻ (Th17/Th22) и CCR4⁻CXCR3⁺ (Th17.1) субпопуляций. Кроме того, при помощи мультиплексного анализа определяли концентрацию цитокинов и хемокинов в супернатантах культур Th17-поляризованных Т-хелперов. Рекомбинантный гликоделин в концентрациях, соответствующих таковым при беременности (0,2, 2 и 10 мкг/мл), не изменял процент CD4⁺CCR6⁺ клеток в культуре и продукцию ими IL-17 и других исследуемых цитокинов. Однако в концентрации 10 мкг/мл он снижал долю Th17.1 (CCR6⁺CCR4⁻CXCR3⁺) и увеличивал концентрацию IL-2 в культуре Т-хелперов. Помимо этого, установлено, что гликоделин в концентрации 2 мкг/мл проявляет избирательную апоптотическую активность в от-

Адрес для переписки:

Тимганова Валерия Павловна
Институт экологии и генетики микроорганизмов
Уральского отделения Российской академии наук
614081, Россия, г. Пермь, ул. Голева, 13.
Тел.: 8 (342) 280-77-94.
Факс: 8 (342) 280-92-11.
E-mail: timganovavp@gmail.com

Address for correspondence:

Valeria P. Timganova
Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms
13 Golev St
Perm
614081 Russian Federation
Phone: +7 (342) 280-77-94.
Fax: +7 (342) 280-92-11.
E-mail: timganovavp@gmail.com

Образец цитирования:

В.П. Тимганова, С.А. Заморина, М.С. Бочкова,
К.Ю. Шардина, С.В. Ужвиюк, М.Д. Кропанева,
М.Б. Раев «Влияние гликоделина на CCR6⁺
субпопуляции Т-хелперов, поляризованных в фенотип
Th17» // Медицинская иммунология, 2023. Т. 25, № 6.
С. 1329-1342. doi: 10.15789/1563-0625-EOG-2580

© Тимганова В.П. и соавт., 2023

Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

V.P. Timganova, S.A. Zamorina, M.S. Bochkova,
K.Yu. Shardina, S.V. Uzhviyuk, M.D. Kropaneva, M.B. Rayev
“Effects of glycodelin on CCR6⁺ cell subpopulations of Th17-
polarized helper T cells”, *Medical Immunology (Russia)/
Meditsinskaya Immunologiya*, 2023, Vol. 25, no. 6,
pp. 1329-1342.

doi: 10.15789/1563-0625-EOG-2580

© Timganova V.P. et al., 2023
The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License

DOI: 10.15789/1563-0625-EOG-2580

ношении Th17.1. В силу описанной вовлеченности этих клеток в патологические процессы, данный эффект гликоделина может представлять интерес с точки зрения биофармацевтики, но механизм обнаруженного избирательного действия этого белка беременности требует дальнейшего исследования.

Ключевые слова: гликоделин, IL-17, Th17, CCR6⁺T-хелперы, PP14, PAEP

EFFECTS OF GLYCODELIN ON CCR6⁺ CELL SUBPOPULATIONS OF Th17-POLARIZED HELPER T CELLS

Timganova V.P.^a, Zamorina S.A.^{a, b}, Bochkova M.S.^{a, b}, Shardina K.Yu.^a, Uzhviyuk S.V.^a, Kropaneva M.D.^{a, b}, Rayev M.B.^{a, b}

^a Institute of Ecology and Genetic of Microorganisms, Perm Federal Research Center, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Perm, Russian Federation

^b Perm State University, Perm, Russian Federation

Abstract. Glycodelins, the glycosylated proteins of reproductive tract are characterized by immunomodulatory functions, are of interest because of their role in the development of immune tolerance. Interleukin-17-producing T helpers (Th17) bearing the surface marker CCR6, are a heterogeneous cell population with increased plasticity and functional dichotomy. On the one hand, these cells support antimicrobial and antifungal immunity and microbiota composition; on the other hand, they are involved in the pathogenesis of autoimmune diseases, graft rejection, and pregnancy complications. Despite the scientific interest in glycodelin as an immunomodulator, its direct effects on pro-inflammatory Th17 have not been studied. Therefore, the aim of our work was to investigate the effect of recombinant human glycodelin on Th17 polarization of naïve human T helper cells by assessing surface expression of CCR6, CCR4, and CXCR3 molecules. Naïve T helper cells were polarized for 7 days *in vitro* to Th17 cells with a TCR activator and cytokines for 7 days, supplemented with glycodelin at concentrations appropriate for the 1st and 2nd trimesters of pregnancy. The percentages of CD4⁺CCR6⁺ cell population (Th17 cells), and their CCR4⁺CXCR3⁻ (Th17/Th22) and CCR4⁻CXCR3⁺ subpopulations (Th17.1) was then determined. Moreover, the levels of IL-17, IL-2, and other cytokines/chemokines were determined in the culture supernatants of Th17-polarized T helper cells. Treatment with recombinant glycodelin at concentrations equivalent to those in pregnancy (0.2, 2, and 10 µg/mL) did not alter the percentage of CD4⁺CCR6⁺ cells in culture, or their IL-17 production. However, at a concentration of 10 µg/mL, it caused a decrease in Th17.1 (CCR6⁺CCR4⁻CXCR3⁺) percentage in the T helper culture, and increased the production of IL-2. In addition, glycodelin was found to have selective pro-apoptotic activity against Th17.1 if applied at 2 µg/mL. Given the known involvement of these cells in pathological processes, the observed effect of glycodelin could be of interest from a biopharmaceutical perspective. However, the mechanism of the revealed selective effects of this pregnancy protein needs further investigation.

Keywords: glycodelin, IL-17, Th17, CCR6⁺T helpers, PP14, PAEP

The study was funded by the Russian Foundation for Basic Research under grant no. 19-29-04055 мк and by the Perm Scientific and Educational Center "Rational Subsoil Use", 2023.

Introduction

Scientific interest in pregnancy (placental) glycoproteins has not diminished for decades [10, 17, 49]. First of all, these molecules are fascinating in the context of basic research on the phenomenon of immunological tolerance between mother and fetus. Moreover, the effects of these molecules on various cells of the immune system open the way to the world of

a promising industry – biopharmacy [39]. Glycodelins are human glycoproteins that belong to the lipocalin superfamily [63] and bind small hydrophobic molecules, cell surface receptors, and soluble macromolecules [12]. Four isoforms of glycodelin (A, C, F, S) are secreted in reproductive organs and exhibit sex-specific glycosylation that regulates important phases of human reproduction [34, 61, 62, 79]. The immunosuppressive effect of glycodelin has been known for a long time and is interpreted by researchers as one of the mechanisms that allow to protect a semi-allogenic fetus from the mother's immune system [5]. However, the discovery of previously unknown

subpopulations of immunocompetent cells involved in pro- and anti-inflammatory responses, including those at the maternal-fetal interface, presents researchers with new challenges. In addition, the demand for mild, side-effect-free immunosuppressants and the booming biopharmaceutical market are opening the way for new research on glycodelin. Since bacterial protein expression systems are still the most productive and available, recombinant forms of glycodelin are more promising for use as biopharmaceuticals [27].

IL-17 producing helper T cells (Th17) differs from other subpopulations of T helper cells by a certain dichotomy of their functions [59, 67]. On the one hand, they protect against mucosal pneumococcal infections, eliminate extracellular infections, maintain the composition of the microbiota and provide antifungal immunity [8, 19, 30, 35, 36, 80]. On the other hand, Th17 are involved in the pathology of autoimmune diseases (psoriasis, rheumatoid arthritis, multiple sclerosis, inflammatory bowel disease) and transplant rejection, and are associated with pregnancy complications and tumor development [18, 19, 58, 70]. An increase in Th17 count during pregnancy indicates pathological changes and may lead to preterm delivery or miscarriage [58]. It has been shown that the inflammatory hypoxic conditions that led to neuropathology in mouse offspring were due to IL-17RA signaling, as IL-17RA^{-/-} mice were protected from disease, supported by clinical data of high Th17 cell numbers in children diagnosed with autism spectrum disorder [23]. This duality is largely determined by the so-called “plasticity” of these cells. The observed plasticity of Th17 is determined by the epigenetic regulation of key transcription factors and cytokines that set the polarization state [55]. When the cytokine milieu changes, they can transdifferentiate into other Th-like subpopulations. For example, when they begin to produce IFN γ , Th17 take on the characteristics of Th1 cells [66]. Now such cells are referred to as pathogenic Th17 [73]. There is evidence that these cells (also called Th17-derived Th1) play an important role in the pathogenesis of chronic inflammatory diseases with autoimmune character [15, 31].

Although there are many articles on the immunomodulatory effects of glycodelin, its impact on the Th17 proinflammatory subpopulation have been studied in only a few research papers. For example, in a 2012 study, macrophages treated with GdA in co-culture with autologous lymphocytes had no significant effect on intracellular IL-17 levels of T helper cells [32]. Studies on the direct effect of glycodelin on Th17 and its subpopulations according to the expression of chemokine surface receptors have not been performed yet.

If glycodelin retains its immunosuppressive properties, it could be used in biomedicine as a biopharmaceutical for the treatment of post-transplant

complications [9, 56] and autoimmune diseases [46]. Therefore, the aim of this study was to investigate the direct effects of the recombinant form of glycodelin on Th17 polarization of CD4⁺ cells.

Materials and methods

The research was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki of the World Medical Association and the Council of Europe Protocol to the Convention on Human Rights and Biomedicine and approved by the Ethics Committee of the Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences (IRB00010009) on August 30, 2019. Written informed consent was obtained from all participants.

The main stages of the experiment were as follows: Isolation of naïve T helpers from peripheral blood mononuclear cells, their cultivation under Th17-polarizing conditions (TCR activator⁺ a complex of cytokines and antibodies) with the addition of glycodelin (or glycerol) at various concentrations, analysis of lymphocyte viability and proliferation, determination of the percentage of the Th17-enriched population and its subpopulations, determination of the cytokine profile in the culture supernatants.

Study groups

Written informed consent was obtained from all subjects who participated in the study. Venous blood samples were obtained from healthy donors (nonpregnant women, n = 6, 25-39 years old) by venipuncture with vacuum tubes (BD Vacutainer™, Greiner-bio-one, Austria).

Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated by density gradient centrifugation (Diacoll 1077, Dia-m, Russia, = 1.077 g/cm³). The maximum time between blood sample collection and density gradient separation was 30 minutes.

Glycodelin

We used recombinant human glycodelin (PAEP) protein from *E. coli*, MBS718444, with His tag, synthesized on demand from the website <https://www.mybiosource.com/recombinant-protein/glycodelin-paep/718444>.

For the experiment, we used the concentration of glycodelin corresponding to its level in the peripheral blood of a woman during physiological pregnancy (0.2 μ g/mL – I and III trimesters; 2 μ g/mL – II trimester), as well as in a concentration of 10 μ g/mL corresponding to its concentration in the amniotic fluid (I trimester) and endometrial tissues [14, 24].

Isolation and culture of naïve CD4⁺ cells

Naïve CD4⁺ cells were obtained from PBMCs by negative immunomagnetic separation (MACS® MicroBeads and MS Columns, Miltenyi Biotec, Germany). The purity of isolated naïve T cells was confirmed by CD45R0, CD45RA and CD62L staining (CD45RA-FITC, CD45R0-PE (BioLegend,

USA) and CD62L-APC (Miltenyi Biotec, Germany) and a CytoFLEX S Flow Cytometer (Beckman Coulter, USA). The average percentage of naïve (CD45R0-CD45RA⁺CD62L⁺) cells was ~70% from single lymphocytes.

Th17 polarization

Isolated naïve CD4⁺ cells (1×10^6 cells/mL, 200 μ L) in serum-free complete medium (TexMACSTM medium (Miltenyi Biotec) supplemented with 10 mM HEPES, 2 mM L-glutamine (both from ICN Pharmaceuticals, USA) and penicillin-streptomycin-amphotericin B (BI, Israel)) were cultured in 96-well plates in a humidified CO₂ incubator at 37 °C and 5% CO₂ for 7 days without medium change.

Cultures without glycodelin served as controls. The purchased drug (initial concentration 0.83 mg/mL) contained 50% glycerol. Purification of the drug by dialysis could lead to a loss of protein, a change in the concentration of the solution, and a reduction in the storage time of the drug, which was highly undesirable. It was decided not to purify the drug from glycerol, but to perform controls for each glycodelin concentration with the corresponding glycerol concentration. The glycerol concentrations in the controls were 0.01, 0.14, and 0.73%, respectively.

The viability of the cells after 7 days of incubation, as determined by zombie aqua staining (ZA) (Invitrogen, USA), was 73.28±8.36%. Glycerol and glycodelin did not affect cell number or viability.

To polarize CD4⁺ cells into Th17 cells, we used TCR activator (T Cell Activation/Expansion Kit human, Miltenyi Biotec, Germany), IL-1 β (20 ng/mL), IL-6 (30 ng/mL), IL-23 (30 ng/mL), TGF- β (2.25 ng/mL) cytokines; anti IL-4 (2.5 μ g/mL) and anti IFN γ (1 μ g/mL) antibodies (Miltenyi Biotec, Germany) as recommended by Miltenyi Biotec.

Flow cytometry

After 7 days of culture, we determined the frequency of Th17-enriched population as a percentage of ZA-CD3⁺CD4⁺CCR6⁺ cells. To evaluate the rate of subpopulations within this population, we assessed the percentage of CCR4⁺CXCR3⁻, CCR4⁺CXCR3⁺, CCR4⁻CXCR3⁻, CCR4⁻CXCR3⁺ cells in the ZA-CD3⁺CD4⁺CCR6⁺ gate (Figure 1).

Sample preparation for surface staining was performed according to the antibody manufacturer's instructions (Miltenyi Biotec, Germany). Stained samples were analyzed by a six-color flow cytometry assay using a CytoFLEX S (Beckman Coulter, USA). The antibodies used were mouse IgG1 anti-human CXCR3-PE-Vio615 (clone REA 232), CD4-PerCP (clone VIT4), CCR4-PE-Vio 770 (clone REA279), CCR6-APC (REA190) (all Miltenyi Biotec, Germany) and CD3-Pacific BlueTM (clone UCTH1) (BioLegend, USA).

The threshold between positive and negative cells was determined using fluorescence minus one (FMO) controls. Flow cytometry data were analyzed using Kaluza Analysis 2.0 software (Beckman Coulter, USA).

Proliferation analysis

A differential gating method was used to determine the proliferation status of cells [74]. The differential gating method is based on the simple idea that cells, whether proliferating or apoptotic, change their size and granularity and thus the light scattering parameters [4, 74]. Thus, in the two-parameter light scatter plot (FSC-A / SSC-A), proliferating cells shift to the right and upward, while apoptotic cells shift to the left. The cells form fairly distinct populations that can be gated, and you can calculate what percentage of the total number of cells ends up in each gate. This method was previously described in our article [71], and in a subsequent article [72], we showed that the percentage of proliferating cells obtained by differential gating correlated with the percentage of Ki67⁺ cells.

Data were collected using a CytoFLEX S flow cytometer and analyzed using Kaluza Analysis 2.0 software (Beckman Coulter, USA).

Determination of the cytokine profile of culture supernatants

To determine the level of cytokines IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12 (p70), IL-13, IL-17, G-CSF, GM-CSF, IFN γ , MCP-1, MIP-1 α , TNF α in culture supernatants used a commercial Bio-Plex ProTM Human Cytokine Grp I Panel 17-Plex kit (BioRad, USA).

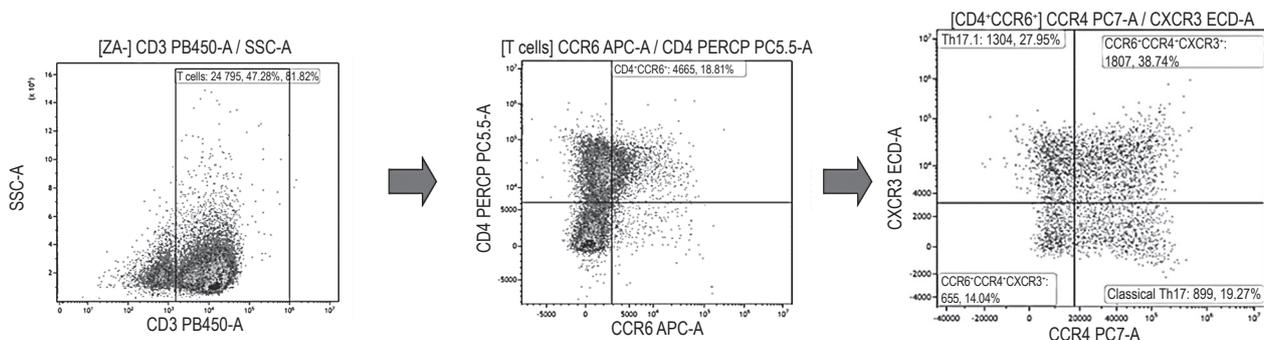


Figure 1. Example of successive gating of Th17-enriched subset and its subpopulations

The results were read on a MAGPIX multiplex analyzer (BioRad, USA) using Luminex xMAP technology using xPONENT 3.1 software. Standard curves were constructed using a five-parameter logistic (5PL) analysis method. The obtained data were processed using the Belysa™ Immunoassay Curve-Fitting Software (Merck KGaA, Germany).

The results for the cytokines IL-1β and IL-6 are not presented in the article because these cytokines were introduced into the cultures for Th17 polarization. The concentrations of IL-4 and IFNγ may also not reflect the true picture because antibodies against these cytokines were added to the cultures according to the cell polarization protocol.

Statistics

Statistical data analysis was performed with GraphPad Prism 8 using the Friedman test with Dunn's multiple comparisons test. Data are presented as medians and first and third quartiles – Me (Q_{0.25}-Q_{0.75}). Differences were considered significant at p < 0.05.

Results

The direct effect of glycodelin on viability, proliferation and apoptosis of Th17-enriched population of Th17-polarized CD4⁺ cells

Glycodelin at physiological (0.2, 2 and 10 μg/mL) concentrations [14, 24] had no effect on cell viability as determined by Zombie Aqua (ZA) staining and flow cytometry analysis. The average percentage of viable (ZA-) cells in all cultures with GD was 73.22-75.74 and was not significantly different from that in negative control cultures, which was 76.04 (65.2-80.52) (Me (Q_{0.25}-Q_{0.75})). The differential gating data are consistent with these results. There were no

differences in the number of apoptotic and dead (with reduced size and granularity) cells between control and experimental cultures (data not shown). Controls mimicking the concentration of glycerol impurity in glycodelin (0.015, 0.15, and 0.73% glycerol corresponding to 0.2, 2, and 10 μg/mL glycodelin, respectively) also showed no differences.

When the effect of glycodelin on the proliferation of CD4⁺T cells associated with their Th17 polarization was evaluated, no changes in the frequency of proliferating T helpers were detected in GdA-treated cultures according to the differential gating method. Importantly, no changes in the percentage of proliferating cells were detected in glycerol-treated controls. There is evidence that glycerol can reduce the proliferation activity and viability of cultured cells [77], but apparently the percentages included in the GD preparation that we used as additional controls were low enough for such effects to occur.

Although glycodelin did not affect the proliferation of CCR6⁺Th17-enriched T helper cells, there was a statistically significant decrease in the percentage of proliferating cells in the CCR4⁺CXCR3⁺Th17.1-enriched subpopulation in cultures with 2 μg/mL glycodelin compared with the control with glycerol (Figure 2). On the contrary, the percentage of apoptotic cells in this subpopulation increased significantly (Table 1). Thus, in our study, glycodelin at a concentration of 2 μg/mL had a selective apoptotic effect on the Th17.1-enriched subpopulation. Interestingly, the higher concentration of glycoprotein studied did not maintain this effect (Table 1).

The effect of glycodelin on percentage of IL-17-producing T helpers and their subpopulations

In 2005, IL-17 producing T helpers were separated into a distinct subpopulation and shortly thereafter

TABLE 1. PERCENTAGE OF APOPTOTIC CELLS IN DIFFERENT SUBPOPULATIONS OF CCR6⁺ T HELPERS, Me (Q_{0.25}-Q_{0.75}), n = 6

Subpopulations of CD4 ⁺ CCR6 ⁺ cells	Controls with glycerol			Glycodelin (μg/mL)		
	0.2	2	10	0.2	2	10
Th17/Th22 (CCR4 ⁺ CXCR3 ⁺)	8.458 (7.143-12.720)	10.53 (6.907-13.330)	7.717 (7.157-14.500)	9.435 (7.166-11.110)	11.04 (7.232-15.380)	10.38 (6.955-13.370)
Th17.1 (CCR4 ⁺ CXCR3 ⁺)	24.06 (9.580-31.060)	20.67 (9.458-25.380)	19.19 (10.22-24.09)	25.04 (9.482-38.460)	28.55 (12.88-38.74) p = 0.015	22.12 (8.575-35.410)
CCR4 ⁺ CXCR3 ⁻	10.20 (7.151-13.730)	9.899 (6.477-11.970)	9.839 (7.481-11.840)	9.351 (7.672-15.060)	10.23 (8.774-12.660)	8.849 (7.553-11.630)
CCR4 ⁺ CXCR3 ⁺	51.92 (35.34-60.51)	53.34 (28.25-68.76)	53.08 (33.25-68.20)	52.35 (37.16-62.41)	51.58 (45.00-69.22)	55.89 (26.24-60.37)

Note. Controls with glycerol: 0.2, 2, and 10, controls with glycerol concentrations corresponding to the indicated glycodelin concentrations. p < 0.05 value according to the Friedman test with Dunn's multiple comparison test is shown.

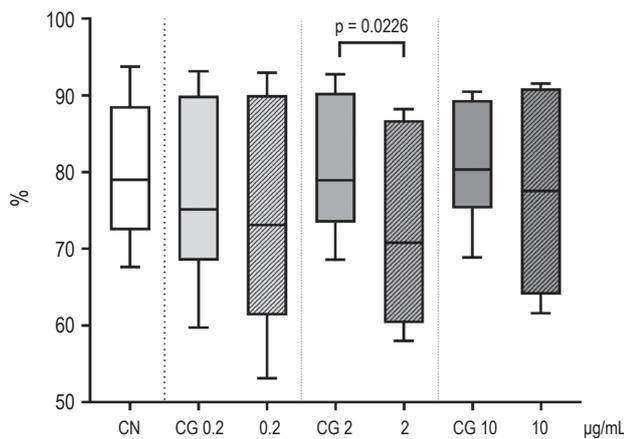


Figure 2. Percentage of proliferating cells in the CCR4+CXCR3+ gate of CD4+CCR6+ cells according to differential gating data

Note. n = 6; medians, Me ($Q_{0.25}-Q_{0.75}$), and maxima are shown. The x-axis, glycodelin concentration ($\mu\text{g/mL}$). The y-axis, percentage of live (ZA+) proliferating cells according to the differential gating method. CN (negative control), culture without GD and glycerol. CG 0.2, CG 2 and CG 10, corresponding controls with glycerol. p-values < 0.05 according to the Friedman test with Dunn's multiple comparison test are shown.

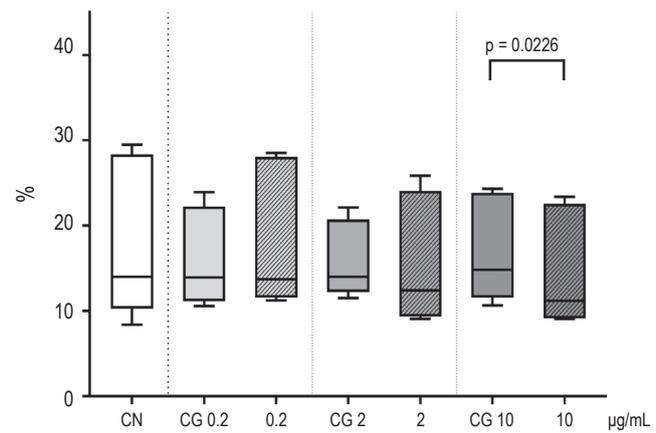


Figure 4. Effect of glycodelin on the percentage of CCR4+CXCR3+ (Th17.1) cells within the CCR6+ population of Th17-polarized CD4+ cells

Note. n = 6; Me ($Q_{0.25}-Q_{0.75}$), minima, and maxima are shown. The x-axis, glycodelin concentration ($\mu\text{g/mL}$). The y-axis, the percentage of Th17.1 from ZA $^+$ CD3 $^+$ CD4 $^+$ CCR6 $^+$ gate. CN (negative control), culture without GD and glycerol. CG 0.2, CG 2 and CG 10, corresponding controls with glycerol. p-value according to the Friedman test with Dunn's multiple comparison test is shown.

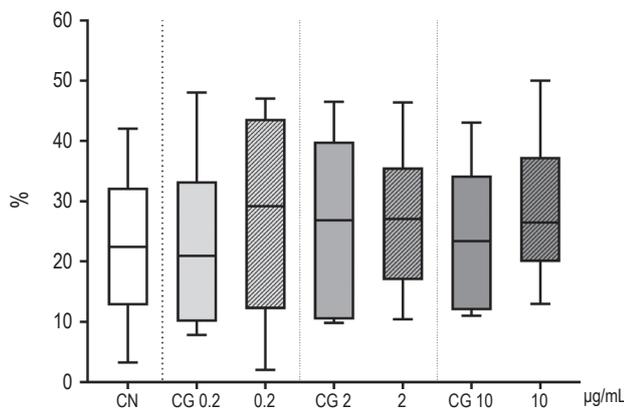


Figure 3. Percentage of CCR6+T helpers in a Th17-polarized culture with different concentrations of glycodelin

Note. n = 6; Me ($Q_{0.25}-Q_{0.75}$), minima and maxima are shown. The x-axis, glycodelin concentration ($\mu\text{g/mL}$). The y-axis, percentage of CCR6+ cells in ZA $^+$ CD3 $^+$ CD4 $^+$ gate. CN (negative control), culture without GD and glycerol. CG 0.2, CG 2 and CG 10, corresponding controls with glycerol.

were found to carry a CCR6 molecule on their surface that serves as a receptor for the chemokine CCL20 and promotes cell migration to sites of inflammation [1, 16, 47, 76]. Moreover, regulatory T cells also express CCR6 on their surface [78]. However, when these cells enter the proinflammatory milieu, they begin to express the transcription factor ROR γ t (RORC), develop a Th17-like phenotype, and

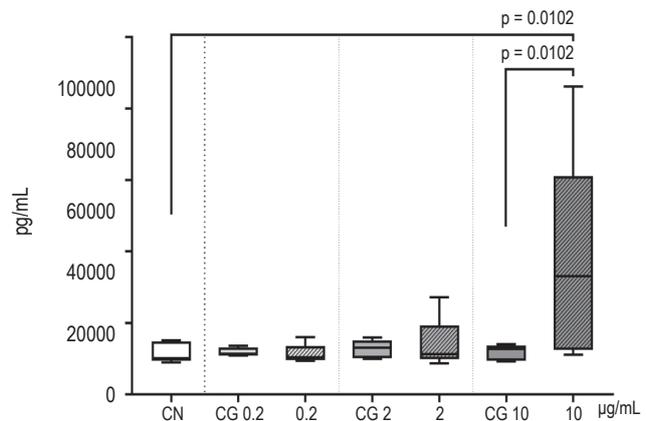


Figure 5. Effect of glycodelin on IL-2 concentration in supernatants of Th17-polarized T helper cultures

Note. n = 6; Me ($Q_{0.25}-Q_{0.75}$), minima, and maxima are shown. The x-axis, glycodelin concentration ($\mu\text{g/mL}$). The y-axis, IL-2 concentration (pg/mL). CN (negative control), culture without glycerol and glycodelin. CG 0.2, CG 2 and CG 10, corresponding controls with glycerol. p-values according to the Friedman test with Dunn's Multiple Comparison Test are shown.

produce IL-17 [11, 13, 28, 29]. Since the link between the ability to produce IL-17 and the expression of CCR6 in human T cells has been established, this marker could indicate the pro-inflammatory function of all T helpers *in situ* [2, 64].

In a heterogeneous population of CCR6+T helpers, subpopulations can be distinguished based on

the expression of the chemokine receptors CCR4 and CXCR3 [57].

CCR6⁺CCR4⁺CXCR3⁻ (Th17/Th22) cells produce high levels of IL-17A and little IFN γ , express RORC, and produce IL-22. CCR6⁺CCR4⁺CXCR3⁺ (double-positive) cells produce both IL-17A and IFN γ . CCR6⁺CCR4⁻CXCR3⁺ (Th17.1) cells produce high levels of IFN γ and low levels of IL-17A. Th17.1 (CCR6⁺CCR4⁻CXCR3⁺) cells have been reported to be present both in peripheral blood and at sites of inflammation in autoimmune diseases such as rheumatoid arthritis, multiple sclerosis, and inflammatory bowel disease [7, 44, 54]. There is also a subpopulation within CCR6⁺Th cells that do not express CCR4 or CXCR3 receptors (double-negative cells) [48]. The double-positive and double-negative (CCR4⁺CXCR3 and CCR4⁻CXCR3⁻) cells within the CCR6⁺ subset are thought to be Th17 progenitor cells or Th17 in a transitional stage [6].

We evaluated the effect of glycodelin on Th17 polarization of T helper cells by determining the percentage of CD4⁺CCR6⁺ cells in the total CD3⁺ population. We also determined the percentage of CCR6-expressing cell subpopulations based on their CCR4 and CXCR3 surface molecule expression.

No effect of GD on the number of CD4⁺ CCR6⁺T lymphocytes was detected at any of the concentrations studied (Figure 3). The proportion of CD3⁺CD4⁺ cells, CD3⁺CD4⁺CCR4⁺ cells, and CD3⁺CD4⁺CXCR3⁺ cells was also not altered (data not shown).

However, a significant ($p = 0.0226$) decrease in the percentage of CCR6⁺CXCR3⁺CCR4⁻ (Th17.1-enriched) subpopulation was observed in the culture with 10 $\mu\text{g/mL}$ of GD compared with the control with glycerol (Figure 4). The same concentration of glycodelin resulted in a significant increase in the proportion of double-positive CXCR3⁺CCR4⁺ cells, but only compared with the negative control (data not shown).

As for the Th17/Th22-enriched CCR4⁺CXCR3⁻ and DN CCR4⁻CXCR3⁻ subpopulations of CCR6⁺T helpers, their abundance was not affected by the addition of GD to CD4⁺ cell cultures.

The influence of glycodelin on cytokine and chemokine production of Th17-polarized T helpers

The concentrations of cytokines, chemokines, and colony-stimulating factors in Th17-polarized T helper culture supernatants with glycodelin are shown in Table 2. The polarization scheme we used resulted in enrichment in culture supernatants of mainly IL-2, IL-17, TNF α , MIP-1b, and IL-8 (data not shown). The effect of glycodelin on cytokine production was manifested only in a statistically significant increase in the concentration of IL-2 in the culture with 10 $\mu\text{g/mL}$ glycodelin compared with the corresponding control (Table 2, Figure 5).

Discussion

The suppressive effect of native glycodelin on proliferation has been demonstrated previously [50, 53]. In 2001, direct antiproliferative and apoptotic effects of glycodelin from amniotic fluid and *Pichia pastoris* on PBMC and T lymphocyte cell lines Jurkat и MOLT-4 were demonstrated. Moreover, glycodelin had an apoptotic effect mainly on activated T lymphocytes [42].

Later, it was shown that the presence of sialic acids in the structure of oligosaccharides and the size of glycans, as well as the availability of the protein backbone of the molecule are responsible for the apoptotic activity of glycodelin [21, 22, 25, 41]. In addition, the apoptotic effect of glycodelin A is thought to be related to its lectin activity and mediated by the CD7 galectin-1 receptor [68].

However, there is evidence that recombinant glycodelin from *E. coli* does not bind to T cells and has no apoptotic effect on T lymphocytes, likely due to an incorrect conformation of the molecule [25, 37].

In our study, this recombinant glycodelin had no pronounced apoptotic and antiproliferative effect on the total population of T lymphocytes (data not shown) and on their CCR6⁺ subpopulation. However, a weak apoptotic effect was observed on Th17.1, a similar subpopulation of these cells. In 2011, Lee and colleagues showed that glycodelin induces death only in Th1 cells by binding to Th1 and Th2 [33]. Thus, we see that the effect of glycodelin on different subpopulations of T cells can be differentiated. Probably, the tertiary structure of glycodelin from *E. coli* does not correspond to that of the native protein, but we cannot exclude the possibility that the binding sites that determine its apoptotic activity are partially conserved.

There are data that Th17.1 enriched and DP subpopulations of CCR6⁺ cells produce more IFN γ and express a higher proportion of the transcription factor TBX1 than Th17/Th22 enriched and DN subpopulations [7]. While there is some evidence for a negative role of the Th17.1 subpopulation in the development of autoimmune diseases, reducing the number of these cells could potentially be beneficial [15, 31].

Previously, under the influence of native glycodelin, the effect of reducing the expression of the chemokine receptor CXCR3, which is expressed in Th1, but not CXCR4, which is typical of Th2, was shown. It has also been shown that the selective effect of glycodelin abolishes the suppression of Th2 transcription factor GATA3 expression [38]. In our study, the recombinant variant of glycodelin did not affect the expression of CCR6, CCR4, CXCR3, CXCR4 by T cells in general, but in partial agreement with the above data, it decreased the expression of CXCR3 in the CCR6⁺CCR4⁻ cell population.

TABLE 2. GD EFFECT ON CYTOKINE/CHEMOKINE PROFILE OF Th17-POLARIZED CD4⁺ CELL CULTURE SUPERNATANTS, Me (Q_{0.25}-Q_{0.75}), n = 6

Cytokine (pg/mL)		Controls with glycerol			Glycodelin (µg/mL)		
		0.2	2	10	0.2	2	10
Regulatory	IL-2	11255 (11204-12702)	13046 (10337-14406)	12766 (9614.7-13326.0)	10385 (9643.8-11080.0)	11272 (11131-11501)	33115 (13859-36098) p = 0.03
	IL-7	263.33 (260.00-268.57)	258.03 (212.59-278.84)	268.57 (187.27-268.57)	247.19 (224.51-247.19)	247.19 (241.66-258.03)	268.57 (247.19-273.74)
	IL-12p70	95.00 (84.01-105.15)	100.10 (97.53-119.55)	89.55 (86.81-110.07)	94.91 (92.25-112.48)	102.65 (84.01-110.07)	102.65 (92.25-102.65)
Colony-stimulating	G-CSF	300.00 (285.38-322.48)	297.32 (282.38-372.68)	299.93 (246.05-329.83)	416.38 (389.26-593.26)	466.46 (410.69-533.63)	364.78 (258.24-510.37)
	GM-CSF	2268.30 (2058.6-2273.4)	1725.56 (1603.2-2273.8)	2101.72 (1656.0-2571.9)	2356.94 (1977.7-2966.5)	2078.65 (1610.1-2536.6)	1567.45 (1456.1-1616.9)
	IL-5	1612.5 (1585.5-1678.1)	1558.3 (1551.0-1646.3)	1560.1 (1556.5-1617.9)	1614.3 (1589.1-1621.4)	1589.1 (1460.0-1664.0)	1499.3 (1495.6-1583.7)
Proinflammatory	IFN _γ	890.20 (518.25-1151.80)	923.88 (505.18-936.50)	860.67 (500.81-925.98)	953.30 (604.90-1003.60)	775.99 (524.78-902.84)	660.79 (587.63-890.20)
	IL-17	2500.0 (2326.5-2981.7)	3229.6 (1767.6-4016.3)	2068.5 (1508.9-2706.9)	2935.64 (1948.5-3654.7)	2716.45 (1703.9-4018.9)	2905.13 (2029.2-3667.9)
	TNF _α	172678 (164210-248920)	208941 (140581-253531)	197352 (176613-234335)	195926 (184072-247644)	213213 (212575-239306)	243328 (213239-248172)
Anti-inflammatory	IL-4	120.00 (116.65-124.64)	123.81 (123.57-124.88)	123.23 (118.87-129.59)	121.49 (117.77-128.46)	120.90 (116.48-128.55)	120.73 (120.23-124.56)
	IL-10	180.00 (133.23-220.92)	186.27 (120.32-244.58)	189.32 (108.84-190.08)	228.35 (93.80-283.85)	177.09 (102.20-247.52)	149.11 (128.41-312.51)
	IL-13	5353.3 (4500.0-16836.0)	7157.9 (4023.3-16823.0)	4103.7 (3573.1-9351.1)	6977.7 (6033.4-7183.6)	7500.0 (6314.9-8648.8)	4890.8 (4171.2-6172.2)
Chemokines	MCP-1	536.13 (414.41-556.08)	541.00 (317.47-585.81)	546.29 (409.52-591.78)	483.54 (414.65-544.94)	460.59 (436.77-545.47)	602.59 (392.83-615.72)
	MIP-1 _β	29194 (22657-32102)	29825 (28441-31651)	28194 (27632-33352)	30388 (27769-31909)	31001 (25242-31564)	27265 (24643-29731)
	IL-8 (CXCL8)	46993 (40000-50724)	50122 (43563-50801)	51563 (44962-54544)	51303 (49107-55412)	58329 (51019-59923)	59368 (58199-65101)

Note. As for Table 1.

Our data contradict previous studies on GD describing the inhibitory effect of this protein on IL-2 production. In particular, it has been shown that in CD4⁺T lymphocytes, deprivation of the growth factor IL-2 leads to inhibition of proliferation, a decrease in Bcl-2 expression, or an increase in Bax, resulting in mitochondrial stress and cell death [65].

IL-2, a potent growth factor for lymphocytes, has long been considered only to enhance the functions of these cells. Blocking antibodies against IL-2R have been used to suppress graft rejection [40]. However, later studies have shown the important role of IL-2 in the development, expansion and functioning of regulatory T cells responsible for suppressing the body's autoimmune reactions [43]. Thanks to these studies, a different approach to the therapy of GVHD and autoimmune diseases has been formed, based not on blocking the production of IL-2 or signal transduction pathways from receptors to this cytokine, but, on the contrary, on therapy with low doses of IL-2 [69]. Thus, an increase in IL-2 under the effect of a high concentration of recombinant glycodelin may favor the formation/expansion of Tregs, which is a favorable factor from the standpoint of transplantation immunity. However, this effect of glycodelin needs further investigation because of the discrepancy between our data and the studies of other teams.

The effects of glycodelin on T cells are not limited to its apoptotic activity. This protein has a pleiotropic effect on various subpopulations of T cells [33, 38]. The recombinant GD, which is derived from the Human Embryonic Kidney 293 (HEK 293) cell line and has a similar structure to amniotic glycodelin, increased the number of myelin-specific Tregs and their expression of the transcription factor FoxP3, while suppressing effector T cell differentiation *in vitro*. It also doubled the number of CD25^{high}GITR^{high}FoxP3⁺T cells [45]. Studies on the immunosuppressive effects of glycodelin have shown that it can suppress T cell receptor signaling [51, 52]. GdA also suppresses the surface expression of CD25 (IL-2R α) and consequently the production of IL-2, which together with the decreased expression of eomesodermin (Eomes) contributes to the attenuation of CTL cytolytic activity [65].

The only molecular target identified for GdA on T cells is CD45 tyrosine phosphatase [51]. Glycodelin-A binds to the CD45 receptor on T lymphocytes and inhibits Th1 cytokine secretion and T cell differentiation [20, 38, 51]. It is suggested that the mechanism of its action may not be related to the oligosaccharides on the surface of the molecule [22, 25, 41].

Summing up, we studied for the first time the direct effect of recombinant *E. coli*-derived glycodelin on the Th17-enriched lymphocyte subpopulation. We found a selective apoptotic effect of glycodelin

at a concentration of 2 μ g/mL on the Th17.1 cell subpopulation. Interestingly, when glycodelin was added to the culture at a concentration of 10 μ g/mL, a decrease in the percentage of the same cell subpopulation was observed in the culture of Th17-polarized naïve T lymphocytes. However, no effects of this molecule were observed on the percentage of the total CCR6⁺ subpopulation of T helpers, on their apoptosis, and on the production of IL-17 by these cells.

Previous studies have not demonstrated binding of the recombinant form of *E. coli*-derived glycodelin to T cells or its apoptotic effect [25, 37, 47]. As mentioned above, the protein backbone of the glycodelin molecule is involved in the implementation of its immunosuppressive effects [22, 25]. Therefore, the reason for the absence of pronounced effects might be not so much the absence of glycosylation as defective disulfide bonds leading to altered folding of the protein molecule [27]. The fact that some effects are nevertheless present could be due to the fact that the structure of the native molecule is partially preserved by recombinant glycodelin, allowing it to interact with T cells. In our opinion, there is also the possibility that the observed effects are mediated by residual monocytes present in the T helper culture, because it has been shown that a similar glycodelin can bind to human monocytes via a specific receptor [32, 37].

This indirectly confirms the fact that we observed a significant decrease in IL-17 and abrogation of an increase in concentrations of other proinflammatory cytokines in the blood serum of glycodelin-injected rats in the rat model of local allograft transplantation [3]. There are also promising studies on the use of soluble mutant recombinant glycodelin in the allograft nude mouse model [9, 60]. Glycodelin has been shown to reduce the number of activated CD4⁺ and CD8⁺ cells and suppress the expression of granzyme-B, EOMES, IL-2 and pro-inflammatory cytokines [9]. As we can see, a protein thought to be unique to primates also has immunosuppressive effects in rats, supporting the suggestion by Keil and colleagues that glycodelin is a highly conserved glycoprotein in mammals [26]. Thus, the great prospects for the use of glycodelin as a biopharmaceutical cannot be dismissed. Work should continue to clarify the dependence of the immunosuppressive properties of this molecule on its structural features.

Conclusion

Recombinant glycodelin at concentrations equivalent to those during pregnancy (2, 0.2, and 10 μ g/mL) did not alter the frequency of CD4⁺CCR6⁺ cells, IL-17 and other cytokines/chemokines studied that are produced by Th17-polarized helper T cells. However, glycodelin at a concentration of 2 μ g/mL

increased the proportion of apoptotic Th17.1 cells and 10 µg/mL decreased the proportion of Th17.1 cells (CCR6⁺CCR4⁺CXCR3⁺) and increased IL-2 production in CD4⁺Th17-polarized cell cultures. The Th17.1 subpopulation is considered to be one of those involved in pathological processes in

autoimmune diseases and in complications of pregnancy. Thus, this effect of glycodeclin could be of interest from a biopharmaceutical point of view, but the mechanism of the demonstrated selective action of this pregnancy protein requires further investigation.

References

1. Acosta-Rodriguez E.V., Rivino L., Geginat J., Jarrossay D., Gattorno M., Lanzavecchia A., Sallusto F., Napolitani G. Surface phenotype and antigenic specificity of human interleukin 17-producing T helper memory cells. *Nat. Immunol.*, 2007, Vol. 8, pp. 639-646.
2. Annunziato F., Cosmi L., Santarlasci V., Maggi L., Liotta F., Mazzinghi B., Parente E., Fili L., Ferri S., Frosali F., Giudici F., Romagnani P., Parronchi P., Tonelli F., Maggi E., Romagnani S. Phenotypic and functional features of human Th17 cells. *J. Exp. Med.*, 2007, Vol. 204, pp. 1849-1861.
3. Bochkova M.S., Timganova V.P., Shardina K.Yu., Uzhviyuk S.V., Loginova N.P., Troinich Ya.N., Zamorina S.A. Effect of glycodeclin on the cytokine profile of rats with allogeneic transplantation of bone marrow cells. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 2022, Vol. 173, no. 5, pp. 2-6. (In Russ.)
4. Böhmer R.M., Bandala-Sanchez E., Harrison L.C. Forward light scatter is a simple measure of T-cell activation and proliferation but is not universally suited for doublet discrimination. *Cytometry*, 2011, Vol. 79A, pp. 646-652.
5. Bolton A.E., Pockley A.G., Clough K.J., Mowles E.A., Stoker R.J., Westwood O.M., Chapman M.G. Identification of placental protein 14 as an immunosuppressive factor in human reproduction. *Lancet*, 1987, Vol. 329, pp. 593-595.
6. Carboni S., Gehrmann U., Preite S., Mitra S. Cytokine-regulated Th17 plasticity in human health and diseases. *Immunology*, 2021, Vol. 163, pp. 3-18.
7. Dankers W., den Braanker H., Paulissen S.M.J., van Hamburg J.P., Davelaar N., Colin E.M., Lubberts E. The heterogeneous human memory CCR6⁺ T helper-17 populations differ in T-bet and cytokine expression but all activate synovial fibroblasts in an IFNγ-independent manner. *Arthritis Res. Ther.*, 2021, Vol. 23, 157. doi: 10.1186/s13075-021-02532-9.
8. de Luca A. IL-22 defines a novel immune pathway of antifungal resistance. *Mucosal. Immunol.*, 2010, Vol. 3, pp. 361-373.
9. Dixit A., Balakrishnan B., Karande A.A. Immunomodulatory activity of glycodeclin: implications in allograft rejection. *Clin. Exp. Immunol.*, 2018, Vol. 192, pp. 213-223.
10. Dong M., Ding G., Zhou J., Wang H., Zhao Y., Huang H. The effect of trophoblasts on T lymphocytes: possible regulatory effector molecules-a proteomic analysis. *Cell Physiol. Biochem.*, 2008, Vol. 21, pp. 463-472.
11. Duhon T., Duhon R., Lanzavecchia A., Sallusto F., Campbell D.J. Functionally distinct subsets of human FOXP3⁺ Treg cells that phenotypically mirror effector Th cells. *Blood*, 2012, Vol. 119, pp. 4430-4440.
12. Flower D.R. The lipocalin protein family: structure and function. *Biochem. J.*, 1996, Vol. 318, pp. 1-14.
13. Halim L., Romano M., McGregor R., Correa I., Pavlidis P., Grageda N., Hoong S.J., Yuksel M., Jassem W., Hannen R.F., Ong M., Mckinney O., Hayee B., Karagiannis S.N., Powell N., Lechler R.I., Nova-Lamperti E., Lombardi G. An atlas of human regulatory T helper-like cells reveals features of Th2-like Tregs that support a tumorigenic environment. *Cell. Rep.*, 2017, Vol. 20, pp. 757-770.
14. Halttunen M., Kämäräinen M., Koistinen H. Glycodeclin: a reproduction-related lipocalin. *Biochim. Biophys. Acta.*, 2000, Vol. 1482, pp. 149-156.
15. Harbour S.N., Maynard C.L., Zindl C.L., Schoeb T.R., Weaver C.T. Th17 cells give rise to Th1 cells that are required for the pathogenesis of colitis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2015, Vol. 112, pp. 7061-7066.
16. Harrington L.E., Hatton R.D., Mangan P.R., Turner H., Murphy T.L., Murphy K.M., Weaver C.T. Interleukin 17-producing CD4⁺ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat. Immunol.*, 2005, Vol. 6, pp. 1123-1132.
17. Harris S.J., Anthony F.W., Jones D.B., Masson G.M. Pregnancy-specific-beta 1-glycoprotein: effect on lymphocyte proliferation *in vitro*. *J. Reprod. Immunol.*, 1984, Vol. 6, pp. 267-270.
18. Heidt S., Segundo D.S., Chadha R., Wood K.J. The impact of Th17 cells on transplant rejection and the induction of tolerance. *Curr. Opin. Organ Transplant.*, 2010, Vol. 15, pp. 456-461.
19. Hoe E., Anderson J., Nathanielsz J., Toh Z.Q., Marimla R., Balloch A., Licciardi P.V. The contrasting roles of Th17 immunity in human health and disease. *Microbiol. Immunol.*, 2017, Vol. 61, pp. 49-56.
20. Ish-Shalom E., Gargir A., Andre S., Borovsky Z., Ochanuna Z., Gabius H.J., Tykocinski M.L., Rachmilewitz J. α2,6-Sialylation promotes binding of placental protein 14 via its Ca²⁺-dependent lectin activity: insights into differential effects on CD45RO and CD45RA T cells. *Glycobiology*, 2006, Vol. 16, pp. 173-183.

21. Jayachandran R., Radcliffe C.M., Royle L., Harvey D.J., Dwek R.A., Rudd P.M., Karande A.A. Oligosaccharides modulate the apoptotic activity of glycodelin. *Glycobiology*, 2006, Vol. 16, pp. 1052-1063.
22. Jayachandran R., Shaila M.S., Karande A.A. Analysis of the role of oligosaccharides in the apoptotic activity of glycodelin. *J. Biol. Chem.*, 2004, Vol. 279, pp. 858-8591.
23. Jones K.L., Croen L.A., Yoshida C.K., Heuer L., Hansen R., Zerbo O., DeLorenze G.N., Kharrazi M., Yolken R., Ashwood P., van de Water J. Autism with intellectual disability is associated with increased levels of maternal cytokines and chemokines during gestation. *Mol. Psychiatry*, 2017, Vol. 22, pp. 273-279.
24. Julkunen M., Rutanen E.M., Koskimies A., Ranta T., Bohn H., Seppala M. Distribution of placental protein 14 in tissues and body fluids during pregnancy. *BJOG*, 1985, Vol. 92, pp. 1145-1151.
25. Karande A.A., Mukhopadhyay D., Jayachandran R., Sundarraj S., Alok A. Mechanism of the immunomodulatory activity of glycodelin. *Indian J. Physiol. Pharmacol.*, 2005, Vol. 49, pp. 271-283.
26. Keil C., Husen B., Giebel J., Rune G., Walther R. Glycodelin mRNA is expressed in the genital tract of male and female rats (*Rattus norvegicus*). *J. Mol. Endocrinol.*, 1999, Vol. 23, pp. 57-66.
27. Kesik-Brodacka M. Progress in biopharmaceutical development. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 2018, Vol. 65, pp. 306-322.
28. Kim B.S., Lu H., Ichiyama K., Chen X., Zhang Y.B., Mistry N.A., Tanaka K., Lee Y.H., Nurieva R., Zhang L., Yang X., Chung Y., Jin W., Chang S.H., Dong C. Generation of ROR γ t⁺ Antigen-Specific T Regulatory 17 Cells from Foxp3⁺ Precursors in Autoimmunity. *Cell. Rep.*, 2017, Vol. 21, pp. 195-207.
29. Koenen H.J.P.M., Smeets R.L., Vink P.M., van Rijssen E., Boots A.M.H., Joosten I. Human CD25^{high}Foxp3^{pos} regulatory T cells differentiate into IL-17-producing cells. *Blood*, 2008, Vol. 112, pp. 2340-2352.
30. Kolls J.K., Khader S.A. The role of Th17 cytokines in primary mucosal immunity. *Cytokine Growth Factor Rev.*, 2010, Vol. 21, pp. 443-448.
31. Kotake S., Nanke Y., Yago T., Kawamoto M., Kobashigawa T., Yamanaka H. 2016. Elevated Ratio of Th17 Cell-Derived Th1 Cells (CD161(+)Th1 Cells) to CD161(+)Th17 Cells in Peripheral Blood of Early-Onset Rheumatoid Arthritis Patients. *Biomed. Res. Int.*, 2016, Vol. 2016, 4186027. doi: 10.1155/2016/4186027.
32. Lee C.L., Lam E.Y., Lam K.K., Koistinen H., Seppälä M., Ng E.H., Yeung W.S., Chiu P.C. Glycodelin-A stimulates interleukin-6 secretion by human monocytes and macrophages through L-selectin and the extracellular signal-regulated kinase pathway. *J. Biol. Chem.*, 2012, Vol. 287, pp. 36999-37009.
33. Lee C.L., Chiu P.C.N., Lam K.K.W., Siu S.O., Chu I.K., Koistinen R., Koistinen H., Seppälä M., Lee K.F., Yeung W.S.B. Differential actions of glycodelin-A on Th-1 and Th-2 cells: a paracrine mechanism that could produce the Th-2 dominant environment during pregnancy. *Hum. Reprod.*, 2011, Vol. 26, pp. 517-526.
34. Lee C. L., Lam K.K.W., Vijayan M., Koistinen H., Seppala M., Ng E.H.Y., Yeung W.S.B., Chiu P.C.N. The pleiotropic effect of glycodelin-A in early pregnancy. *Am. J. Reprod. Immunol.*, 2016, Vol. 75, pp. 290-297.
35. Lu Y.J., Gross J., Bogaert D., Finn A., Bagrade L., Zhang Q., Kolls J.K., Srivastava A., Lundgren A., Forte S., Thompson C.M., Harney K.F., Anderson P.W., Lipsitch M., Malley R. Interleukin-17A mediates acquired immunity to pneumococcal colonization. *PLoS Pathog.*, 2008, Vol. 4, e1000159. doi: 10.1371/journal.ppat.1000159.
36. Marques J.M., Rial A., Munoz N., Pellay F.X., Van Maele L., Leger H., Camou T., Sirard J.C., Benecke A., Chabalgoity J.A. Protection against Streptococcus pneumoniae serotype 1 acute infection shows a signature of Th17- and IFN-gamma mediated immunity. *Immunobiology*, 2012, Vol. 217, pp. 420-429.
37. Miller R.E., Fayen J.D., Chakraborty S., Weber M.C., Tykocinski M.L. A receptor for the lipocalin placental protein 14 on human monocytes. *FEBS Lett.*, 1998, Vol. 436, pp. 455-460.
38. Mishan-Eisenberg G., Borovsky Z., Weber M.C., Gazit R., Tykocinski M.L., Rachmilewitz J. Differential regulation of Th1/Th2 cytokine responses by placental protein 14. *J. Immunol.*, 2004, Vol. 173, pp. 5524-5530.
39. Moldogazieva N.T., Mokhosoev I.M., Terentiev A.A. Pregnancy-Specific b1-Glycoproteins: combined biomarker roles, structure/function relationships and implications for drug design. *Curr. Med. Chem.*, 2017, Vol. 24, pp. 245-267.
40. Morris J.C., Waldmann T.A. Advances in interleukin 2 receptor targeted treatment. *Ann. Rheum. Dis.*, 2000, Vol. 59, pp. i109-i114.
41. Mukhopadhyay D., SundarRaj S., Alok A., Karande A.A. Glycodelin A, not glycodelin S, is apoptotically active. Relevance of sialic acid modification. *J. Biol. Chem.*, 2004, Vol. 279, pp. 8577-8584.
42. Mukhopadhyay D., Sundereshan S., Rao C., Karande A.A. Placental protein 14 induces apoptosis in T cells but not in monocytes. *J. Biol. Chem.*, 2001, Vol. 276, pp. 28268-28273.
43. Nelson B.H. IL-2, Regulatory T cells, and tolerance. *J. Immunol.*, 2004, Vol. 172, no. 7, pp. 3983-3988.
44. Nistala K., Adams S., Cambrook H., Ursu S., Olivito B., de Jager W., Evans J.G., Cimaz R., Bajaj-Elliott M., Wedderburn L.R. Th17 plasticity in human autoimmune arthritis is driven by the inflammatory environment. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 2010, Vol. 107, pp. 14751-14756.
45. Ochanuna Z., Geiger-Maor A., Dembinsky-Vaknin A., Karussis D., Tykocinski M.L., Rachmilewitz J. Inhibition of effector function but not T cell activation and increase in FoxP3 expression in T cells differentiated in the presence of PP14. *PLoS One*, 2010, Vol. 5, e12868. doi: 10.1371/journal.pone.0012868.
46. Pan H.F., Leng R.X., Zhang N., Tao J.H., Ye D.Q. Role and therapeutic potential of Glycodelin A in systemic lupus erythematosus. *Rheumatol. Int.*, 2011, Vol. 31, pp. 563-565.

47. Park H., Li Z., Yang X.O., Chang S.H., Nurieva R., Wang Y.H., Wang Y., Hood L., Zhu Z., Tian Q., Dong C. A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nat. Immunol.*, 2005, Vol. 6, pp. 1133-1141.
48. Paulissen S.M., van Hamburg J.P., Dankers W., Lubberts E. The role and modulation of CCR6⁺ Th17 cell populations in rheumatoid arthritis. *Cytokine*, 2015, Vol. 74, pp. 43-53.
49. Piccinni M.P., Maggi E., Romagnani S. Role of hormone-controlled T-cell cytokines in the maintenance of pregnancy. *Biochem. Soc. Trans.*, 2000, Vol. 28, pp. 212-215.
50. Pockley A.G., Bolton A.E. The effect of human placental protein 14 (PP14) on the production of interleukin-1 from mitogenically stimulated mononuclear cell cultures. *Immunology*, 1990, Vol. 69, pp. 277-281.
51. Rachmilewitz J., Borovsky Z., Riely G.J., Miller R., Tykocinski M.L. Negative regulation of T cell activation by placental protein 14 is mediated by the tyrosine phosphatase receptor CD45. *J. Biol. Chem.*, 2003, Vol. 278, pp. 14059-14065.
52. Rachmilewitz J., Riely G.J., Huang J.H., Chen A., Tykocinski M.L. A rheostatic mechanism for T cell inhibition based on elevation of activation thresholds. *Blood*, 2001, Vol. 98, pp. 3727-3732.
53. Rachmilewitz J., Riely G.J., Tykocinski M.L. Placental protein 14 functions as a direct T cell inhibitor. *Cell. Immunol.*, 1999, Vol. 191, pp. 26-33.
54. Ramstein J., Broos C.E., Simpson L.J., Ansel K.M., Sun S.A., Ho M.E., Woodruff P.G., Bhakta N.R., Christian L., Nguyen C.P., Antalek B.J., Benn B.S., Hendriks R.W., van den Blink B., Kool M., Koth L.L. IFN-gamma-producing T-helper 17.1 cells are increased in sarcoidosis and are more prevalent than T-helper type 1 cells. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 2016, Vol. 193, pp. 1281-1291.
55. Renaude E., Kroemer M., Loyon R., Binda D., Borg C., Guittaut M., Hervouet E., Peixoto P. The Fate of Th17 Cells is Shaped by Epigenetic Modifications and Remodeled by the Tumor Microenvironment. *Int. J. Mol. Sci.*, 2020, Vol. 21, 1673. doi: 10.3390/ijms21051673
56. Riquelme P., Haarer J., Kammler A., Walter L., Tomiuk S., Ahrens N., Wege A.K., Goetze I., Zecher D., Banas B., Spang R., Fandrich F., Lutz M.B., Sawitzki B., Schlitt H.J., Ochando J., Geissler E.K., Hutchinson J.A. TIGIT⁺ iTregs elicited by human regulatory macrophages control T cell immunity. *Nat. Commun.*, 2018, Vol. 9, 2858. doi: 10.1038/s41467-018-05167-8.
57. Rivino L., Messi M., Jarrossay D., Lanzavecchia A., Sallusto F., Geginat J. Chemokine receptor expression identifies Pre-T helper (Th)1, Pre-Th2, and nonpolarized cells among human CD4⁺ central memory T cells. *J. Exp. Med.*, 2004, Vol. 200, pp. 725-735.
58. Saito S., Nakashima A., Shima T., Ito M. Th1/Th2/Th17 and regulatory T cell paradigm in pregnancy. *Am. J. Reprod. Immunol.*, 2010, Vol. 63, pp. 601-610.
59. Sandquist I., Kolls J. Update on regulation and effector functions of Th17 cells. *F1000Res.*, 2018, Vol. 7, 205. doi: 10.12688/f1000research.13020.1.
60. Schiefner A., Rodewald F., Neumaier I., Skerra A. The dimeric crystal structure of the human fertility lipocalin glycodelin reveals a protein scaffold for the presentation of complex glycans. *Biochem. J.*, 2015, Vol. 466, pp. 95-104.
61. Seppälä M., Koistinen H., Koistinen R., Chiu P.C., Yeung W.S.B. Glycosylation related actions of glycodelin: gamete, cumulus cell, immune cell and clinical associations. *Hum. Reprod. Update*, 2007, Vol. 13, pp. 275-287.
62. Seppälä M., Koistinen H., Koistinen R., Chiu P.C.N., Yeung W.S.B. Glycodelin: A Lipocalin with Diverse Glycoform-Dependent Actions. In: Madame Curie Bioscience Database [Internet]. Austin (TX): Landes Bioscience; 2000-2013.
63. Seppälä M., Taylor R.N., Koistinen H., Koistinen R., Milgrom E. Glycodelin: a major lipocalin protein of the reproductive axis with diverse actions in cell recognition and differentiation. *Endocr. Rev.*, 2002, Vol. 23, pp. 401-430.
64. Singh S.P., Zhang H.H., Foley J.F., Hedrick M.N., Farber J.M. Human T cells that are able to produce IL-17 express the chemokine receptor CCR6. *J. Immunol.*, 2008, Vol. 180, pp. 214-221.
65. Soni C., Karande A.A. Glycodelin-A interferes with IL-2 / IL-2R signalling to induce cell growth arrest, loss of effector functions and apoptosis in T lymphocytes. *Hum. Reprod.*, 2012, Vol. 27, pp. 1005-1015.
66. Stadhouders R., Lubberts E., Hendriks R.W. A cellular and molecular view of T helper 17 cell plasticity in autoimmunity. *J. Autoimmun.*, 2018, Vol. 87, pp. 1-15.
67. Stockinger B., Omenetti S. The dichotomous nature of T helper 17 cells. *Nat. Rev. Immunol.*, 2017, Vol. 7, pp. 535-544.
68. SundarRaj S, Soni C, Karande AA. Glycodelin A triggers T cell apoptosis through a novel calcium-independent galactose-binding lectin activity. *Mol. Immunol.*, 2009, Vol. 46, pp. 3411-3419.
69. Tahvildari M., Dana R. Low-Dose IL-2 Therapy in transplantation, autoimmunity, and inflammatory diseases. *J. Immunol.*, 2019, Vol. 203, pp. 2749-2755.
70. Tesmer L.A., Lundy S.K., Sarkar S., Fox D.A. Th17 cells in human disease. *Immunol. Rev.*, 2008, Vol. 223, pp. 87-113.
71. Timganova V., Bochkova M., Khramtsov P., Kochurova S., Rayev M., Zamorina S. Effects of pregnancy-specific β -1-glycoprotein on the helper T-cell response. *Arch. Biol. Sci.*, 2019, Vol. 71, pp. 369-378.
72. Timganova V.P., Zamorina S.A., Litvinova L.S., Todosenko N.M., Bochkova M.S., Khramtsov P.V., Rayev M.B. The effects of human pregnancy-specific β 1-glycoprotein preparation on Th17 polarization of CD4⁺ cells and their cytokine profile. *BMC Immunol.*, 2020, Vol. 21, 56. doi: 10.1186/s12865-020-00385-6.

73. van Langelaar J., van der Vuurst de Vries R.M., Janssen M., Wierenga-Wolf A.F., Spilt I.M., Siepmann T.A., Dankers W., Verjans G.M.G.M., de Vries H.E., Lubberts E., Hintzen R.Q., van Luijn M.M. T helper 17.1 cells associate with multiple sclerosis disease activity: perspectives for early intervention. *Brain*, 2018, Vol. 141, pp. 1334-1349.
74. Vesela R., Dolezalova L., Pytlik R., Rychtrmocova H., Mareckova H., Trneny M. The evaluation of survival and proliferation of lymphocytes in autologous mixed leukocyte reaction with dendritic cells. The comparison of incorporation of 3H-thymidine and differential gating method. *Cell. Immunol.*, 2011, Vol. 271, pp. 78-84.
75. Voo K. S., Wang Y.-H., Santori F.R., Boggiano C., Wang Y.-H., Arima K., Bover L., Hanabuchi S., Khalili J., Marinova E., Zheng B., Littman D. R., Liu Y.-J. Identification of IL-17-Producing FOXP3⁺ Regulatory T Cells in Humans. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 2009, Vol. 106, pp. 4793-4798.
76. Walch-Rückheim B., Mavrova R., Henning M., Vicinus B., Kim Y.J., Bohle R.M., Juhasz-Böss I., Solomayer E.F., Smola S. Stromal Fibroblasts Induce CCL20 through IL6/C/EBP β to Support the Recruitment of Th17 Cells during Cervical Cancer Progression. *Cancer Res.*, 2015, Vol. 75, pp. 5248-5259.
77. Wiebe J.P., Dinsdale C.J. Inhibition of cell proliferation by glycerol. *Life Sci.*, 1991, Vol. 48, pp. 1511-1517.
78. Yamazaki T., Yang X.O., Chung Y., Fukunaga A., Nurieva R., Pappu B., Martin-Orozco N., Kang H.S., Ma L., Panopoulos A.D., Craig S., Watowich S.S., Jetten A.M., Tian O., Dong C. CCR6 Regulates the Migration of Inflammatory and Regulatory T Cells. *J. Immunol.*, 2008, Vol. 181, pp. 8391-8401.
79. Yeung W.S., Lee K.F., Koistinen R., Koistinen H., Seppala M., Ho P.C., Chiu P.C. Effects of glycodelins on functional competence of spermatozoa. *J. Reprod. Immunol.*, 2009, Vol. 83, pp. 26-30.
80. Zhang Z., Clarke T.B., Weiser J.N. Cellular effectors mediating Th17- dependent clearance of pneumococcal colonization in mice. *J. Clin. Invest.*, 2009, Vol. 119, pp. 1899-1909.

Авторы:

Тимганова В.П. — к.б.н., научный сотрудник лаборатории клеточной иммунологии и нанобиотехнологии, Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук — филиал ФГБУН «Пермский федеральный исследовательский центр Уральского отделения Российской академии наук», г. Пермь, Россия

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

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

Authors:

Timganova V.P., PhD (Biology), Research Associate, Laboratory of Cellular Immunology and Nanobiotechnology, Institute of Ecology and Genetic of Microorganisms, Perm Federal Research Center, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Perm, Russian Federation

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

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

Шардина К.Ю. — инженер-исследователь лаборатории клеточной иммунологии и нанобиотехнологии, Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук — филиал ФГБУН «Пермский федеральный исследовательский центр Уральского отделения Российской академии наук», г. Пермь, Россия

Shardina K. Yu., Research Engineer, Laboratory of Cellular Immunology and Nanobiotechnology, Institute of Ecology and Genetic of Microorganisms, Perm Federal Research Center, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Perm, Russian Federation

Узвйюк С.В. — инженер-исследователь лаборатории клеточной иммунологии и нанобиотехнологии, Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук — филиал ФГБУН «Пермский федеральный исследовательский центр Уральского отделения Российской академии наук», г. Пермь, Россия

Uzhviyuk S.V., Research Engineer, Laboratory of Cellular Immunology and Nanobiotechnology, Institute of Ecology and Genetic of Microorganisms, Perm Federal Research Center, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Perm, Russian Federation

Кропанева М.Д. — к.б.н., младший научный сотрудник лаборатории клеточной иммунологии и нанобиотехнологии, Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук — филиал ФГБУН «Пермский федеральный исследовательский центр Уральского отделения Российской академии наук»; ассистент кафедры микробиологии и иммунологии ФГАОУ ВО «Пермский государственный национальный исследовательский университет», г. Пермь, Россия

Kropaneva M.D., PhD (Biology), Junior Research Associate, Laboratory of Cellular Immunology and Nanobiotechnology, Institute of Ecology and Genetic of Microorganisms, Perm Federal Research Center, Ural Branch, Russian Academy of Sciences; Assistant Professor, Department of Microbiology and Immunology, Perm State University, Perm, Russian Federation

Раев М.Б. — д.б.н., заведующий лабораторией клеточной иммунологии и нанобиотехнологии, Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук — филиал ФГБУН «Пермский федеральный исследовательский центр Уральского отделения Российской академии наук»; профессор кафедры микробиологии и иммунологии ФГАОУ ВО «Пермский государственный национальный исследовательский университет», г. Пермь, Россия

Rayev M.B., PhD, MD (Biology), Head, Laboratory of Cellular Immunology and Nanobiotechnology, Institute of Ecology and Genetic of Microorganisms, Perm Federal Research Center, Ural Branch, Russian Academy of Sciences; Professor, Department of Microbiology and Immunology Perm State University, Perm, Russian Federation

Поступила 09.09.2022
Принята к печати 20.02.2023

Received 09.09.2022
Accepted 20.02.2023

γδТ-КЛЕТКИ У ПАЦИЕНТОВ С ОПУХОЛЯМИ ПОЛОСТИ НОСА И ОКОЛОНОСОВЫХ ПАЗУХ

**Нижегородова Д.Б.^{1,2}, Колядич Ж.В.³, Морозова Н.А.³,
Зафранская М.М.^{1,2}**

¹ Белорусская медицинская академия последипломного образования, г. Минск, Республика Беларусь

² Международный государственный экологический институт имени А.Д. Сахарова Белорусского государственного университета, г. Минск, Республика Беларусь

³ Республиканский научно-практический центр онкологии и медицинской радиологии имени Н.Н. Александрова, Минский район, а/г Лесной, Республика Беларусь

Резюме. Иммунологические факторы могут играть важную роль в качестве предикторов или прогностических биомаркеров при онкопатологических процессах. В последнее время в качестве перспективных эффекторных клеток для иммунотерапии злокачественных новообразований рассматривается популяция неклассических γδТ-лимфоцитов, сочетающих свойства врожденного и приобретенного иммунитета. В данной работе представлена структурно-функциональная характеристика субпопуляций γδТ-лимфоцитов, вовлекающихся в формирование противоопухолевого иммунитета у пациентов со злокачественными и доброкачественными опухолями полости носа и околоносовых пазух. Цель исследования – оценить субпопуляционный состав и функциональные особенности γδТ-клеток у пациентов с новообразованиями полости носа и околоносовых пазух для характеристики механизмов клеточного иммунитета при опухоли-ассоциированном патологическом процессе.

Материалом исследования явилась периферическая венозная кровь 21 пациента (13 мужчин и 8 женщин, средний возраст 63,0 (56,0-69,0) лет) с новообразованиями полости носа и околоносовых пазух и 10 условно здоровых доноров. Фенотип лимфоидных клеток и внутриклеточную продукцию цитокинов оценивали с использованием моноклональных антител и метода проточной цитометрии, внеклеточную продукцию цитокинов исследовали в супернатантах культур методом иммуноферментного анализа.

Установлено увеличение общего количества γδТ-клеток у пациентов с плоскоклеточным раком и изменение соотношения Vδ2⁺/Vδ1⁺Т-клеток в периферической крови как у пациентов со злокачественными, так и доброкачественными опухолями полости носа и околоносовых пазух по сравнению со здоровыми донорами. В обеих исследуемых группах пациентов выявлено повышение уровня фосфоантиген-индуцируемой активации γδТ-клеток в сочетании со снижением индексов стимуляции и различным цитокиновым профилем: у пациентов с плоскоклеточным раком отмечалось увеличение внутриклеточной продукции IFNγ в γδТ-клетках, в то время как у пациентов с инвертированной папилломой перераспределение субпопуляций γδТ-лимфоцитов связано с преимущественной продукцией IL-17. При этом процент γδТ-лимфоцитов, синтезирующих IFNγ, коррелировал с его концен-

Адрес для переписки:

Нижегородова Дарья Борисовна
Белорусская медицинская академия последипломного образования
220013, Республика Беларусь, г. Минск,
ул. П. Бровки 3, корп. 3.
Тел.: +375 296089994.
E-mail: nzh@tut.by

Address for correspondence:

Darya B. Nizheharodava
Belarusian Medical Academy of Postgraduate Education
3 P. Brovki St, Bldg 3
Minsk
220013 Belarus
Phone: +375 296089994.
E-mail: nzh@tut.by

Образец цитирования:

Д.Б. Нижегородова, Ж.В. Колядич, Н.А. Морозова, М.М. Зафранская «γδТ-клетки у пациентов с опухолями полости носа и околоносовых пазух» // Медицинская иммунология, 2023. Т. 25, № 6. С. 1343-1352.
doi: 10.15789/1563-0625-GCI-2624

© Нижегородова Д.Б. и соавт., 2023
Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

D.B. Nizheharodava, J.V. Kolyadich, N.A. Marozava, M.M. Zafranskaya "γδT cells in patients with tumors of the nasal cavity and paranasal sinuses", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2023, Vol. 25, no. 6, pp. 1343-1352.
doi: 10.15789/1563-0625-GCI-2624

© Nizheharodava D.B. et al., 2023
The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License
DOI: 10.15789/1563-0625-GCI-2624

трацией в супернатантах клеточных культур у пациентов со злокачественными новообразованиями полости носа и околоносовых пазух ($R = 0,61$; $p < 0,05$).

Полученные данные свидетельствуют о вовлечении $\gamma\delta T$ -лимфоцитов в патогенез злокачественных и доброкачественных опухолей и могут являться фундаментальной основой для дальнейшего определения возможных предикторов опухоль-ассоциированной воспалительной реакции и малигнизации.

Ключевые слова: опухоли полости носа, опухоли околоносовых пазух, лимфоидные клетки, $\gamma\delta T$ -лимфоциты, $IFN\gamma$, $IL-17$, изопентенил пирофосфат

$\gamma\delta T$ CELLS IN PATIENTS WITH TUMORS OF THE NASAL CAVITY AND PARANASAL SINUSES

Nizheharodava D.B.^{a,b}, Kolyadich J.V.^c, Marozava N.A.^c,
Zafranskaya M.M.^{a,b}

^a Belarusian Medical Academy of Postgraduate Education, Minsk, Republic of Belarus

^b International Sakharov Environmental Institute of Belarusian State University, Minsk, Republic of Belarus

^c N. Alexandrov National Cancer Centre of Belarus, Minsk District, Republic of Belarus

Abstract. The immunological factors can play an important role as predictive and prognostic biomarkers in oncopathology. Recently, non-conventional innate-like $\gamma\delta T$ -lymphocytes have received a lot of attention as a promising effector cell population for cancer immunotherapy. This study describes structural and functional subpopulations of $\gamma\delta T$ lymphocytes involved in antitumor immunity in patients with malignant and benign tumors of the nasal cavity and paranasal sinuses. The aim of the study was to estimate $\gamma\delta T$ cell subsets composition and functions in patients with neoplasms of nasal cavity and paranasal sinuses in order to characterize cellular immunity in tumor-associated pathological process.

The peripheral venous blood was obtained from 21 patients (13 men and 8 women, average age of 63.0 (56.0-69.0) y. o.) with neoplasms of nasal cavity and paranasal sinuses, and 10 healthy donors. Lymphoid cells phenotype and production of intracellular cytokines were investigated using monoclonal antibodies and flow cytometry, production of extracellular cytokines was measured using enzyme-linked immunosorbent assay kits.

The increase of total $\gamma\delta T$ cells number in patients with squamous cell carcinoma accompanied by changes in $V\delta 2^+/V\delta 1^+T$ cells ratio in peripheral blood of both patients' groups with malignant and benign nasal cavity and paranasal sinuses tumors were revealed as compared to healthy donors. The upregulated $\gamma\delta T$ cell response to phosphoantigen induction in combination with reduced indices of stimulations were shown in the both patients groups but cytokine profile was different, i.e., the elevated $IFN\gamma$ production has been determined in patients with squamous cell carcinoma. However, in patients with inverted papilloma, redistribution of $\gamma\delta T$ cell subsets has been associated with $IL-17$ -producing $\gamma\delta T$ cells. Moreover, the percent of $IFN\gamma^+\gamma\delta T$ lymphocytes did correlate with $IFN\gamma$ concentration in cell culture supernatants of patients with malignant nasal cavity and paranasal sinuses neoplasms ($R = 0.61$; $p < 0.05$).

The revealed data suggest an involvement of $\gamma\delta T$ lymphocytes in malignant and benign tumor pathogenesis and may provide a fundamental basis for further detection of possible tumor-associated inflammation and malignization predictors.

Keywords: nasal cavity, paranasal sinuses, neoplasms, lymphoid cells, $\gamma\delta T$ lymphocytes, $IFN\gamma$, $IL-17$, isopentenyl pyrophosphate

Introduction

Nasal cavity (NC) and paranasal sinuses (PNS) neoplasms account for approximately 5% of the upper respiratory tract tumors. About half of these tumors are benign, mainly squamous and inverted papilloma (IP), and the remaining are malignancies amounting for 1-3% of malignant tumors of all localizations, of which squamous cell carcinoma (SCC) comprises approximately 75%. More than 76% of patients have

malignant tumors of NC and PNS detected at stage III-IV [18, 22].

One of the issues is the absence of biomarkers or predictors that contribute to the early detection of the malignant process and, therefore, late diagnosis of malignant NC and PNS neoplasms. According to numerous studies, neoplasm has a dual effect on the immune system: on the one hand, the local tumor microenvironment is characterized by changes in immune cells populations and immune control check-points including the interaction of

co-inhibitor receptors (cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4, programmed death-1, T cell immunoglobulin domain and mucin domain 3, lymphocyte activation gene 3, etc.) on lymphocytes with their ligands, on the other hand, tumor factors production induces an imbalance and leads to immunosuppression contributing to tumor cells escape from immunosurveillance [4, 7]. These molecular events determine a certain lymphoid cells subsets composition in the systemic circulation as well as local infiltration into the tumor, the functional potential of which can be characterized by cytotoxic reactions and also contribute to the immunosuppression [11]. In view of the immune system involvement in the tumor pathogenesis, it seems important to search for immunological biomarkers, which may include T lymphocytes with T cell receptors (TCR) composed of γ and δ chains ($\gamma\delta$ T lymphocytes).

Over the past decade, unconventional innate-like $\gamma\delta$ T lymphocytes have received a lot of attention as attractive effector cells for cancer immunotherapy [16, 33]. Being a minor T cell population in peripheral blood (0.5-10% of all T lymphocytes), they are abundant in the mucosa within intraepithelial lymphocytes (up to 50%) and participate in protective immunity against tumors and infectious organisms providing immunosurveillance. Their high and quick antitumor activity is characterized by non-MHC-restricted antigen recognition, cytotoxic potential, antigen-presenting function, abundant cytokine and chemokine secretion capacity [15, 28].

In recent years, there have been a number of reports about diverse roles of $\gamma\delta$ T lymphocytes in tumor immunity owing to their structural and functional heterogeneity [13, 16, 32]. Compared to antigenic receptors of $\alpha\beta$ T and B lymphocytes, the great $\gamma\delta$ T cells potential to various ligand-binding sites formation comes from the high polymorphism of $\gamma\delta$ TCR, the variable domains of which are encoded with 3 main V δ -genes and at least 6 V γ -genes, resulting in high $\gamma\delta$ T lymphocytes heterogeneity. Moreover, similar to $\alpha\beta$ T lymphocytes $\gamma\delta$ T cells are able to polarize into $\gamma\delta$ T1 cells (secreting interferon γ (IFN γ) and tumor necrosis factor α (TNF α)), $\gamma\delta$ T1/17 cells (secreting IFN γ and interleukin (IL) 17), $\gamma\delta$ T17 cells (secreting IL-17 only), $\gamma\delta$ T2 cells (secreting IL-4), follicular B helper $\gamma\delta$ T_{FH} cells (secreting IL-4, IL-10) and regulatory fork head box P3⁺ (FoxP3⁺) $\gamma\delta$ Treg cells. It was demonstrated that $\gamma\delta$ T1 cells (express CD56⁺ phenotype and are involved in cytolytic reactions) and $\gamma\delta$ T_{FH} cells (enhance B lymphocyte maturation and antibody formation) have the both a direct and indirect antitumor effect, while $\gamma\delta$ T17 cells, FoxP3⁺ $\gamma\delta$ Treg cells show protumorigenic effect due to the immunosuppression [28, 32].

Thus, the determination of $\gamma\delta$ T lymphocytes specific immunological features in benign and malignant NC and PNS neoplasms is of actual interest and may be considered as a basis for detailing and systematizing new methods for diagnosis and therapy

as well as developing an algorithm for their application in preventing disease complications and relapses.

In this article, the characteristic of $\gamma\delta$ T cell subsets composition and functions in patients with NC and PNS neoplasms is presented for the first time, aimed at $\gamma\delta$ T mediated cellular immunity assessment in tumor-associated pathological process.

Materials and methods

The peripheral venous blood was obtained from 21 patients with NC and PNS neoplasms (13 men and 8 women, average age of 63.0 (56.0-69.0) y. o.) hospitalized at N.N. Alexandrov National Cancer Centre of Belarus. All subjects were divided in three groups: group 1 – 10 patients with SCC; group 2 – 11 patients with IP; group 3 consisted of 10 healthy donors. Clinical and demographic characteristics of patients and healthy donors are presented in Table 1.

Peripheral blood mononuclear cells isolation and cultivation

Peripheral blood was collected in sterile heparin tubes, diluted 1:1 with physiological saline, layered onto a Histopaque-1077 density gradient (Sigma, Germany) and centrifuged for 30 min at 300 g at 4 °C. The resulting interphase ring of peripheral blood mononuclear cells (PBMC) was washed twice in physiological saline for 10 min at 300 g and 4 °C. PBMC were cultured in RPMI-1640 medium (Bio-Whittaker, USA) completed with 10% fetal calf serum (Gibco, Germany), 2 mM L-glutamine (Bio-Whittaker, USA), 1% antibiotic-antimycotic (Gibco, Germany), 100 U/mL IL-2 (Fluka, Germany) during 3 days (for further estimation of $\gamma\delta$ T cells cytokines production) and in the presence or absence of 20 μ M isopentenyl pyrophosphate (IPP, Sigma, Germany) during 6 days (for further estimation of $\gamma\delta$ T cells proliferation rate) as previously described with minor modifications [20].

Flow cytometry method

Immunophenotyping of peripheral blood lymphoid cells

The populations of lymphoid cells in whole peripheral blood were determined using the next CYTO-STAT tetraCHROME monoclonal antibody panels: CD45-FITC/CD4-RD1/CD8-ECD/CD3-PC5 and CD45-FITC/CD56-RD1/CD19-ECD/CD3-PC5 (Beckman Coulter, USA). $\gamma\delta$ T lymphocytes subsets were identified in whole peripheral blood using a DuraCloneIMTCRs monoclonal antibody panel: $\gamma\delta$ TCR-FITC/ $\alpha\beta$ TCR-PE/HLA-DR-ECD/V δ 1TCR-PC7/CD4-APC/CD8-AF700/CD3-AF750/V δ 2TCR-PB/CD45-KrO (Beckman Coulter, USA). Monoclonal antibody reagents were added according to the manufacturer's instructions to 100 μ L of the venous blood specimen, and reaction mixtures were incubated at 20-25 °C for 15 min in the dark. Then red blood cells were lysed with VersaLyse solution (Beckman Coulter, USA) for 10 min. Results were analyzed on

TABLE 1. CLINICAL AND DEMOGRAPHIC CHARACTERISTICS OF PATIENTS AND HEALTHY DONORS

Groups	Diagnosis	n	Gender, male / female	Age, y. o.	Disease stage (TNM system)	Disease duration, months
Group 1	Squamous cell carcinoma	10	7/3	58.0 (56.0-71.7)	stage I (20%) stage II (20%) stage III (20%) stage IV (40%)	6.0 (4.0-10.0)
Group 2	Inverted papilloma	11	6/5	64.0 (50.5-67.5)	–	5.0 (2.0-18.0)
Group 3	Healthy donors	10	5/5	49.0 (44.0-61.0)	–	–

Note. TNM, Tumor, Node, Metastasis system; n, patients' number in a group; y. o., years old.

10000 CD3⁺T lymphocytes or 1000 $\gamma\delta$ T lymphocytes using a 10-channel Cytotflex flow cytometer (Beckman Coulter, USA).

Intracellular cytokine detection

IFN γ and IL-17 syntheses were evaluated in 3-days PBMC cultures as previously described with minor modifications [31]. For quantitative intracellular cytokines determination, 4 ng/mL phorbol 12-myristate 13-acetate (Sigma, Germany), 1 μ g/mL of ionomycin calcium salt and 10 μ g/mL brefeldin A (Cayman Chemicals, USA) were added in the last 4 hours of cell culture activation. Then PBMC were stained with monoclonal antibodies to surface CD3-FITC and $\gamma\delta$ TCR-PC7 (Beckman Coulter, USA) at 20-25 °C for 15 min in the dark, fixed with 4% paraformaldehyde (Sigma, Germany), permeabilized with 2% Triton X (Sigma, Germany), and then intracellular staining was performed using monoclonal antibodies IFN γ -PE (Beckman Coulter, USA) and IL-17A-PerCP (R&D Systems, USA). Results were analyzed on 1000 $\gamma\delta$ T lymphocytes using flow cytometer.

$\gamma\delta$ T cells proliferation rate

$\gamma\delta$ T cells proliferation rate was estimated in 6-days PBMC cultures stained with monoclonal antibodies to surface CD3-FITC and $\gamma\delta$ TCR-PC7 (Beckman Coulter, USA). PBMC cultures without IPP were used as controls. Results were analyzed on 1000 $\gamma\delta$ T lymphocytes using flow cytometer. The index of stimulation (IS) was calculated as the ratio of IPP-stimulated $\gamma\delta$ T cells number to the unstimulated cultures in conventional units (c. u.).

ELISA extracellular IFN detection

IFN γ concentration was determined in the cell-free culture supernatants using commercial human ELISA kit “ γ -Interferon-EIA-BEST” (Vektor-Best, Russia) according to the manufacturer's instruction.

Statistical method

Statistical data processing was performed using Statistica 8.0 (StatSoft Inc., USA). The median (Me), 25th and 75th percentiles were used as descriptive statistics of the studied groups. Significant differences between investigated groups were determined by nonparametric criteria: Mann–Whitney U test and

Wilcoxon test; p-values < 0.05 (*) and p < 0.01 (**) were considered as statistically significant.

Results

Lymphoid cells population in patients with malignant and benign NC and PNS neoplasms

The absolute and relative numbers of peripheral blood lymphocytes populations in patients with NC and PNS neoplasms and donors are presented in Table 2. Patients from group 1 were characterized by changes in the following classical lymphoid cell populations: decreased CD3⁺CD4⁺T helpers (p < 0.01) as well as increased CD3⁺CD8⁺T lymphocytes (p < 0.05) have been detected as compared to healthy donors. Meanwhile, the total number of CD3⁺T lymphocytes, CD19⁺B cells and CD56⁺NK cells in patients with SCC did not significantly differ from those in groups 2 and 3. By contrast, the significantly increased relative number of $\gamma\delta$ T lymphocytes was found in patients with malignant NC and PNS tumors as compared to the both patients with IP as well as to healthy donors. The quantitative parameters of peripheral blood lymphocytes subsets in patients with IP did not statistically differ from those in healthy donors (Table 2).

In view of significant changes and involvement of non-classical $\gamma\delta$ T lymphocytes in patients with NC and PNS tumors, a further analysis of $\gamma\delta$ T cells subsets and potential functions was performed.

$\gamma\delta$ T cell subsets in patients with malignant and benign NC and PNS neoplasms

Three subpopulations of $\gamma\delta$ T lymphocytes depending on the expression of the TCR δ chain were investigated in patients with NC and PNS neoplasms. The original flow cytometry dot-plots of $\gamma\delta$ T cells numbers are presented in Figure 1 and displayed a pattern of typical subsets composition in investigated groups.

As seen from the original dot-plots of V δ 1⁺T and V δ 2⁺T cells numbers in patient S. with a confirmed diagnosis of SCC from group 1 (Figure 1A) and in patient N. with a confirmed diagnosis of IP from group 2 (Figure 1B), V δ 2⁺/V δ 1⁺T cells ratio has been decreased as compared to healthy donor R. Like that, V δ 1⁺T cells subset prevailed in patient S.

(47.33%, Figure 1A), and Vδ2⁺/Vδ1⁺T cells ratio reached 1,1, while in healthy donor R. Vδ2⁺T cells subset dominated (94.63%, Figure 1C), and Vδ2⁺/Vδ1⁺T cells ratio made 23.9. Meanwhile, in patient N. with IP with decreased Vδ2⁺T cells subset number (72.02%) as well as Vδ2⁺/Vδ1⁺T cells ratio (3.9), an increase of the both Vδ1⁺T cells and Vδ1⁻/Vδ2⁻T cells (corresponds to Vδ3⁺T cells) subsets was observed (Figure 1B).

The statistical analysis of γδT cells subsets number in investigated groups revealed the significantly decreased Vδ2⁺T cells number and the increased Vδ1⁺T cells percentage as well as the tendency to increase of Vδ1⁻Vδ2⁻T lymphocytes (Vδ3⁺T cells) in peripheral blood of patients with both malignant and benign NC and PNS tumors as compared to healthy donors (Figure 1D).

γδT cells proliferation response to IPP in patients with malignant and benign NC and PNS neoplasms

For the assessment of functional status, the γδT lymphocytes number was determined in 6-days PBMC cultures under IPP-stimulated conditions. The increased γδT cells percentage in response to phosphoantigen was shown in the both groups of patients (p < 0.05) as well as in healthy donors (p < 0.01) (Figure 2, significance is not shown). But the number of IPP-stimulated γδT cells in PBMC cultures of patients with SCC was significantly higher (21.6 (10.3-32.4) %) than in patients with IP (11.5 (3.8-19.6) %) or healthy donors (12.3 (8.9-26.6) %). Nevertheless, the indices of stimulations in the both groups of patients were significantly reduced (IS_{group1} = 1.87 (1.69-2.35) c. u. and IS_{group2} = 2.10 (1.88-3.11) c. u.) as compared to healthy donors

TABLE 2. LYMPHOID CELLS IN PERIPHERAL BLOOD OF PATIENTS WITH NC AND PNS NEOPLASMS AND HEALTHY DONORS, Me (Q_{0.25}-Q_{0.75})

Lymphoid cells	Patients with NC and PNS neoplasms		Healthy donors	p-value
	Group 1 (SCC) n = 13	Group 2 (IP) n = 15	Group 3 n = 10	
	1	2	3	
Lymphocytes, %	30.50 (23.50-35.25)	36.00 (27.50-51.00)	36.00 (31.00-44.00)	n. s.
Lymphocytes, × 10 ⁹ /L	2.03 (1.37-2.86)	2.70 (1.88-3.53)	2.62 (2.23-3.08)	n. s.
CD3 ⁺ T cells, %	72.81 (68.86-79.02)	70.52 (65.21-75.33)	70.53 (68.22-76.76)	n. s.
CD3 ⁺ T cells, × 10 ⁹ /L	1.32 (0.94-1.89)	2.09 (1.38-2.50)	1.91 (1.67-2.17)	n. s.
CD3 ⁺ CD4 ⁺ T cells, %	53.13 (49.34-64.83)	60.32 (54.98-62.73)	64.41 (60.30-69.71)	p ₁₋₃ < 0.05
CD3 ⁺ CD4 ⁺ T cells, × 10 ⁶ /L	769.42 (502.57-1150.03)	1152.95 (818.77-1284.44)	1172.99 (1013.61-1363.15)	n. s.
CD3 ⁺ CD8 ⁺ T cells, %	40.57 (26.51-44.65)	30.97 (28.14-33.83)	29.25 (25.10-33.07)	p ₁₋₃ < 0.05
CD3 ⁺ CD8 ⁺ T cells, × 10 ⁶ /L	454.27 (378.06-646.46)	651.77 (367.62-784.22)	561.30 (418.69-714.54)	n. s.
γδTCR ⁺ CD3 ⁺ T cells, %	5.82 (3.76-7.24)	3.49 (2.72-6.24)	3.32 (1.93-5.17)	p ₁₋₂ < 0.05 p ₁₋₃ < 0.05
γδTCR ⁺ CD3 ⁺ T cells, × 10 ⁶ /L	68.01 (30.43-101.12)	72.53 (41.56-123.44)	55.81 (35.95-104.42)	n. s.
CD19 ⁺ B cells, %	8.35 (5.38-9.42)	10.34 (5.93-11.06)	9.03 (7.56-10.92)	n. s.
CD19 ⁺ B cells, × 10 ⁹ /L	168.64 (75.28-248.99)	251.34 (146.54-339.12)	222.49 (194.44-332.79)	n. s.
CD56 ⁺ NK cells, %	17.57 (12.39-19.56)	18.25 (12.49-22.48)	15.25 (11.48-18.54)	n. s.
CD56 ⁺ NK cells, × 10 ⁶ /L	290.96 (229.02-423.22)	419.85 (302.16-638.14)	401.56 (250.99-491.42)	n. s.

Note. SCC, squamous cell carcinoma; IP, inverted papilloma; n, patients' number in a group; p-value, statistically significant test result; n. s., not significant; CD, cluster of differentiation; TCR, T cell receptor; NK cells, natural killer cells.

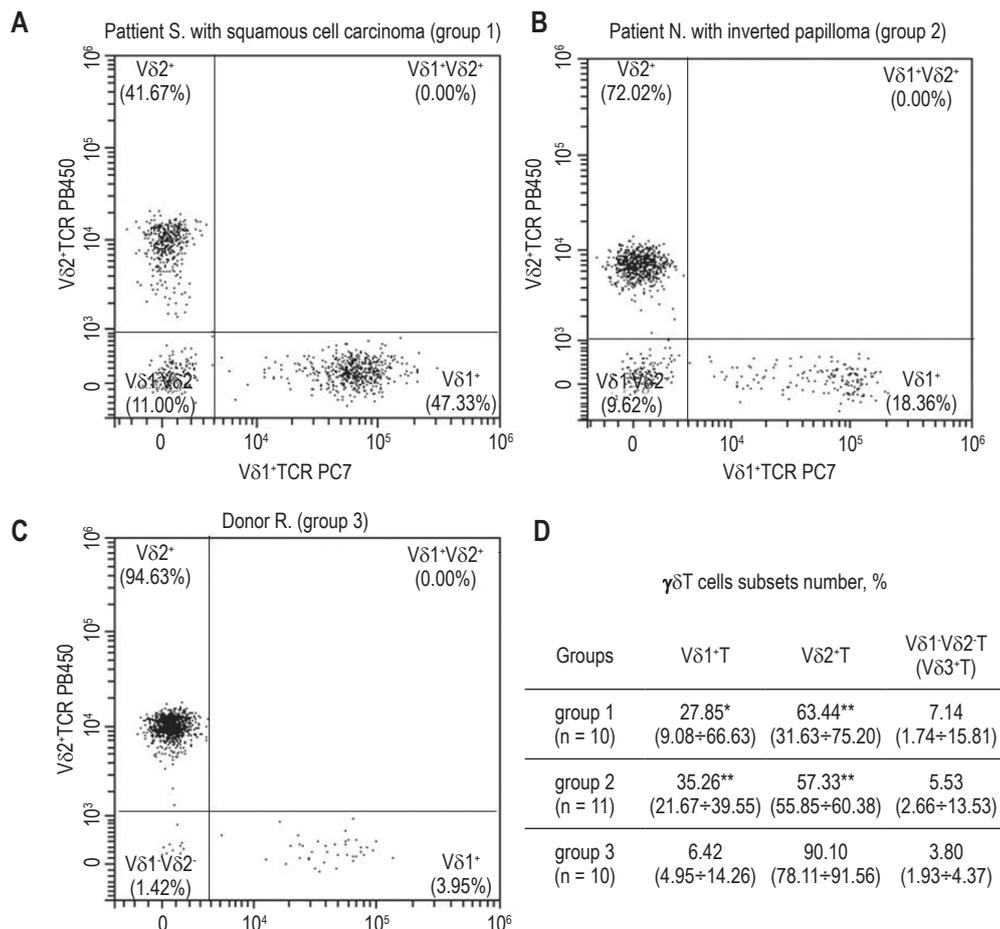


Figure 1. γδT cells subsets (%) in peripheral blood of patients with NC and PNS neoplasms and healthy donors

Note. (A-C) Original dot-plots from flow cytometer of typical Vδ1⁺T and Vδ2⁺T cells distribution in investigated groups (X-axis, Vδ1⁺T cell receptor expression; Y-axis, Vδ2⁺T cell receptor expression). (D) Descriptive statistics of γδT cells subsets number. TCR, T cell receptor; PB450, pacific blue dye; PC7, phycoerythrin-cyanine 7 dye; *, p < 0.05; **, p < 0.01 as compared to group 3; group 1, patients with squamous cell carcinoma; group 2, patients with inverted papilloma; group 3, healthy donors.

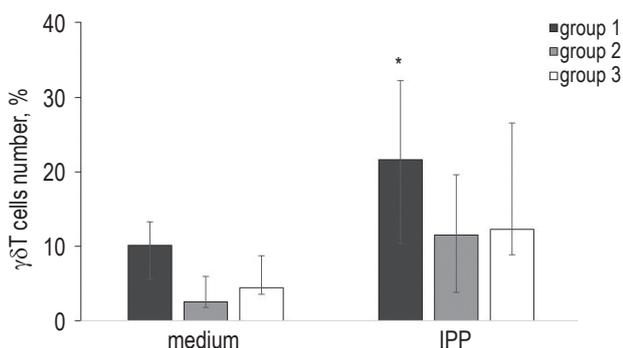


Figure 2. Proliferation rate of γδT cells (%) in stimulated (IPP) and unstimulated (medium) 6-days PBMC cultures

Note. *, p < 0.05 as compared to group 3; medium, unstimulated PBMC cultures; IPP, PBMC cultures stimulated with isopentenyl pyrophosphate; group 1, patients with squamous cell carcinoma; group 2, patients with inverted papilloma; group 3, healthy donors.

($IS_{group3} = 2.88 (2.58-3.15)$ c. u., respectively, p < 0.01 and p < 0.05).

γδT cells functional subsets in patients with malignant and benign NC and PNS neoplasms

One of the main characteristics of γδT lymphocytes is their inherent ability to very rapidly secrete pro-inflammatory cytokines [23]. In this regard, the functional maturity of γδT lymphocytes was characterized by their ability to produce intracellular either IFNγ or IL-17, followed by the determination of IFNγ⁺γδT lymphocytes, IFNγ⁺IL-17⁺γδT lymphocytes or IL-17⁺γδT lymphocytes in 3-days PBMC cultures from patients with malignant and benign NC and PNS tumors and healthy donors.

The main source of IFNγ among T cells was a subpopulation of γδT lymphocytes (Figure 3) whereas CD3⁺T cells synthesized IFNγ at low levels (group 1: 7.8 (5.2-11.2) %; group 2: 4.3 (3.9-4.7) %; group 3: 5.2 (4.6-6.2) %). A significant increase of spontaneous intracellular IFNγ production by γδT lymphocytes was observed in group 1 as compared to the control group (Figure 3), while the significant differences

in the population of CD3⁺T lymphocytes were not established.

Moreover, IFN γ ⁺γδT lymphocytes correlated with IFN γ concentration in supernatants of patients with malignant NC and PNS neoplasms (R = 0.61; p < 0.05), which varied from 22.7 to 1396.2 pg/mL. At the same time, the percentage of γδT lymphocytes spontaneously synthesizing the both IFN γ and IL-17 was increased in patients with malignant and benign tumors as compared to the controls (p < 0.05). The number of γδTCR⁺IFN γ ⁺IL-17⁺T cells in patients from group 2 was significantly higher than in group 1 (Figure 3). In addition, in patients with benign tumors, the number of γδT lymphocytes producing only IL-17 was higher than in group 1 or healthy donors (Figure 3).

Discussion

Recently, the immune system has been established to play a key role in the control of tumor growth and progression [14]. In view of this, the phenotype of main lymphoid cells subsets was investigated in peripheral blood of patients with malignant and benign tumors of NC and PNS. The revealed CD4/CD8 ratio decrease characterizes the redistribution of T cells towards cytotoxic profile in patients with SCC. Thus, the activation of the classical T cell immunity with a pronounced cytotoxic potential is observed in patients with malignant NC and PNS neoplasms reflecting the formation of antitumor immunity and was previously reported by many authors [8, 12, 17].

In this regard, our attention essentially focused on non-classical γδT cells, which were discovered three decades ago and still remain an enigmatic population of lymphocytes [26, 30]. γδT cells perform a wide variety of functions, but some discrete subsets have more restricted effector properties with strong evidence for functional plasticity in the periphery during immunopathological process [23, 32]. The elevation of γδT cells relative number was detected in peripheral blood of patients with SCC. So, taking into account that γδT cells structural and functional features can be used as possible biomarkers of NC and PNS neoplasms, the subsets composition, proliferative ability and cytokine profile were further investigated.

According to literature data, three subpopulations of γδT lymphocytes are distinguished depending on the expression of the TCR δ chain: a) V δ 1⁺T cells that populate mainly gastrointestinal epithelium, skin, spleen, liver, and also are found in a small amount in peripheral blood (< 30%) recognizing lipid-presenting MHC-like molecules of the CD1 family or stress-induced molecules MICA/B, ULBP; b) V δ 2⁺T cells that predominate in peripheral blood (> 70%) and are activated by microbial phosphoantigens ((E)-4-hydroxy-3-methyl-but-2-enyl pyrophosphate) or phosphoantigens of transformed cells (IPP); c) V δ 3⁺T cells, which are localized in the liver and gastrointestinal epithelium, express the degranulation

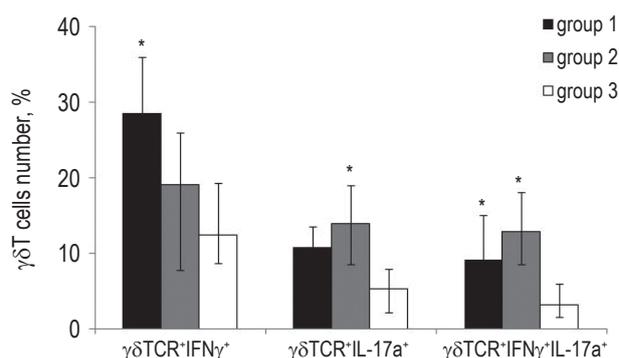


Figure 3. IFN γ and IL-17 synthesis in $\gamma\delta$ T lymphocytes (%) of patients with malignant and benign NC and PNS neoplasms

Note. *, p < 0.05 as compared to group 3; group 1, patients with squamous cell carcinoma; group 2, patients with inverted papilloma; group 3, healthy donors; TCR, T cell receptor; IFN γ , interferon γ ; IL-17, interleukin 17.

marker CD107 α and are identified in patients with chronic viral infection (cytomegalovirus, HIV), B cell leukemia and lymphoma [28, 33].

Our results showed changes in γδT lymphocytes subsets characterized by the significantly decreased number of V δ 2⁺T cells and the increased amount of V δ 1⁺T cells as well as the tendency to increased V δ 1-V δ 2-T lymphocytes (V δ 3⁺T cells) in peripheral blood of patients with both malignant and benign NC and PNS tumors as compared to healthy donors. Previously, Wu D. et al. have reported a redistribution of γδT lymphocytes subsets between peripheral blood and tissue under oncopathological conditions because of changes in the cytokine microenvironment [28]. Taking into account that V δ 2⁺T lymphocytes mainly recognize phosphorylated antigens generated in mevalonate pathway and accumulate in tumor cells, as well as F1-ATPase expressed on the surface of tumor cells and stress-induced molecules (MICA and MICB, UL16-binding protein) [26], a decrease in V δ 2⁺T cells number in the peripheral blood results from cells migration into tissues for their effector functions implementation.

Previous studies demonstrated that V δ 2⁺T lymphocytes subset has a pronounced antitumor potential, can inhibit cell proliferation, angiogenesis, lymphangiogenesis and induce apoptotic death of cancer cells [13, 15]. The role of V δ 1⁺T lymphocytes in malignant neoplasms pathogenesis is still being debated. In contrast to V δ 2⁺T cells, V δ 1⁺T lymphocytes exhibit a more expressed regulatory function and are involved in immunosuppression due to the following mechanisms: inhibition of dendritic cell maturation as well as activation and differentiation of $\alpha\beta$ T lymphocytes into effector cells; IL-17-mediated angiogenesis and myeloid-derived suppressor cells (MDSC) recruitment; transforming growth factor β (TGF- β) production and promotion of epithelial-mesenchymal transition [5, 16, 25, 27]. In this regard, malignant cancer cells avoid immunosurveillance,

that results in invasion and metastasis. However, some authors demonstrated that the antitumor cytolytic effect of $V\delta 1^+T$ lymphocytes in certain tumors is much higher than that of $V\delta 2^+T$ lymphocytes [29]. In turn, the role of $V\delta 3^+T$ lymphocytes has not been studied in oncopathology, and the data concerning $V\delta 3^+T$ cells cytotoxic properties are contradictory [32].

Thus, elevated $V\delta 1^+T$ and $V\delta 3^+T$ lymphocytes numbers in the peripheral blood, on the one hand, can reflect an increased activation of these subsets, and on the other hand, indicate an unfavorable microenvironment that leads to the immunosuppression and then to the tumor formation.

Moreover, $\gamma\delta T$ lymphocytes redistribution was accompanied by changes in their functional status. Thus, in patients with SCC, the proliferative potential of $\gamma\delta T$ lymphocytes in response to phosphoantigen IPP was significantly higher than in patients with IP or healthy donors. The recognition of tumor cells by $\gamma\delta T$ lymphocytes is known to occur through a host of cell surface receptors for self and non-self ligands, including TCR recognition of tumor antigen and stress ligand receptors, such as NKG2D, $FC\gamma III$ (CD16), FasL, TRAIL and DNAM-1 (CD226) [6]. $V\delta 2^+T$ lymphocytes recognize tumor-derived phosphorylated prenyl metabolites in a TCR-dependent manner, which may accumulate intracellularly as a by-product of dysregulated tumor metabolism. IPP is one of well-studied phosphoantigen, which can accumulate in cancer cells as a result of the elevated metabolic flux through the mevalonate pathway of cholesterol biosynthesis [1, 9, 19]. Non-peptidic antigens are not presented in the context of classical MHC and are instead presented through a non-polymorphic type I transmembrane protein called butyrophilin 3A1 (BTN3A1). But the mechanism of activation of $V\delta 2^+T$ cells by BTN3A1-bound phosphoantigen remains controversial [19]. Non-MHC-restricted, possessing innate-like recognition kinetics $V\delta 2^+T$ cells are an attractive candidate for cancer immunotherapy and have been targeted in clinical settings using aminobisphosphonate drugs – potent inhibitors of the mevalonate pathway. Thereby, aminobisphosphonates not only promote direct antitumor effects but also lead to a build-up in endogenous isoprenoid metabolites resulting in activation and proliferation of type 1 cytotoxic effector $\gamma\delta T$ cells with antitumor potential to produce $IFN\gamma$, $TNF\alpha$, perforin and granzymes [6]. Despite the detected high level of $\gamma\delta T$ cells proliferation rate in response to IPP in patients groups, the indices remained reduced that possibly reflects the exhaustion of $\gamma\delta T$ cells functions as a result of chronic stimulation with tumor antigens.

Together with phenotypic heterogeneity $\gamma\delta T$ lymphocytes demonstrate functional plasticity, which is determined by both the anatomical localization and the presence of an inflammatory or tolerogenic signal of the microenvironment [13]. In this regard, the cytokine profile ($IFN\gamma$ or IL-17) of $\gamma\delta T$ lymphocytes

in patients with NC and PNS neoplasms was further investigated. An increased spontaneous intracellular and extracellular $IFN\gamma$ production respectively in $\gamma\delta T$ cells and PBMC cultures was found in patients with SCC. By secreting large amounts of $IFN\gamma$, $\gamma\delta T$ cells participate in controlling infection or tumor progression through the activation of macrophages and cytotoxic lymphocytes and provide antitumor immunosurveillance [23]. But in the both groups of patients, IL-17-producing $\gamma\delta T$ cells were also detected, which may play a pathogenic role, as their main function is extremely fast neutrophil recruitment at the site of inflammation. The established differences in IL-17-producing $\gamma\delta T$ cells in patients with malignant and benign NC and PNS neoplasms may reflect an active change in the functional potential of $\gamma\delta T$ lymphocytes from $IFN\gamma$ -mediated antitumor to IL-17-mediated protumorigenic or migration of IL-17⁺ cells in tissues. $IFN\gamma^+IL-17^+\gamma\delta T$ cells have also been characterized in patients with malignant and benign NC and PNS neoplasms. Although their precise physiological relevance is still to be established, $IFN\gamma^+IL-17^+\gamma\delta T$ cells can clearly be a distinct component of $\gamma\delta T$ cells response in scenario of tumor immunity. Sheridan et al. showed that $IFN\gamma^+IL-17^+\gamma\delta T$ cells lack of CD27 and become memory phenotype providing enhanced protection against recall infection [24]. Thus, $IFN\gamma^+IL-17^+\gamma\delta T$ cells may potentially play host-protective versus pathogenic role in a distinct microenvironment.

$\gamma\delta T$ lymphocytes are known to participate in antitumor immunosurveillance via the following mechanisms: direct cytotoxicity mediated by perforins and granzymes; FasL and TRAIL expression and elimination of Fas⁺ and TRAIL-R⁺ tumor cells; CD16-mediated antibody-dependent cellular cytotoxicity; the ability to present tumor antigens; rapid and early production of $IFN\gamma$ and $TNF\alpha$, which enhance the cells antitumor activity and inhibit tumor angiogenesis [10, 23, 32]. However, in recent years, there have been publications about the protumorigenic activity of $\gamma\delta T$ lymphocytes. In particular, IL-17⁺ $\gamma\delta T$ lymphocytes, being the main source of IL-17 in the tumor microenvironment, can contribute to angiogenesis by inducing vascular endothelial growth factor synthesis, increasing the MDSC population and MDSC-mediated depletion of CD8⁺T lymphocytes [3], as well as tumor progression because of tumor-associated inflammation and immunosuppression, including IL-10 and TGF- β production [2, 28]. In addition, IL-1 β and IL-17 secreted by IL-17⁺ $\gamma\delta T$ lymphocytes stimulate the expansion and polarization of neutrophils, which in turn acquire the ability to suppress cytotoxic CD8⁺T lymphocytes and contribute to metastases [21].

Conclusion

The activation of the classical and non-classical T cell immunity with an expressed cytotoxic potential is observed in patients with SCC, which is typical for

antitumor immunity development. In both groups of patients with malignant and benign NC and PNS neoplasms, $\gamma\delta$ T lymphocytes demonstrate phenotypic heterogeneity characterized by the increase of V δ 1⁺T and V δ 3⁺T lymphocytes as well as by the exhaustion of $\gamma\delta$ T cells proliferation. At the same time cells functional plasticity differed between study groups: $\gamma\delta$ T lymphocytes of patients with SCC are characterized by predominantly IFN γ production that mediates antitumor immunity, while in the group with IP the prevalence of IL-17 synthesis is detected

that is typical for protumorigenic microenvironment. The revealed data point the involvement of $\gamma\delta$ T lymphocytes in malignant and benign tumor pathogenesis and may provide a fundamental basis for further identification of possible tumor-associated inflammation and malignization predictors. But for the application of $\gamma\delta$ T lymphocytes parameters as biomarkers for diagnosing NC and PNS neoplasms, there is a need for their further investigation including the correlation with patients' clinical data.

References

1. Alexander A.A., Maniar A., Cummings J.S., Hebbeler A.M., Schulze D.H., Gastman B.R., Pauza C.D., Strome S.E., Chapoval A.I. Isopentenyl pyrophosphate-activated CD56⁺ $\gamma\delta$ T lymphocytes display potent antitumor activity toward human squamous cell carcinoma. *Clin. Cancer Res.*, 2008, Vol. 14, no. 13, pp. 4232-4240.
2. Braza M., Klein B. Anti-tumor immunotherapy with V γ 9V δ 2 T lymphocytes: from the bench to the bedside. *Br. J. Haematol.*, 2013, Vol. 160, pp. 123-132.
3. Cai Y., Xue F., Fleming C., Yang J., Ding C., Ma Y., Liu M., Zhang H.G., Zheng J., Xiong N., Yan J. Differential developmental requirement and peripheral regulation for dermal V γ 4 and V γ 6 T17 cells in health and inflammation. *Nat. Commun.*, 2014, Vol. 5, 3986. doi: 10.1038/ncomms4986.
4. Chakraborty P., Karmakar T., Arora N., Mukherjee G. Immune and genomic signatures in oral (head and neck) cancer. *Heliyon*, 2018, Vol. 4, no. 10, e00880. doi: 10.1016/j.heliyon.2018.e00880.
5. Davey M.S., Willcox C.R., Baker A.T., Hunter S., Willcox B.E. Recasting human Vd1 lymphocytes in an adaptive role. *Trends Immunol.*, 2018, Vol. 39, no. 6, pp. 446-459.
6. Dunne M.R., Mangan B.A., Madrigal-Estebas L., Doherty D.G. Preferential Th1 cytokine profile of phosphoantigen stimulated human V γ 9V δ 2 T cells. *Mediators Inflamm.*, 2010, Vol. 2010, 704941. doi: 10.1155/2010/704941.
7. Forster M.D., Devlin M.-J. Immune checkpoint inhibition in head and neck cancer. *Front. Oncol.*, 2018, Vol. 8, 310. doi: 10.3389/fonc.2018.00310.
8. García-Marín R., Reda S., Riobello C., Cabal V.N., Suárez-Fernández L., Vivanco B., Álvarez-Marcos C., López F., Llorente J.L., Hermsen M.A. Prognostic and therapeutic implications of immune classification by CD8⁺ tumor-infiltrating lymphocytes and PD-L1 expression in sinonasal squamous cell carcinoma. *Int. J. Mol. Sci.*, 2021, Vol. 22, no. 13, 6926. doi: 10.3390/ijms22136926.
9. Gober H.J., Kistowska M., Angman L., Jenö P., Mori L., De Libero G. Human T cell receptor $\gamma\delta$ cells recognize endogenous mevalonate metabolites in tumor cells. *J. Exp. Med.*, 2003, Vol. 197, no. 2, pp. 163-168.
10. Gogoi D., Chilunkar S. Targeting gamma delta T cells for cancer immunotherapy: bench to bedside. *Indian J. Med. Res.*, 2013, Vol. 138, pp. 174-180.
11. Gutkin D.W. and Shurin M.R. Clinical evaluation of systemic and local immune responses in cancer: time for integration. *Cancer Immunol. Immunother.*, 2014, Vol. 63, pp. 45-57.
12. Hongo T., Yamamoto H., Jiromaru R., Yasumatsu R., Kuga R., Nozaki Y., Hashimoto K., Matsuo M., Wakasaki T., Tamae A., Taguchi K., Toh S., Masuda M., Nakagawa T., Oda Y. PD-L1 expression, tumor-infiltrating lymphocytes, mismatch repair deficiency, EGFR alteration and HPV infection in sinonasal squamous cell carcinoma. *Mod. Pathol.*, 2021, Vol. 34, no. 11, pp. 1966-1978.
13. Lafont V., Sanchez F., Laprevotte E., Michaud A., Gros L., Eliaou J.-F. and Bonnefoy N. Plasticity of $\gamma\delta$ T cells: impact on the anti-tumor response. *Front. Immunol.*, 2014, Vol. 5, 622. doi: 10.3389/fimmu.2014.00622.
14. Lechner A., Schlößer H., Rothschild S.I., Thelen M., Reuter S., Zentis P., Shimabukuro-Vornhagen A., Theurich S., Wennhold K., Garcia-Marquez M., Tharun L., Quaas A., Schauss A., Isensee J., Hucho T., Huebbers C., von Bergwelt-Baildon M., Beutner D. Characterization of tumor-associated T-lymphocyte subsets and immune checkpoint molecules in head and neck squamous cell carcinoma. *Oncotarget*, 2017, Vol. 8, pp. 44418-44433.
15. Lo Presti E., Pizzolato G., Corsale A.M., Caccamo N., Sireci G., Dieli F. and Meraviglia S. $\gamma\delta$ T cells and tumor microenvironment: from immunosurveillance to tumor evasion. *Front. Immunol.*, 2018, Vol. 9, 1395. doi: 10.3389/fimmu.2018.01395.
16. Nussbaumer O., Koslowski M. The emerging role of $\gamma\delta$ T cells in cancer immunotherapy. *IOTECH*, 2019, Vol. 1, pp. 3-10.
17. O'Melia M.J., Rohner N.A., Manspeaker M.P., Francis D.M., Kissick H.T. and Thomas S.N. Quality of CD8⁺ T cell immunity evoked in lymph nodes is compartmentalized by route of antigen transport and functional in tumor context. *Sci. Adv.*, 2020, Vol. 6, no. 50, eabd7134. doi: 10.1126/sciadv.abd7134.
18. Popadyuk V.I., Korshunova I.A., Babichenko I.I. Diagnostika novoobrazovaniy polosti nosa i okolonosovyh pazuh. Bulletin of Otorhinolaryngology, 2015, Vol. 80, no. 1, pp. 72-74. (In Russ.).
19. Raverdeau M., Cunningham S., Harmon C., Lynch L. $\gamma\delta$ T cells in cancer: a small population of lymphocytes with big implications. *Clin. Transl. Immunol.*, 2019, Vol. 8, e1080. doi:10.1002/cti2.1080.
20. Rincon-Orozco B., Kunzmann V., Wrobel P., Kabelitz D., Steinle A., Herrmann T. Activation of V γ 9V δ 2 T cells by NKG2D. *J. Immunol.*, 2005, Vol. 175, no. 4, pp. 2144-2151. doi: 10.4049/jimmunol.175.4.2144.

21. Sabbione F., Gabelloni M.L., Ernst G., Gori M.S., Salamone G., Oleastro M., Trevani A., Geffner J., Jancic C.C. Neutrophils suppress gamma delta T-cell function. *Eur. J. Immunol.*, 2014, Vol. 44, pp. 819-830.
22. Schoenfeld J.D. Immunity in head and neck cancer. *Cancer Immunol. Res.*, 2015, Vol. 3, no. 1, pp. 12-17.
23. Serre K., Silva-Santos B. Molecular mechanisms of differentiation of murine pro-inflammatory $\gamma\delta$ T cell subsets. *Front. Immunol.*, 2013, Vol. 4, 431. doi: 10.3389/fimmu.2013.00431.
24. Sheridan B.S., Romagnoli P.A., Pham Q.M., Fu H.H., Alonzo F. 3rd, Schubert W.D., Freitag N.E., Lefrançois L. Gamma delta T cells exhibit multifunctional and protective memory in intestinal tissues. *Immunity*, 2013, Vol. 39, no. 1, pp. 184-195.
25. van Acker H.H., Anguille S., van Tendeloo V.F., Lion E. Empowering gamma delta T cells with antitumor immunity by dendritic cell-based immunotherapy. *Oncoimmunology*, 2015, Vol. 4, e1021538. doi: 10.1080/2162402X.2015.1021538.
26. Vantourout P., Hayday A. Six-of-the-best: unique contributions of $\gamma\delta$ T cells to immunology. *Nat. Rev. Immunol.*, 2013, Vol. 13, no. 2, pp. 88-100.
27. Wistuba-Hamprecht K., Martens A., Haehnel K., Geukes Foppen M., Yuan J., Postow M.A., Wong P., Romano E., Khammari A., Dreno B., Capone M., Ascierto P.A., Demuth I., Steinhagen-Thiessen E., Larbi A., Schilling B., Schadendorf D., Wolchok J.D., Blank C.U., Pawelec G., Garbe C., Weide B. Proportions of blood-borne V δ 1⁺ and V δ 2⁺ T cells are associated with overall survival of melanoma patients treated with ipilimumab. *Eur. J. Cancer*, 2016, Vol. 64, pp. 116-126.
28. Wu D., Wu P., Qiu F., Wei Q. and Huang J. Human $\gamma\delta$ T-cell subsets and their involvement in tumor immunity. *Cell Mol. Immunol.*, 2017, Vol. 14, pp. 245-253.
29. Wu D., Wu P., Wu X., Ye J., Wang Z., Zhao S., Ni C., Hu G., Xu J., Han Y., Zhang T., Qiu F., Yan J., Huang J. Ex vivo expanded human circulating Vdelta1 gamma delta T cells exhibit favorable therapeutic potential for colon cancer. *Oncoimmunology*, 2015, Vol. 4, no. 3, e992749. doi: 10.4161/2162402X.2014.992749.
30. Yazdanifar M., Barbarito G., Bertaina A., Airoidi I. $\gamma\delta$ T cells: the ideal tool for cancer immunotherapy. *Cells*, 2020. Vol. 9, no. 5, 1305. doi: 10.3390/cells90513055.
31. Yin Y., Mitson-Salazar A., Prussin C. Detection of intracellular cytokines by flow cytometry. *Curr. Protoc. Immunol.*, 2015, Vol. 110, pp. 6.24.1-6.24.18.
32. Zhao Y., Niu C., Cui J. Gamma-delta ($\gamma\delta$) T cells: friend or foe in cancer development? *J. Transl. Med.*, 2018, Vol. 16, no. 3, pp. 122-135.
33. Zou C., Zhao P., Xiao Z., Han X., Fu F. and Fu L. $\gamma\delta$ T cells in cancer immunotherapy. *Oncotarget*, 2017, Vol. 8, pp. 8900-8909.

Авторы:

Нижегородова Д.Б. — к.б.н., доцент, ведущий научный сотрудник отдела иммунологии и биомедицинских технологий научно-исследовательской лаборатории, Белорусская медицинская академия последипломного образования; доцент кафедры иммунологии, Международный государственный экологический институт имени А.Д. Сахарова Белорусского государственного университета, г. Минск, Республика Беларусь

Колядич Ж.В. — д.м.н., профессор, заведующая лабораторией онкопатологии центральной нервной системы с группой онкопатологии головы и шеи, Республиканский научно-практический центр онкологии и медицинской радиологии имени Н.Н. Александрова, Минский район, а/г Лесной, Республика Беларусь

Морозова Н.А. — аспирант, врач — онколог-хирург отделения опухолей головы и шеи, Республиканский научно-практический центр онкологии и медицинской радиологии имени Н.Н. Александрова, Минский район, а/г Лесной, Республика Беларусь

Зафранская М.М. — д.м.н., профессор, главный научный сотрудник отдела иммунологии и биомедицинских технологий научно-исследовательской лаборатории, Белорусская медицинская академия последипломного образования; заведующая кафедрой иммунологии, Международный государственный экологический институт имени А.Д. Сахарова Белорусского государственного университета, г. Минск, Республика Беларусь

Authors:

Nizheharodava D.B., PhD (Biology), Associate Professor, Leading Research Associate, Immunology and Biomedical Technologies Department of Central Research Laboratory, Belarusian Medical Academy of Postgraduate Education; Associate Professor, Immunology Department, International Sakharov Environmental Institute of Belarusian State University, Minsk, Republic of Belarus

Kolyadich J.V., PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Laboratory of Oncopathology of the Central Nervous System with a Group of Oncopathology of the Head and Neck, N. Alexandrov National Cancer Centre of Belarus, Minsk District, Republic of Belarus

Marozava N.A., Postgraduate student, Oncologist-Surgeon, Head and Neck Tumors Department, N. Alexandrov National Cancer Centre of Belarus, Minsk District, Republic of Belarus

Zafranskaya M.M., PhD, MD (Medicine), Professor, Chief Research Associate, Immunology and Biomedical Technologies Department of Central Research Laboratory, Belarusian Medical Academy of Postgraduate Education; Head, Immunology Department, International Sakharov Environmental Institute of Belarusian State University, Minsk, Republic of Belarus

Поступила 09.12.2022

Отправлена на доработку 23.01.2023

Принята к печати 20.02.2023

Received 09.12.2022

Revision received 23.01.2023

Accepted 20.02.2023

ЭКСПРЕССИЯ ИНГИБИТОРНЫХ РЕЦЕПТОРОВ Т-КЛЕТКАМИ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ У БЕРЕМЕННЫХ С ПРЕЭКЛАМПСИЕЙ

Сметаненко Е.А.¹, Хонина Н.А.¹, Леплина О.Ю.¹, Тихонова М.А.¹,
Баторов Е.В.¹, Пасман Н.М.², Черных Е.Р.¹

¹ ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии»,
г. Новосибирск, Россия

² ФГАОУ ВО «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет»,
г. Новосибирск, Россия

Резюме. Перестройка иммунной системы матери, направленная на ограничение иммунного ответа против фетальных антигенов, является условием успешной беременности и осуществляется с вовлечением различных механизмов (Th1/Th2-переключения, экспансии Treg, индукции анергии и апоптоза Т-лимфоцитов, развития Т-клеточного истощения), запуск которых осуществляется с участием ингибиторных рецепторов. Соответственно, экспрессия ингибиторных рецепторов на Т-клетках, включая молекулы PD-1, CTLA-4 и Tim-3, может отражать эффективность иммунной адаптации и ее нарушения при патологии беременности. Преэклампсия (ПЭ), патогенез которой связывают с ослаблением иммунологической толерантности, является грозным осложнением гестации. Соответственно, изменения в экспрессии ингибиторных рецепторов на Т-клетках могут являться биомаркерами патологической гестации и потенциальными терапевтическими мишенями. Целью работы явилось изучение экспрессии ингибиторных молекул на Т-клетках периферической крови при ПЭ. В исследование рекрутировали 29 беременных с ПЭ и 36 женщин с отсутствием гестационных осложнений во второй половине беременности. Беременные исследуемых групп были сопоставимы по срокам гестации, количеству беременностей и паритету родов. Контрольную группу составили 28 фертильных женщин, имеющих детей. Относительное содержание CD8⁺PD-1⁺, CD8⁺CTLA-4⁺, CD8⁺TIM-3⁺, CD8⁺PD-1⁺TIM-3⁺, CD4⁺PD-1⁺, CD4⁺CTLA-4⁺, CD4⁺TIM-3⁺, CD4⁺PD-1⁺TIM-3⁺Т-клеток крови оценивали методом проточной цитометрии. Показано, что неосложненная беременность ассоциирована с усилением экспрессии Т-клетками PD-1 и Tim-3, что проявляется возрастанием относительного содержания CD4⁺Tim-3⁺, CD8⁺PD-1⁺ и PD-1⁺Tim-3⁺Т-лимфоцитов. При ПЭ, напротив, отмечается снижение экспрессии Т-клетками PD-1 и Tim-3, в частности уменьшение доли CD4⁺Tim-3⁺ и CD8⁺PD-1⁺ клеток; отсутствие возрастания PD-1⁺Tim-3⁺ клеток (при сравнении с неосложненной гестацией) и увеличение CTLA-4⁺ клеток в популяции CD4⁺ лимфоцитов. Изменения экспрессии

Адрес для переписки:

Леплина Ольга Юрьевна
ФГБНУ «Научно-исследовательский институт
фундаментальной и клинической иммунологии»
630099, Россия, г. Новосибирск, ул. Ядринцевская, 14.
Тел.: 8 (383) 236-03-29.
Факс: 8 (383) 222-70-28.
E-mail: oleplina@mail.ru, ct_lab@mail.ru

Address for correspondence:

Olga Yu. Leplina
Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology
14 Yadrintsevskaya St
Novosibirsk
630099 Russian Federation
Phone: +7 (383) 236-03-29.
Fax: +7 (383) 222-70-28.
E-mail: oleplina@mail.ru, ct_lab@mail.ru

Образец цитирования:

Е.А. Сметаненко, Н.А. Хонина, О.Ю. Леплина,
М.А. Тихонова, Е.В. Баторов, Н.М. Пасман,
Е.Р. Черных «Экспрессия ингибиторных рецепторов
Т-клетками периферической крови у беременных с
преэклампсией» // Медицинская иммунология, 2023.
Т. 25, № 6. С. 1353-1362.
doi: 10.15789/1563-0625-EOI-2601

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

For citation:

E.A. Smetanenko, N.A. Khonina, O.Yu. Leplina,
M.A. Tikhonova, E.V. Batorov, N.M. Pasma, E.R. Chernykh
“Expression of inhibitory receptors on peripheral blood T cells
in pregnant women with preeclampsia”, *Medical Immunology
(Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2023, Vol. 25, no. 6,
pp. 1353-1362. doi: 10.15789/1563-0625-EOI-2601

© Smetanenko E.A. et al., 2023
The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License
DOI: 10.15789/1563-0625-EOI-2601

ингибиторных рецепторов ассоциированы с тяжестью ПЭ. Снижение CD4⁺Tim-3⁺ и CD8⁺PD-1⁺T-клеток наиболее характерно для пациенток с умеренной ПЭ, а возрастание CD4⁺CTLA-4 T-клеток для беременных с тяжелой ПЭ. Также продемонстрирована сопряженность изменений в экспрессии ингибиторных молекул и сроками манифестации ПЭ. Отличительной особенностью ранней ПЭ является снижение доли CD8⁺CTLA-4⁺ клеток и более выраженное возрастание CD4⁺CTLA-4⁺ клеток, а поздней ПЭ – уменьшение CD4⁺PD-1⁺ клеток и более выраженное снижение CD4⁺Tim-3⁺ клеток. Полученные результаты свидетельствуют об изменении экспрессии молекул CTLA-4, PD-1 и Tim-3 на T-клетках у беременных с ПЭ и сопряженности этих изменений с тяжестью и сроками манифестации ПЭ.

Ключевые слова: ингибиторные PD-1, TIM-3, CTLA-4 чек-поинт молекулы, T-клетки, беременность, преэклампсия

EXPRESSION OF INHIBITORY RECEPTORS ON PERIPHERAL BLOOD T CELLS IN PREGNANT WOMEN WITH PREECLAMPSIA

Smetanenko E.A.^a, Khonina N.A.^a, Leplina O.Yu.^a, Tikhonova M.A.^a, Batorov E.V.^a, Paskan N.M.^b, Chernykh E.R.^a

^a *Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation*

^b *Novosibirsk National Research State University, Novosibirsk, Russian Federation*

Abstract. Maternal adaptation of the immune system aimed at limiting the immune response to fetal antigens is a necessary condition for a successful pregnancy. It involves various mechanisms (Th1/Th2 switching, Treg expansion, induction of anergy and apoptosis of T lymphocytes, development of T cell depletion) that are induced through the ligation of inhibitory receptors. Accordingly, the expression of inhibitory receptors on T cells, including PD-1, CTLA-4, and Tim-3 molecules, may reflect the effectiveness of immune adaptation and its impairment in pregnancy pathology. Preeclampsia (PE), the pathogenesis of which is associated with the impairments of immunological tolerance is a major complication of pregnancy. Accordingly, changes in the expression of inhibitory receptors on T cells may be biomarkers of abnormal gestation and potential therapeutic targets. The aim of this work was to study the expression of inhibitory molecules on peripheral blood T cells in women with PE. The study recruited 29 pregnant women with PE and 36 women with uncomplicated pregnancies in the second half of pregnancy. Pregnant women of the study groups were comparable in terms of gestational age, number of pregnancies and parity of childbirth. The control group consisted of 28 fertile women with children. Relative content of CD8⁺PD-1⁺, CD8⁺CTLA-4⁺, CD8⁺TIM-3⁺, CD8⁺PD-1⁺TIM-3⁺, CD4⁺PD-1⁺, CD4⁺CTLA-4⁺, CD4⁺TIM-3⁺, CD4⁺PD-1⁺TIM-3⁺T cells in blood were analyzed by flow cytometry. It has been shown that uncomplicated pregnancy is associated with increased expression of PD-1 and Tim-3 T cells, which is manifested by an increase in the relative content of CD4⁺Tim-3⁺, CD8⁺PD-1⁺ and PD-1⁺Tim-3⁺T lymphocytes. In PE, on the contrary, there is a reduction in the expression of PD-1 and Tim-3 by T cells, in particular, a decrease in the proportion of CD4⁺Tim-3⁺ and CD8⁺PD-1⁺ cells; the absence of elevated levels in PD-1⁺Tim-3⁺ cells (compared to uncomplicated gestation) and an increase in CTLA-4⁺ cells within CD4⁺ lymphocytes. Changes in the expression of inhibitory receptors are associated with the severity of PE. A decrease in CD4⁺Tim-3⁺ and CD8⁺PD-1⁺T cells is most typical for patients with moderate PE, and an increase in CD4⁺CTLA-4⁺T cells for pregnant women with severe PE. The relationship between changes in the expression of inhibitory molecules and the onset of PE has also been demonstrated. A distinctive feature of early PE is a decrease in the proportion of CD8⁺CTLA-4⁺ cells and a more pronounced increase in CD4⁺CTLA-4⁺ cells, while late PE is associated with a decrease in CD4⁺PD-1⁺ cells and a more pronounced decrease in CD4⁺Tim-3⁺ cells. The results obtained indicate a changes in the expression of CTLA-4, PD-1 and Tim-3 molecules on circulating T cells in pregnant women with PE and the association of these changes with the severity and the onset of PE manifestation.

Keywords: inhibitory PD-1, TIM-3, CTLA-4 checkpoint molecules, T cells, pregnancy, preeclampsia

Введение

Успешное вынашивание полуаллогенного плода требует адаптации иммунной системы матери, которая направлена на ограничение иммунного ответа против фетальных антигенов (при сохранении способности распознавать и уничтожать инфекционные патогены) и осуществляется с вовлечением различных механизмов — Th1/Th2 переключения, экспансии регуляторных Т-клеток (Treg), индукции анергии и апоптоза Т-лимфоцитов, развития Т-клеточного истощения [1]. Важнейшую роль в запуске указанных механизмов отводится ингибиторным рецепторам, которые представляют костимуляторные молекулы, проводящие сигналы негативной регуляции [12, 17]. Наиболее хорошо изученными ингибиторными рецепторами на Т-клетках являются молекулы PD-1 (молекула программированной клеточной смерти — 1, CD279), CTLA-4 (ассоциированный с цитотоксическими Т-лимфоцитами антиген 4, CD152) и Tim-3 (Т-клеточный иммуноглобулин муцин 3, CD366). Активация указанных рецепторов на эффекторных Т-лимфоцитах вызывает подавление пролиферации, продукции Th1- и Th17-цитокинов, цитотоксической активности и выживаемости лимфоцитов [14]. Повышенная экспрессия и особенно коэкспрессия ингибиторных рецепторов на этапе формирования Т-клеток памяти отражает также дисфункциональное состояние Т-лимфоцитов (Т-клеточное истощение), которое является еще одним механизмом ограничения эффекторных функций Т-клеток [18, 26]. Кроме того, связывание этих рецепторов с лигандами на Treg приводит к усилению пролиферации и супрессорной активности последних [31].

Участие ингибиторных рецепторов в иммунной перестройке при беременности подтверждается данными о повышенной экспрессии и коэкспрессии CTLA-4, PD-1 и Tim-3 децидуальными Т-клетками при нормальной гестации [14], снижении экспрессии указанных молекул при привычном невынашивании [28], а также экспериментальными данными о прерывании аллогенной беременности у мышей при блокировании сигнальных путей с указанных рецепторов [30].

Следует отметить, что основное внимание при исследовании ингибиторных рецепторов уделено децидуальным Т-клеткам, поскольку взаимодействие иммунных клеток матери с фетальными антигенами происходит в первую очередь на границе мать-плод. Однако состояние толерантности должно поддерживаться не только на локальном, но и системном уровне, поскольку антигены трофобласта присутствуют в циркуляции и могут активировать периферические Т-клетки [21]. Соответственно, изменения в экспрессии ингиби-

торных рецепторов на циркулирующих Т-клетках могут являться маркерами иммунной адаптации, а при патологии — отражать нарушения иммунных взаимоотношений между матерью и плодом.

Особый интерес в этом плане представляет исследование экспрессии ингибиторных молекул на Т-клетках периферической крови у беременных с преэклампсией (ПЭ). ПЭ является наиболее грозным осложнением гестации, которое связывают со срывом иммунологической толерантности и активацией иммунной системы [25] и может быть обусловлено изменением экспрессии ингибиторных рецепторов. При этом, учитывая, что ПЭ развивается во второй половине беременности, когда забор децидуальной ткани представляет высокий риск для матери и плода, исследование периферических Т-клеток для скрининга беременных с отягощенным анамнезом представляется более предпочтительным.

Ранее нами было показано, что женщины с неосложненной гестацией характеризуются во второй половине беременности повышенной экспрессией PD-1 и Tim-3 на периферических Т-клетках по сравнению с фертильными небеременными [1]. При этом вопрос о том, как меняется экспрессия указанных молекул при ПЭ, остается открытым, поскольку данные на этот счет немногочисленны и противоречивы. Учитывая вышесказанное, настоящая работа была посвящена изучению экспрессии CTLA-4, PD-1 и TIM-3 на Т-клетках периферической крови у беременных с ПЭ.

Материалы и методы

Для проведения исследований были сформированы три группы. Основную группу составили беременные с преэклампсией (ПЭ), группу сравнения — беременные с неосложненной гестацией, контрольную группу — фертильные небеременные. Рекрутирование беременных в исследование проводилось из числа женщин, проходивших обследование в родильном доме ГБУЗ ГКБ № 1. Критериями отбора являлись возраст от 18 до 45 лет, срок гестации более 20 недель, однополая беременность и отсутствие признаков активной родовой деятельности во время обследования и забора крови. Диагноз ПЭ базировался на основании выявления клинических и лабораторных критериев ПЭ — повышенного систолического артериального давления (АД) > 140 мм рт. ст. и/или диастолического АД > 90 мм рт. ст. и протеинурии (> 0,3 г/л в суточной моче). Критерием тяжелой ПЭ являлось появление одного из нижеперечисленных признаков — систолическое артериальное давление выше 160 мм рт. ст. или диастолическое артериальное давление выше 110 мм рт. ст. при двух измере-

ниях, произведенных в течение 6 часов; протеинурия – более 5 г/сут; олигурия – менее 500 мл/сут; отеки III–IV степени; неврологические или зрительные нарушения; отек легких; цианоз; боли в эпигастрии или правом подреберье; нарушение работы печени (повышение активности АСТ, АЛТ более 70 МЕ/л); выраженная гипопропротеинемия менее 50 г/л; тромбоцитопения менее 100×10^9 /л; ухудшение состояния плода по данным кардиотокограммы. В контрольную группу отбирали сопоставимых по возрасту фертильных небеременных, у которых в анамнезе были беременности и роды. Иммунологическое исследование проводилось после получения письменного информированного добровольного согласия.

Экспрессию ингибиторных рецепторов (PD-1, CTLA-4, Tim-3) на Т-клетках исследовали цитофлюориметрически путем окрашивания клеток анти-CD4 (Рс), анти-CD8 (FITC), анти-CTLA-4 (PE-Cy5), анти-PD-1 (APC), анти-TIM-3 (PerCP/Cy5.5) и соответствующими контрольными изотип-специфическими моноклональными антителами (все антитела BD PharMingen). Относительное содержание и среднюю интенсивность флюоресценции (MIF) PD-1, CTLA-4, Tim-3 оценивали в гейтах CD4⁺ и CD8⁺Т-клеток, используя программное обеспечение CellQuest (BD Biosciences, США).

Статистическую обработку данных проводили с помощью пакета программ Statistica 6.0 (StatSoft) и GraphPadPrism 5 (GraphPadSoftware, Inc.). Для оценки значимости различий между двумя независимыми группами использовали U-критерий Манна–Уитни. Для выявления значимых различий в парных выборках использовали W-критерий Вилкоксона парных выборок. Для оценки корреляционных взаимосвязей использовали коэффициент корреляции Спирмена. Данные в тексте и в таблице представлены в виде медианы и интерквартильного диапазона. Различия считали статистически достоверными при уровне значимости $p < 0,05$.

Результаты

Характеристика пациенток

Группы с ПЭ и неосложненной гестацией были представлены соответственно 29 и 36 беременными (табл. 1). Пациентки этих групп были схожи по срокам гестации, gravidности, паритету родов и частоте встречаемости сопутствующей экстрагенитальной патологии. Относительное содержание беременных в возрасте 40 и более лет в обеих группах также не различалась. Умеренная форма ПЭ диагностировалась у 14 беременных, тяжелая – у 15 беременных. Пациентки указанных подгрупп не различались по анализируемым показателям. Ранняя манифестация ПЭ (< 34 не-

дель) отмечалась у 17 беременных, поздняя (≥ 34 недели) – в 12 случаях. Беременные с ранней и поздней ПЭ также не различались по возрасту, коморбидному статусу и количеству беременностей/родов. В контрольную группу вошли 28 небеременных в возрасте от 18 до 41 года, имеющих как минимум одни роды в анамнезе.

Оценка Т-клеток, экспрессирующих ингибиторные рецепторы (рис. 1), выявила усиление экспрессии Tim-3 и PD-1 на Т-клетках беременных по сравнению с фертильными небеременными, что проявлялось 5-кратным возрастанием Tim-3⁺ клеток в популяции CD4-лимфоцитов и более чем 2-кратным увеличением PD-1⁺ клеток в популяции CD8Т-лимфоцитов. В обеих субпопуляциях Т-лимфоцитов также отмечалось достоверное возрастание клеток, коэкспрессирующих PD-1 и Tim-3. Доля CD4⁺PD-1⁺Tim-3⁺ клеток у беременных в 5 раз, а CD8⁺PD-1⁺Tim-3⁺ клеток – в 2,3 раза превышала аналогичный показатель у небеременных. При этом содержание клеток, коэкспрессирующих PD-1⁺Tim-3⁺ молекулы, в популяции CD8⁺ лимфоцитов было достоверно выше, чем среди CD4⁺ клеток ($p_w = 0,005$).

По сравнению с неосложненной гестацией у беременных с ПЭ регистрировалось снижение экспрессии Tim-3 и PD-1. В частности, доля CD4⁺Tim-3⁺ и CD8⁺PD1⁺ клеток в группе с ПЭ была достоверно ниже, чем при неосложненной беременности. Причем, если относительное количество CD4⁺Tim-3⁺ клеток по сравнению с небеременными оставалось повышенным, то содержание CD8⁺PD1⁺ клеток соответствовало уровню небеременных. Другой особенностью ПЭ было отсутствие (характерного для неосложненной гестации) возрастания CD4⁺ и CD8⁺Т-клеток, коэкспрессирующих PD-1 и Tim-3. Вместе с тем у женщин с ПЭ отмечалось более высокое содержание CD4⁺CTLA4⁺ клеток.

Поскольку беременные с ПЭ в исследуемой группе различались по тяжести, следующий этап был посвящен исследованию возможной сопряженности между экспрессией ингибиторных рецепторов и тяжестью ПЭ (рис. 2А). Сравнительный анализ экспрессии ингибиторных молекул на Т-клетках беременных с умеренной и тяжелой формами ПЭ показал, что характерное для ПЭ снижение экспрессии PD-1 и Tim-3, в частности уменьшение доли CD4⁺Tim-3⁺, CD8⁺PD-1⁺ и CD4⁺PD-1⁺Tim-3⁺Т-клеток, было характерно именно для умеренной ПЭ, а у беременных с тяжелой ПЭ проявлялось в виде тенденции. В то же время возрастание CD4⁺CTLA-4 клеток было более выраженным при тяжелой ПЭ. При этом доля CD4⁺CTLA-4 клеток в группе с тяжелой ПЭ была достоверно выше, чем при умеренной ПЭ. Т. е.

ТАБЛИЦА 1. СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА БЕРЕМЕННЫХ С ПЭ И НЕОСЛОЖНЕННОЙ БЕРЕМЕННОСТЬЮ

TABLE 1. COMPARATIVE CHARACTERISTICS OF PREGNANT WOMEN WITH PE AND UNCOMPLICATED PREGNANCY

Группы Groups	Количество (n) Amount (n)	≥ 40 лет n (%) ≥ 40 years old n (%)	Срок гестации Gestational age	Количество беременностей Number of pregnancy	Паритет родов Childbirth parity	Экстра- генитальная патология n (%) Extragenital pathology n (%)
Неосложненная беременность Uncomplicated pregnancy	36	2 (6)	34 (31-37)	1 (1,0-2,5)	1 (1,0-1,5)	12 (33,3%)
Преэклампсия (ПЭ) Preeclampsia (PE)	29	4 (14)	33 (30-36)	2 (1-3)	1 (1,0-2,0)	14 (48,3%)
p		p_{ТКФ} = 0,48 p _{FET} = 0.48	p _U = 0,62	p _U = 0,19	p _U = 0,28	p_{ТКФ} = 0,33 p _{FET} = 0.33
Умеренная ПЭ Moderate PE	14	1 (7)	31 (30-38)	2,0 (2,0-3,0)	1,5 (1,0-2,0)	8 (42,9%)
Тяжелая ПЭ Heavy PE	15	3 (20)	30 (30-36)	1,5 (1,0-2,0)	1,0 (1,0-2,0)	8 (53,3%)
p			p _U = 0,37	p _U = 0,15	p _U = 0,4	p_{ТКФ} = 0,85 p _{FET} = 0.85
Ранняя ПЭ Early PE	17	3 (17)	30 (30-32)	2,0 (1,0-3,0)	1,0 (1,0-2,0)	8 (47%)
Поздняя ПЭ Late PE	12	1 (8)	37 (35-38)	1,5 (1,0-2,5)	1,0 (1,0-1,5)	6 (50%)
p			p _U = 0,0004	p_{ТКФ} = 0,81 p _{FET} = 0.81	p _U = 0,28	p_{ТКФ} = 0,83 p _{FET} = 0.83

Примечание. Данные представлены в виде медиан и интерквартильных диапазонов или частот (%). p – достоверность различий; U – критерий Манна–Уитни; ТКФ – точный критерий Фишера.

Note. Data are presented as medians and interquartile ranges or frequencies (%). p, significance of differences; U, Mann–Whitney test; TKF, Fisher's exact test.

характер изменений экспрессии ингибиторных рецепторов ассоциировался с тяжестью ПЭ.

Изменения в экспрессии ингибиторных рецепторов также ассоциировались со сроками манифестации ПЭ. При сравнении беременных в подгруппах с ранним и поздним дебютом ПЭ (рис. 2Б) достоверное снижение CD4⁺Tim-3⁺ клеток отмечалось только у беременных с поздней ПЭ. В силу этого содержание CD4⁺Tim-3⁺ клеток в группе с поздней ПЭ было достоверно ниже, чем в группе с ранней ПЭ. Характерное для ПЭ снижение CD8⁺PD-1⁺ клеток наблюдалось в обеих группах, но было более выражено у беременных с поздней ПЭ. В свою очередь, достоверное возрастание CD4⁺CTLA-4⁺ клеток выявлялось только при ранней ПЭ. Анализ экспрессии

ингибиторных рецепторов в группах с ранней и поздней ПЭ позволил также выявить ряд отличительных особенностей, которые не регистрировались в общей группе беременных с ПЭ. Так, особенностью ранней ПЭ являлось дополнительно снижение доли CD8⁺CTLA-4⁺ клеток, а поздней ПЭ – уменьшение CD4⁺PD-1⁺ клеток и более выраженное снижение CD4⁺Tim-3⁺ клеток.

Таким образом, наиболее выраженное снижение экспрессии молекул PD-1 и Tim-3 ассоциировано с поздней ПЭ, тогда как ранняя ПЭ была сопряжена в большей степени с разнонаправленным изменением экспрессии CTLA-4, в частности возрастанием CD4⁺CTLA-4⁺ и снижением CD8⁺CTLA-4⁺ клеток.

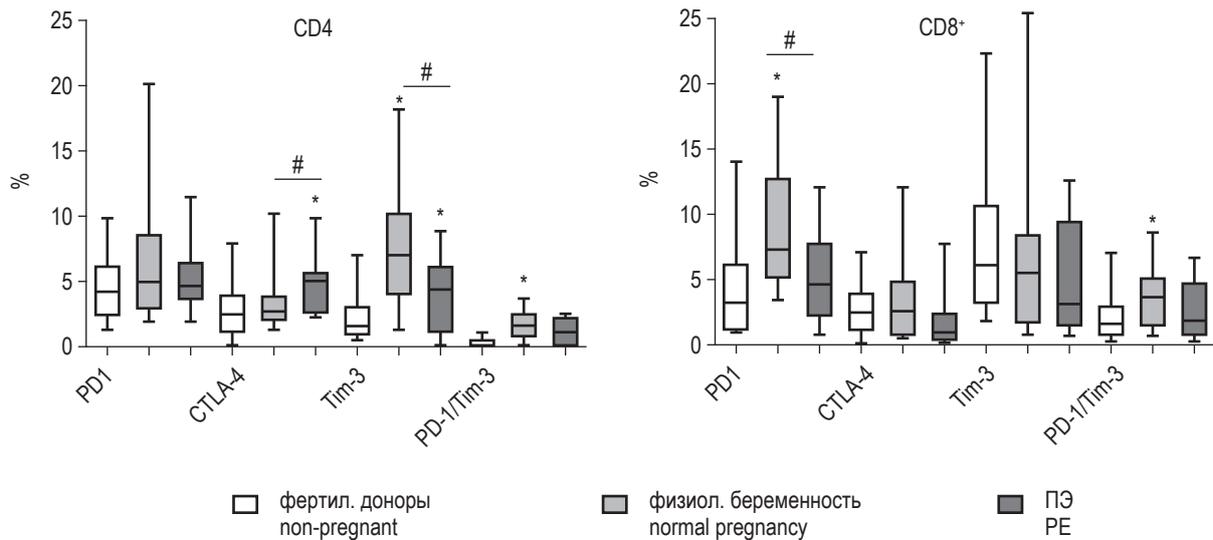


Рисунок 1. Экспрессия ингибиторных рецепторов на периферических Т-клетках беременных с неосложненной гестацией и ПЭ в сравнении с небеременными

Примечание. Представлено относительное содержание CD4⁺ и CD8⁺ лимфоцитов, несущих PD-1, CTLA-4 и Tim-3, в популяции мононуклеарных клеток периферической крови беременных с неосложненной гестацией и ПЭ в сравнении с фертильными небеременными (* – p < 0,05: достоверность различий с небеременными; # – p < 0,05: различия между неосложненной беременностью и ПЭ).

Figure 1. Expression of inhibitory receptors on peripheral blood T cells in pregnant women with uncomplicated pregnancies and PE compared with fertile non-pregnant

Note. The numbers of CD4⁺ and CD8⁺ lymphocytes expressing PD-1, CTLA-4 and Tim-3 and co-expressing PD-1 and Tim-3 are presented (*, p < 0.05: significant differences with non-pregnant women; #, p < 0.05: differences between uncomplicated gestation and PE).

Обсуждение

Полученные в целом результаты свидетельствуют, что беременные во второй половине неосложненной гестации характеризуются повышенным содержанием циркулирующих CD4⁺Tim-3⁺ и CD8⁺PD-1⁺Т-лимфоцитов, в том числе CD4⁺ и CD8⁺Т-клеток, коэкспрессирующих PD-1 и Tim-3 по сравнению с фертильными небеременными. Развитие ПЭ сопряжено с существенными изменениями в экспрессии ингибиторных рецепторов, в частности снижением CD4⁺Tim-3⁺ и CD8⁺PD-1⁺ клеток и отсутствием характерного для неосложненной гестации возрастания PD-1⁺Tim-3⁺Т-клеток в сочетании с увеличением CTLA-4-экспрессирующих CD4⁺ клеток. При этом характер изменений в экспрессии ингибиторных рецепторов сопряжен с тяжестью и сроками манифестации ПЭ. Так, умеренная ПЭ в большей степени ассоциирована со снижением экспрессии PD-1 и Tim-3, а тяжелая ПЭ – с возрастанием экспрессии CTLA-4 (в популяции CD4⁺ клеток). Также показано, что снижение экспрессии PD-1 и Tim-3, особенно в популяции CD4⁺Т-клеток, наиболее характерно для поздней манифестации ПЭ, тогда как изменения в экспрессии CTLA-4 – для ранней ПЭ.

Интерес к изучению экспрессии ингибиторных рецепторов на Т-клетках при беременности обусловлен тем фактом, что указанные молекулы вовлечены в регуляцию баланса Th1/Th2 и Th17/Treg клеток, т. е. опосредование механизмов иммунной адаптации [24]. Поскольку патогенез ПЭ связывают с ослаблением иммунологической толерантности [24], различные ингибиторные рецепторы на Т-клетках могут являться биомаркерами патологической гестации и потенциальными терапевтическими мишенями. Действительно, при нормальной беременности Т-клетки децидуальной ткани характеризуются повышенной экспрессией и коэкспрессией молекул PD-1 и Tim-3, что ассоциировано с Th2-фенотипом [29]. Причем активация PD-1/PD-L1 сигнального пути в исследованиях *in vitro* приводит к угнетению продукции Th1-цитокинов [22]. В свою очередь, повышенная экспрессия ингибиторных рецепторов на децидуальных CD8⁺Т-клетках ассоциирована с их более низким цитотоксическим потенциалом [15, 30], что может быть обусловлено подавлением цитотоксической активности CD8⁺Т-клеток при взаимодействии Tim-3⁺ и PD-1 с соответствующими лигандами [10, 11].

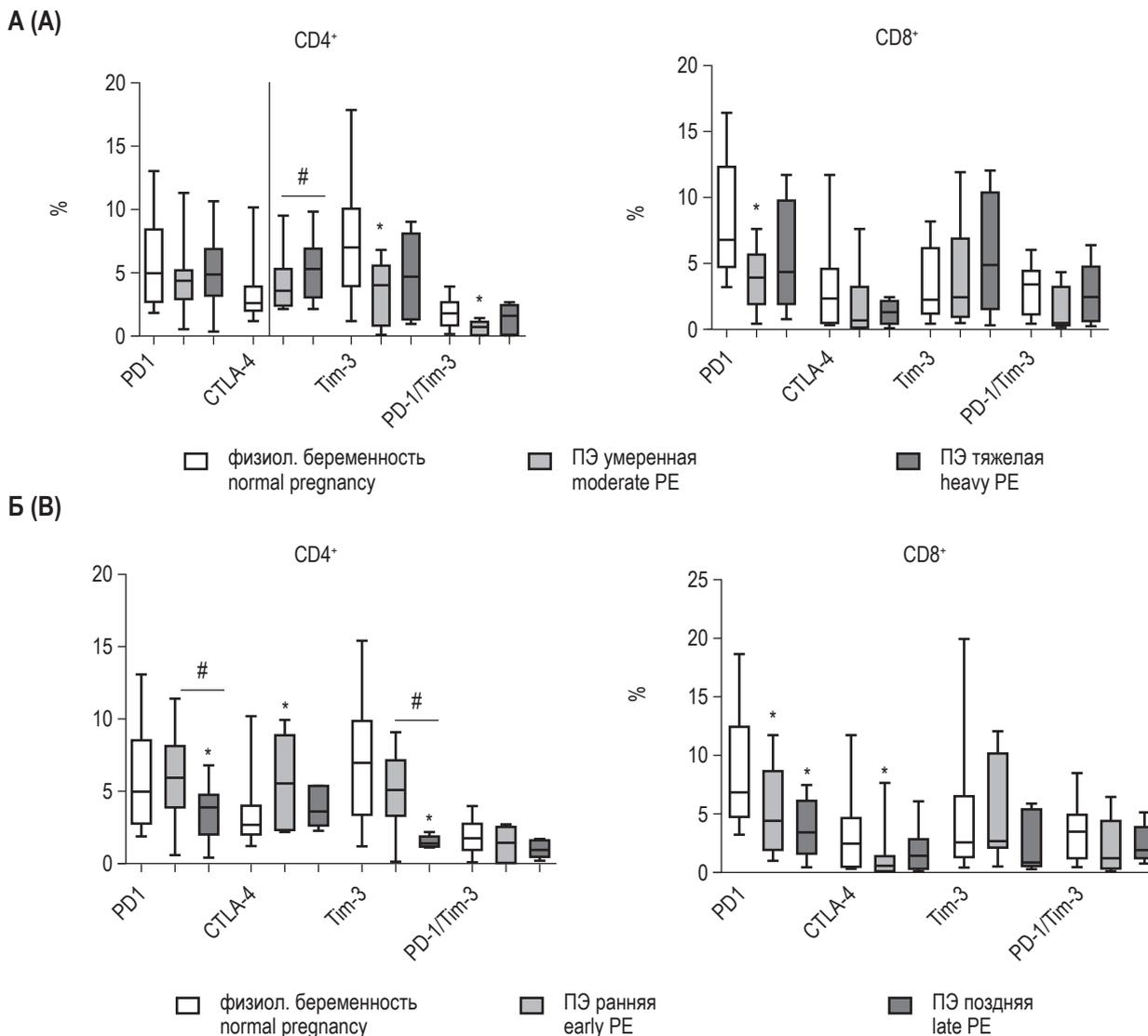


Рисунок 2. Экспрессия ингибиторных рецепторов на периферических T-клетках у беременных с различной тяжестью и сроками манифестации ПЭ

Примечание. А – экспрессия ингибиторных рецепторов у пациенток с умеренной и тяжелой ПЭ (* – $p < 0,05$: различия с неосложненной беременностью; # – $p < 0,05$: между группами с умеренной и тяжелой ПЭ). Б – экспрессия ингибиторных рецепторов у пациенток с ранней и поздней ПЭ (* – $p < 0,05$: различия с неосложненной беременностью; # – $p < 0,05$: между группами с ранней и поздней ПЭ).

Figure 2. Expression of inhibitory receptors on peripheral T cells in pregnant women with different severity and onset of PE
Note. A, Expression of inhibitory receptors in patients with moderate and severe PE (*, $p < 0.05$: differences with uncomplicated pregnancy; #, $p < 0.05$: differences between groups with moderate and severe PE). B, Expression of inhibitory receptors in patients with early and late PE (*, $p < 0.05$: differences with uncomplicated pregnancy; #, $p < 0.05$: differences between groups with early and late PE).

Сведения об экспрессии ингибиторных рецепторов периферическими T-клетками представлены единичными сообщениями, согласно которым авторы не выявили возрастания Tim-3⁺ и PD-1⁺T-клеток при нормальной беременности [9, 11, 32]. Расхождения с нашими результатами могут быть связаны с различиями анализируемых когорт, а также образцов клеток, в частности предварительной криоконсервацией клеток в зарубежных исследованиях.

Относительно экспрессии ингибиторных рецепторов T-клетками беременных с ПЭ, Wang S. и соавт. недавно описали снижение экспрессии Tim-3 на децидуальных и периферических CD8⁺T-лимфоцитах [27]. Данные о функциональной активности таких CD8⁺Tim-3⁺ клеток неоднозначны. С одной стороны показано, что децидуальные CD8⁺Tim-3⁺T-клетки характеризуются высокой секрецией IL-4 и IL-10, а блокирование Tim-3 сигнального пути подавляет продукцию противовоспалительных цитокинов и усиливает продук-

цию $IFN\gamma$ [7], с другой – что $CD8^+Tim-3^+$ клетки беременных с ПЭ отличаются более высоким цитотоксическим потенциалом по сравнению с $CD8^+Tim-3^-T$ -клетками, а также с $CD8^+Tim-3^+T$ -лимфоцитами беременных с неосложненной гестацией [13]. Полученные нами результаты также выявили снижение $CD8^+Tim-3^+$ клеток, однако в виде тенденции и преимущественно у беременных с поздней ПЭ. В то же время нами впервые показано снижение $CD4^+Tim-3^-$ клеток у беременных с ПЭ. Поскольку $Tim-3$ играет важную роль в негативной регуляции $Th1$ и $Th17$ [4] и экспрессия $Tim-3$ дифференцированными $Th1$ клетками необходима для подавления реакции отторжения аллотрансплантата [8], обнаруженное нами уменьшение $CD4^+Tim-3^+$ клеток может косвенно указывать на смещение баланса в сторону доминирования провоспалительных субпопуляций T -хелперных клеток.

Данные литературы об особенностях экспрессии $PD-1$ на T -клетках беременных с ПЭ также малочисленны и неоднозначны. Meggyes M. и соавт. выявили возрастание относительного количества децидуальных $CD8^+PD-1^+T$ -клеток с повышенным цитотоксическим потенциалом при ранней ПЭ (в сравнении с неосложненной беременностью), что позволило сделать заключение о несостоятельности $PD-1/PD-L1$ сигнального пути как механизма ингибции T -клеток при ПЭ [14]. Напротив, Morita K. и соавт. описали снижение экспрессии $PD-1$ на антигенспецифических децидуальных эффекторных T -клетках памяти [15]. Снижение экспрессии $PD-1$ может быть связано с отщеплением мембранной формы рецептора [6], способного оказывать стимулирующий эффект на T -клетки через блокирование $PD-L1:PD-1$ и $PD-L2:PD-1$ сигнальных путей [20].

Полученные нами данные в целом согласуются с результатами Morita K. и при этом впервые демонстрируют уменьшение $CD8^+PD-1^+$ клеток в периферической крови. Учитывая, что аналогичные изменения регистрируются при активации иммунной системы у беременных с воспалением плаценты или в родах [18], можно предположить, что снижение $CD8^+PD-1^+$ клеток в периферической крови является отражением преодоления T -клеточного истощения и активации иммунной системы.

Снижение $PD-1^+$ клеток в нашем исследовании наблюдалось не только в популяции $CD8^+$, но и $CD4^+$ лимфоцитов (в подгруппе с поздней ПЭ), что в целом согласуется с данными Tian M. и соавт., которые описали снижение экспрессии $PD-1$ в субпопуляции $Th17$ и впервые связали нарушение $PD-1/PD-L1$ сигнального пути в периферических $CD4^+$ клетках беременных с ПЭ с дисбалансом $Treg/Th17$ [23]. Учитывая, что активация $PD-1$ на $CD4^+$ -клетках способствует

$Th2$ переключению [8], уменьшение $CD4^+PD-1^+$ клеток у беременных с ПЭ может также predisполагать к активации $Th1$ ответа.

Наряду со снижением экспрессии $PD-1$ и $Tim-3$ популяция $CD4^+$ -лимфоцитов у беременных с ПЭ отличалась повышенной экспрессией $CTLA-4$. Разнонаправленные изменения в экспрессии разных ингибиторных рецепторов в этом случае могут объясняться гетерогенностью $CD4^+$ -клеток (включающих различные субпопуляции T -хелперов и $Treg$) и наиболее высокой экспрессией $CTLA-4$ на $Treg$. Полученные данные согласуются с результатами Voij R. и соавт., которые выявили возрастание $CTLA-4^+Treg$ при ранней и тяжелой ПЭ [5] и позволяют предположить, что увеличение $CD4^+CTLA-4$ клеток обусловлено субпопуляцией $Treg$.

Важным результатом настоящего исследования является обнаруженная сопряженность между характером изменений в экспрессии ингибиторных рецепторов и тяжестью/сроками манифестации ПЭ. Согласно данным литературы наибольшее возрастание провоспалительных цитокинов наблюдается у беременных с умеренной тяжестью ПЭ [7]. Уменьшение $CD4^+Tim-3^+$ и $CD8^+PD-1^+T$ -клеток именно у этой категории пациенток косвенно подтверждает предположение о том, что снижение экспрессии $Tim-3$ и $PD-1$ на T -клетках при ПЭ сопряжено со смещением баланса в сторону доминирования провоспалительной активности.

Результаты настоящего исследования также показали, что периферические T -клетки беременных с ранним и поздним дебютом ПЭ различаются по экспрессии ингибиторных рецепторов. Так, если при ранней ПЭ выявляются разнонаправленные изменения в экспрессии $CTLA-4$ (возрастание $CTLA-4^+CD4^+$ и снижение $CTLA-4^+CD8^+$ клеток), то при поздней ПЭ – снижение экспрессии $PD-1$ и $Tim-3$ (особенно в субпопуляции $CD4^+$ клеток). Согласно данным литературы, считается, что ранняя ПЭ ассоциирована с более выраженной активацией врожденного иммунитета [3] и дисфункциями регуляторных T -клеток [16], а поздняя – с нарушениями метаболизма, включая ожирение и диабет [19]. Полученные нами результаты свидетельствуют, что обе формы ПЭ сопряжены с изменениями экспрессии ингибиторных молекул на T -клетках, причем различия в характере изменений указанных молекул при ранней и поздней ПЭ могут являться аргументом в пользу иммунопатогенетической разнородности указанных форм ПЭ.

Заключение

В отличие от неосложненной беременности, ассоциированной с усилением экспрессии $PD-1$

и Tim-3 на периферических Т-клетках, ПЭ характеризуются сниженной экспрессией указанных молекул в субпопуляциях CD4⁺ и CD8⁺Т-лимфоцитов в сочетании с усилением экспрессии CTLA-4 в субпопуляции CD4⁺ Т-клеток. При этом выявленные особенности в экспрессии указанных ингибиторных рецепторов в зависимости от тяжести и сроков манифестации ПЭ свидетельствуют о патогенетической значимости указанных молекул в развитии ПЭ.

Список литературы / References

1. Сметаненко Е.А., Хонина Н.А., Леплина О.Ю., Тихонова М.А., Баторов Е.В., Пасман Н.М., Черных Е.Р. Экспрессия ингибиторных рецепторов PD-1, CTLA-4 и Tim-3 периферическими Т-клетками при беременности // Бюллетень сибирской медицины, 2022. Т. 21, № 3. С. 87-96. [Smetanenko E.A., Khonina N.A., Leplina O.Yu., Tikhonova M.A., Batorov E.V., Pasma N.M., Chernykh E.R. Expression of inhibitory receptors PD-1, CTLA-4 and Tim-3 by peripheral T cells during pregnancy. *Byulleten sibirskoy meditsiny = Bulletin of Siberian Medicine*, 2022, Vol. 21, no. 3, pp. 87-96. (In Russ.)]
2. Abu-Raya B., Michalski C., Sadarangani M., Lavoie P.M. Maternal immunological adaptation during normal pregnancy. *Front. Immunol.*, 2020, Vol. 11, 575197. doi: 10.3389/fimmu.2020.575197.
3. Aneman I., Pienaar D., Suvakov S., Simic T.P., Garovic V.D., McClements L. Mechanisms of key innate immune cells in early- and late-onset preeclampsia. *Front. Immunol.*, 2020, Vol. 11, 1864. doi: 10.3389/fimmu.2020.01864.
4. Banerjee H., Kane L.P. Immune regulation by Tim-3. *F1000Res.*, 2018, Vol. 7, 316. doi: 10.12688/f1000research.13446.1.
5. Boij R., Mjdsberg J., Svensson-Arvelund J., Hjorth M., Berg G., Matthiesen L., Jenmalm M.C., Ernerudh J. Regulatory T-cell subpopulations in severe or early-onset preeclampsia. *Am J Reprod. Immunol.*, 2015, Vol. 74, no. 4, pp. 368-378.
6. Gu Y., Morgan J., Lewis D.F., Cooper D.B., McCathran C.E., Wang Y. Maternal soluble PD-1 levels are significantly increased in women with preeclampsia. *Am. J. Reprod. Immunol.*, 2020, Vol. 83, no. 1 e13193. doi: 10.1111/aji.13193.
7. Daneva A.M., Hadhi-Lega M., Stefanovic M. Correlation of the system of cytokines in moderate and severe preeclampsia. *Clin. Exp. Obstet. Gynecol.*, 2016, Vol. 43, no. 2, pp. 220-224.
8. Hu X.H., Tang M.X., Mor G., Liao A.H. Tim-3: Expression on immune cells and roles at the maternal-fetal interface. *J. Reprod. Immunol.*, 2016, Vol. 18, pp. 92-99.
9. Meggyes M., Nagy D.U., Szereday L. Investigation of the PD-1 and PD-L1 immune checkpoint molecules throughout healthy human pregnancy and in nonpregnant women. *J. Clin. Med.*, 2020, Vol. 9, no. 8, 2536. doi: 10.3390/jcm9082536.
10. Meggyes M., Miko E., Lajko A., Csiszar B., Sandor B., Matrai P., Tamas P., Szereday L. Involvement of the PD-1/PD-L1 co-inhibitory pathway in the Pathogenesis of the Inflammatory Stage of Early-Onset Preeclampsia. *Int. J. Mol. Sci.*, 2019, Vol. 20, no. 3, 583. doi:10.3390/ijms20030583.
11. Meggyes M., Miko E., Polgar B., Bogar B., Farkas B., Illes Z., Szereday L. Peripheral blood TIM-3 Positive NK and CD8⁺ T cells throughout pregnancy: TIM-3/Galectin-9 interaction and its possible role during pregnancy. *PLoS One*, 2014, Vol. 9, no. 3, e92371. doi:10.1371/journal.pone.0092371.
12. Meggyes M., Miko E., Szigeti B., Farkas N., Szereday L. The importance of the PD-1/PD-L1 pathway at the maternal-fetal interface. *BMC Pregnancy Childbirth*, 2019, Vol. 19, no. 1, 74. doi: 10.1186/s12884-019-2218-6.
13. Miko E., Meggyes M., Bogar B., Schmitz N., Barakonyi A., Varnagy A., Farkas B., Tamas P., Bodis J., Szekeres-Bartho J., Illes Z., Szereday L. Involvement of Galectin-9/TIM-3 pathway in the systemic inflammatory response in early-onset preeclampsia. *PLoS One*, 2013, Vol. 8, no. 8, e71811. doi: 10.1371/journal.pone.0071811.
14. Miko E., Meggyes M., Doba K., Barakonyi A., Szereday L. Immune checkpoint molecules in reproductive immunology. *Front. Immunol.*, 2019, Vol. 18, no. 10, 846. doi: 10.3389/fimmu.2019.00846.
15. Morita K., Tsuda S., Kobayashi E., Hamana H., Tsuda K., Shima T., Nakashima A., Ushijima A., Kishi H., Saito S. Analysis of TCR repertoire and PD-1 expression in decidual and peripheral CD8(+) T cells reveals distinct immune mechanisms in miscarriage and preeclampsia. *Front. Immunol.*, 2020, Vol. 11, 1082. doi: 10.3389/fimmu.2020.01082.
16. Sasaki Y., Darmochwal-Kolarz D., Suzuki D., Sakai M., Ito M., Shima T. Proportion of peripheral blood and decidual Cd4(+) CD25(bright) regulatory T Cells in pre-eclampsia. *Clin. Exp. Immunol.*, 2007, Vol. 149, no. 1, pp. 139-145.
17. Schnell A., Bod L., Madi A., Kuchroo V.K. The yin and yang of co-inhibitory receptors: toward anti-tumor immunity without autoimmunity. *Cell Res.*, 2020, Vol. 30, no. 4, pp. 285-299.
18. Slutsky R., Romero R., Xu Y., Galaz J., Miller D., Done B., Tarca A.L., Gregor S., Hassan S.S., Leng Y., Gomez-Lopez N. Exhausted and senescent T cells at the maternal-fetal interface in preterm and term labor. *J. Immunol. Res.*, 2019, Vol. 2019, 3128010. doi: 10.1155/2019/3128010.
19. Raymond D., Peterson E. A critical review of early-onset and late-onset preeclampsia. *Obstet. Gynecol. Surv.*, 2011, Vol. 66, no. 8, pp. 497-506.
20. Song M.Y., Park S.H., Nam H.J., Choi D.H., Sung Y.C. Enhancement of vaccine-induced primary and memory CD8(+) T-cell responses by soluble PD-1. *J. Immunother.*, 2011, Vol. 34, no. 3, pp. 297-306.

21. Taglauer E.S., Adams Waldorf K.M., Petroff M.G. The hidden maternal-fetal interface: events involving the lymphoid organs in maternal-fetal tolerance. *Int. J. Dev. Biol.*, 2010, Vol. 54, no. 2-3, pp. 421-430.
22. Taglauer E.S., Trikhacheva A.S., Slusser J.G., Petroff M.G. Expression and function of PD CD1 at the human maternal-fetal interface. *Biol. Reprod.*, 2008, Vol. 79, no. 3, pp. 562-569.
23. Tian M., Zhang Y., Liu Z., Sun G., Mor G., Liao A. The PD-1/PD-L1 inhibitory pathway is altered in pre-eclampsia and regulates T cell responses in pre-eclamptic rats. *Sci Rep.*, 2016, Vol. 6, 27683. doi:10.1038/srep27683
24. Toldi G., Rigy J., Orbán C., Tamássy Z., Bajnok A., Shima T., Saito S., Molvarec A. Prevalence of regulatory T-cell subtypes in preeclampsia. *Am. J. Reprod. Immunol.*, 2015, Vol. 74, no. 2, pp. 110-115.
25. Valencia-Ortega J., Saucedo R., Peña-Cano M.I., Hernández-Valencia M., Cruz-Durán J.G. Immune tolerance at the maternal-placental interface in healthy pregnancy and pre-eclampsia. *J. Obstet. Gynaecol. Res.*, 2020, Vol. 46, no. 7, pp. 1067-1076.
26. Verdon D.J., Mulazzani M., Jenkins M.R. Cellular and molecular mechanisms of CD8⁺ T cell differentiation, dysfunction and exhaustion. *Int. J. Mol. Sci.* 2020, Vol. 21, no. 19, 7357. doi: 10.3390/ijms 21197357
27. Wang S., Chen C., Sun F., Li M., Du M., Li X., Zhang Y. Involvement of the Tim-3 Pathway in the Pathogenesis of Pre-Eclampsia. *Reprod. Sci.*, 2021, Vol. 28, no. 12, pp. 3331-3340.
28. Wang S., Sun F., Li M., Qian J., Chen C., Wang M., Zang X., Li D., Yu M., Du M. The appropriate frequency and function of decidual Tim-3⁺CTLA-4⁺CD8⁺ T cells are important in maintaining normal pregnancy. *Cell Death Dis.*, 2019, Vol. 10, no. 6, 407. doi:10.1038/s41419-019-1642-x.
29. Wang S., Zhu X., Xu Y., Zhang D., Li Y., Tao Y., Piao H., Li D., Du M. Programmed cell death-1 (PD-1) and T-cell immunoglobulin mucin-3 (Tim-3) regulate CD4⁺ T cells to induce Type 2 helper T cell (Th2) bias at the maternal-fetal interface. *Hum. Reprod.*, 2016, Vol. 31, no. 4, pp. 700-711.
30. Wang S.-C., Li Y.-H., Piao H.-L., Hong X.-W., Zhang D., Xu Y.-Y. PD-1 and Tim-3 pathways are associated with regulatory CD8⁺ T-cell function in decidua and maintenance of normal pregnancy. *Cell Death Dis.*, 2015, Vol. 6, no. 5, 1738. doi: 10.1038/cddis.2015.112.
31. Zhang Y.H., Sun H.X. Immune checkpoint molecules in pregnancy: Focus on regulatory T cells. *Eur. J. Immunol.*, 2020, Vol. 50, no. 2, pp.160-169.
32. Zhao Si-J., Muyayalo K.P., Jing Luo J., Huang D., Mor G., Liao A.H. Next generation of immune checkpoint molecules in maternal-fetal immunity. *Immunol. Rev.*, 2022, Vol. 308, no. 1, pp. 40-54.

Авторы:

Сметаненко Е.А. — аспирант ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

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

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

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

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

Пасман Н.М. — д.м.н., профессор, заведующая кафедрой акушерства и гинекологии медицинского факультета ФГАОУ ВО «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет», г. Новосибирск, Россия

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

Authors:

Smetanenکو E.A., Postgraduate Student, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

Khonina N.A., PhD, MD (Medicine), Leading Research Associate, Laboratory of Cellular Immunotherapy, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

Leplina O.Yu., PhD, MD (Medicine), Leading Research Associate, Laboratory of Cellular Immunotherapy, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

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

Batorov E.V., PhD (Medicine), Research Associate, Laboratory of Cellular Immunotherapy, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

Pasman N.M., PhD, MD (Medicine), Head, Department of Obstetrics and Gynecology of Institute of Medicine and Psychology, Novosibirsk National Research State University, Novosibirsk, Russian Federation

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

Поступила 01.11.2022
Принята к печати 16.02.2023

Received 01.11.2022
Accepted 16.02.2023

ИЗУЧЕНИЕ ИММУНОРЕГУЛЯТОРНОЙ ФУНКЦИИ НАТУРАЛЬНЫХ КИЛЛЕРОВ В ПРОЦЕССЕ ИНФЕКЦИИ, ВЫЗВАННОЙ ВИРУСОМ ПТИЧЬЕГО ГРИППА

Шатунова П.О.^{1, 2}, Гаврилова М.В.², Ртищев А.А.², Колыганова Т.И.^{1, 2},
Зайцева Т.А.¹, Маркушин С.Г.²

¹ ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова»
Министерства здравоохранения РФ (Сеченовский университет), Москва, Россия

² ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова», Москва,
Россия

Резюме. Вирус птичьего гриппа обладает большим пандемическим потенциалом не только среди животных, но и в человеческой популяции. Для успешной борьбы с данным вирусом важное значение приобретает изучение иммунного ответа против вируса гриппа птиц и, в частности, особенности Т-клеточного иммунитета. Известно, что в период раннего иммунного ответа, когда активации факторов адаптивного иммунитета еще не произошло, ключевую роль в борьбе с вирусом гриппа играют натуральные киллеры, которые обладают как цитотоксическими, так и иммунорегуляторными функциями. В данной работе изучается взаимодействие между натуральными киллерами и Т-хелперами в процессе борьбы с патогеном.

Цель исследования – изучение иммунорегуляторной функции натуральных киллеров у мышей линии BALB/c, инфицированных различными дозами вируса гриппа птиц.

В работе использовали штамм вируса птичьего гриппа серотипа H5N2 (A/duck/Pennsylvania/10218/1984), адаптированного к мышам. Определение титра вируса в легочной ткани мышей осуществлялось путем заражения 10-дневных куриных эмбрионов (SPF) легочными экстрактами в различных десятичных разведениях с последующей постановкой реакции агглютинации. Определение численности натуральных киллеров и Т-хелперов в селезеночной ткани мышей проводилось методом проточной цитометрии.

При низкой инфекционной дозе (2,5 ЭИД₅₀) наблюдалось повышение количества Т-хелперов в селезенке мышей, что свидетельствовало о клональной экспансии данной субпопуляции. При этом инфекционный процесс заканчивался полной элиминацией вируса в легких. При увеличении дозы вируса (25 ЭИД₅₀) также отмечалось увеличение субпопуляции Т-хелперов, но в легких продолжалось размножение вируса. При инфицировании высокой дозой вируса (250 ЭИД₅₀) наблюдалось снижение

Адрес для переписки:

Шатунова Полина Олеговна
ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный
медицинский университет имени И.М. Сеченова»
Министерства здравоохранения РФ
115088, Россия, Москва, ул. 1-я Дубровская, 15.
Тел.: 8 (910) 294-11-78.
E-mail: shatunova_p_o@staff.sechenov.ru

Address for correspondence:

Polina O. Shatunova
I. Sechenov First Moscow State Medical University
15 1st Dubrovskaya St
Moscow
115088 Russian Federation
Phone: +7 (910) 294-11-78.
E-mail: shatunova_p_o@staff.sechenov.ru

Образец цитирования:

П.О. Шатунова, М.В. Гаврилова, А.А. Ртищев,
Т.И. Колыганова, Т.А. Зайцева, С.Г. Маркушин
«Изучение иммунорегуляторной функции натуральных
киллеров в процессе инфекции, вызванной вирусом
птичьего гриппа» // Медицинская иммунология, 2023.
Т. 25, № 6. С. 1363-1370.
doi: 10.15789/1563-0625-IFO-2600

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

For citation:

P.O. Shatunova, M.V. Gavrilova, A.A. Rtishchev,
T.I. Kolyganova, T.A. Zaytseva, S.G. Markushin
“Immunoregulatory functions of natural killer cells in avian
influenza virus infection”, Medical Immunology (Russia)/
Meditsinskaya Immunologiya, 2023, Vol. 25, no. 6,
pp. 1363-1370.
doi: 10.15789/1563-0625-IFO-2600

© Shatunova P.O. et al., 2023
The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License
DOI: 10.15789/1563-0625-IFO-2600

количества относительно контрольной группы мышей. В легочной ткани отмечалась репликация вируса гриппа птиц на протяжении всего периода наблюдений.

Можно предположить, что снижение численности Т-хелперов при инфицировании высокой дозой вируса обусловлено иммунорегуляторной активностью натуральных киллеров, которые элиминируют «истощенные» Т-хелперы, формирующиеся в условиях повышенной антигенной стимуляции. Этот факт свидетельствует о важности иммунорегуляторной функции натуральных киллеров в сохранении баланса между адекватным уничтожением патогена и избыточным воспалением в легочной ткани в процессе инфекции, вызванной вирусом птичьего гриппа.

Ключевые слова: натуральные киллеры, Т-хелперы, Т-лимфоциты, иммунорегуляция, истощение Т-лимфоцитов, грипп, вирус гриппа птиц

IMMUNOREGULATORY FUNCTIONS OF NATURAL KILLER CELLS IN AVIAN INFLUENZA VIRUS INFECTION

Shatunova P.O.^{a, b}, Gavrilova M.V.^b, Rtishchev A.A.^b, Kolyganova T.I.^{a, b}, Zaytseva T.A.^a, Markushin S.G.^b

^a I. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russian Federation

^b I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation

Abstract. The avian influenza virus (AIV) has a great pandemic potential both in animals, and in human population. For effective struggle against this virus, it is important to study the immune response against AIV, and, in particular, the features of T cell immunity. At the period of early immune response, when the activation of adaptive immunity factors has not yet occurred, the natural killers, which have both cytotoxic and immunoregulatory functions, are known to play a key role in the fight against the influenza virus. In this study, we investigated the interaction between natural killers and T helpers in the process of antiviral response. The aim of this study was to study immunoregulatory functions of NK cells in BALB/c mice vaccinated with different doses of avian influenza virus.

We used a strain of mouse-adapted avian influenza virus (AIV) of the H5N2 serotype (A/duck/Pennsylvania/10218/1984). The determination of the virus titer in the mice lung tissue was performed by infecting 10-day-old chicken embryos (SPF) with lung extracts at various decimal dilutions, followed by the immune agglutination test. Quantitative determination of natural killers and T helpers (Th) in the mice spleen tissue was carried out by flow cytometry. The amount of Th cells in mice spleens increased at low infectious dose (2.5 EID₅₀) which is explained by active clonal expansion of this cell subpopulation. The infectious disease process ended upon complete virus elimination from the lungs. The amounts of Th cells were also increased in a group of mice infected with intermediate infectious dose (25 EID₅₀), however, being accompanied by virus replication in lungs. When the mice were infected with a high dose of the virus (250 EID₅₀), there was a decrease in the Th cells number *versus* control group of animals, whereas replication of AIV was noted throughout the entire observation period in the lung tissue.

The amounts of helper T cells at high doses of viral infection could be decreased due to activation of NK cells. The activated NK cells may then eliminate exhausted helper T cells. Thus, NK cells immunoregulatory function represents an important immunological factor which keeps balance between the pathogen destruction and excessive inflammation of the lung tissue affected by the avian influenza virus.

Keywords: natural killer cells, helper T cells, immunoregulation, T cell exhaustion, influenza, avian influenza virus

Исследование выполнено с использованием научного оборудования центра коллективного пользования НИИВС им. И.И. Мечникова – при финансовой поддержке проекта Российской Федерации в лице Минобрнауки России. Соглашение № 075-15-2021-676 от 28.07.2021.

Введение

Вирус гриппа птиц наносит большой ущерб экономике многих стран, вызывая вспышки птичьего гриппа в птицеводческих хозяйствах. В последние годы вирус многократно проникал в человеческую популяцию, вызывая заболева-

ния людей, сопровождающиеся летальным исходом [2]. Учитывая эти данные, не будет преувеличением сказать, что данный вирус обладает большим пандемическим потенциалом [9].

Естественно, что для успешной борьбы с данным вирусом важное значение приобретает изучение иммунного ответа против вируса гриппа птиц и, в частности, особенности Т-клеточного иммунитета [7]. Известно, что в период раннего иммунного ответа, когда активации факторов адаптивного иммунитета еще не произошло, важную роль в борьбе с вирусом гриппа играют натуральные киллеры, которые обладают как цитотоксическими, так и иммунорегуляторными функциями [5]. Было показано, что натуральные киллеры способны действовать в качестве регулятора адаптивного иммунного ответа при вирусных инфекциях [8]. В исследовании, проведенном на модели мышей, инфицированных вирусом лимфоцитарного хориоменингита [12], было выявлено три вектора (варианта) иммунной защиты от патогена в зависимости от дозы заражения. В данной работе мы попытались исследовать влияние иммунорегуляторной функции натуральных киллеров у мышей, инфицированных различными дозами вируса гриппа птиц, на исход адаптивного иммунного процесса.

Материалы и методы

Мыши

Экспериментальные животные – инбредные мыши линии BALB/c, самки массой 16–18 г, полученные из питомника «Андреевка» (Московская обл., Россия). Все эксперименты выполнены в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» (Приложение к приказу №755 Министерства Здравоохранения СССР от 12.08.1977 г.) и «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях» от 18 марта 1986 г. На проведение исследования получено разрешение этического комитета ФГБНУ НИИ ВС им. И.И. Мечникова.

Инфицирование мышей

Мыши были разделены на 4 испытываемые группы. Особей из первой группы инфицировали интраназально под легким эфирным наркозом вирусом с инфекционным титром 2,5 ЭИД₅₀/50 мкл (группа № 1). Мышей из второй группы инфицировали вирусом с титром 25 ЭИД₅₀/50 мкл (группа № 2). Мышам из третьей группы интраназально вводили 250 ЭИД₅₀/50 мкл вируса (группа № 3). Четвертая группа была контрольной, мышам интраназально вводили по 50 мкл физиологического раствора. Животных выводили из эксперимента в соответствии с Правилами лаборатор-

ной практики в Российской Федерации (GLP) от 1 апреля 2016 г. Учет результатов проводили на 3-й, 7-е и 14-е сутки.

Вирусы

В работе был использован штамм вируса птичьего гриппа A/duck/Pennsylvania/10218/1984 серотипа H5N2, адаптированный к мышам [10]. Вирус был получен из коллекции вирусов «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России.

Определение вирусной нагрузки в легких мышей

На 3-й, 7-й и 14-й день после интраназальной инфекции мышей усыпляли, взвешивали на лабораторных весах и извлекали легочную ткань. Из легочной ткани готовили 10%-ную суспензию в ступках с тертым стеклом. Титр вируса в легких определяли путем заражения 10-дневных куриных эмбрионов (SPF), полученных из питомника ФГБУ СГЦ «Загорское ЭПХ» ВНИТИП (г. Сергиев Посад, Московская область, Россия), легочными экстрактами в объеме 0,2 мл на эмбрион в различных десятичных разведениях. После 48-часовой инкубации при 37 °С аллантоисная жидкость использовалась для постановки реакции гемагглютинации.

Проточная цитометрия

В качестве источника лимфоцитов использовалась селезенка. Для извлечения клеток из селезеночной пульпы применялся пестиковый микробиологический гомогенизатор (Schuett Biotec, Германия). После получения пула лимфоцитов проводился подсчет клеток в камере Горяева в присутствии красителя трипанового синего. Для дальнейшей работы допускалась клеточная суспензия с содержанием живых клеток не менее 95%. Для выявления субпопуляции Т-хелперов мыши использовали антитела к CD3 (клон 17A2), меченные FITC, и CD4 (клон GK1.5), меченные PE (eBioscience™, США). Содержание НК-клеток мыши определяли при помощи антител к CD49b (клон DX5), меченные PE (Sony, США). 10⁶ клеток селезенки инкубировали с флуоресцентными антителами в PBS с 1% BSA 30 мин при +4 °С. После чего клетки отмывали PBS с 1% BSA и фиксировали 1% ПФА (Thermo Fisher Scientific, США) 30 мин при +4 °С. В качестве контроля использовали неокрашенные клетки селезенки. Проточную цитометрию проводили на Beckman Coulter EPICS XL; результаты анализировали с помощью SYSTEM II (Beckman Coulter, США).

Статистическая обработка данных

Полученные данные анализировались с помощью программного обеспечения OriginPro 9.1 (OriginLab Corporation). Результаты для каждой группы экспериментальных животных выражали как среднее S образца/S порога ± стандартное отклонение (σ). Для сравнения результатов, полученных при разных условиях эксперимента,

использовался критерий Манна–Уитни. Величина $p \leq 0,05$ рассматривалась как статистически значимая.

Результаты

Динамика изменения количества НК-клеток (CD3⁺CD49b⁺) в селезеночной ткани мышей, инфицированных различными дозами вируса гриппа птиц

Количество натуральных киллеров в селезенке мышей колебалось в пределах 5,5–6,2% (рис. 1). У мышей, инфицированных низкой дозой вируса (2,5 ЭИД₅₀), наблюдалось постепенное снижение числа натуральных киллеров на протяжении всего процесса наблюдения. На 3-й день после инфицирования мы наблюдали значительное падение (приблизительно на 2,3% по сравнению с контролем), на 7-й день количество НК-клеток равнялось 2,8% и на 14-й день после инфицирования достигло 1,8%.

У мышей, инфицированных средней (25 ЭИД₅₀) и высокой (250 ЭИД₅₀) дозой вируса, также наблюдалось снижение числа натуральных киллеров с 1-го по 3-й день после инфицирования до 2,8–3,4% (рис. 2, 3) с последующим подъемом между 3-м и 7-м днями наблюдения (до количества 4,8–5,6% у групп средней и высокой дозы соответственно), затем отмечалось снижение НК-клеток до количества 1,5–1,7% к 14-му дню после инфекции.

Динамика изменения количества Т-хелперов (CD3⁺CD4⁺) в селезеночной ткани мышей, инфицированных различными дозами вируса гриппа птиц

Количество Т-хелперов в селезеночной ткани мышей контрольной группы равнялось 18,7%. Как видно из рисунка 4, в группе мышей, инфицированных низкой дозой вируса (2,5 ЭИД₅₀), регистрировалось снижение численности Т-хелперов на 3-й день (16%), а затем наблюдалось увеличение количества Т-хелперов после 7-го

дня после инфекции относительно мышей из контрольной группы, что можно объяснить клональной экспансией данной субпопуляции. Количество Т-хелперов на 7-й день равнялось 18,8% (рис. 4). Далее наблюдалось повышение количества Т-хелперов на 5,3% к 14-му дню относительно 7-го дня (рис. 4).

На раннем этапе инфекции у мышей, инфицированных средней дозой вируса (рис. 5), наблюдалось резкое снижение количества Т-хелперов (на 10%), которое сменилось повышением с 3-го дня после начала инфекционного процесса и продолжалось до окончания наблюдения, достигая количества 25% клеток.

Другая картина динамики изменения числа Т-хелперов наблюдалась у мышей, инфицированных высокой инфекционной дозой вируса (рис. 6). Было отмечено формирование пика количества Т-хелперов к 3-му дню после начала инфекционного процесса (22%) с последующим резким снижением до значений, которые были ниже относительно контрольной группы (16,8%). К 14-му дню количество Т-хелперов повышалось до 18,6%.

Репликация вируса гриппа птиц в легких мышей, инфицированных различными дозами вируса гриппа птиц

Как видно из таблицы 1, при инфицировании мышей низкими инфекционными дозами штамма A/duck/Pennsylvania/10218/1984 (H5N2) наблюдается слабое размножение вируса в легких на 3-й день после начала инфекционного процесса. В последующие дни размножение вируса не регистрировалось.

При инфицировании мышей средними и высокими дозами вируса в легких наблюдалось слабое или умеренное размножение вируса птичьего гриппа на протяжении всего срока наблюдения (табл. 1).

ТАБЛИЦА 1. ВИРУСНАЯ НАГРУЗКА В ЛЕГКИХ МЫШЕЙ, $p \leq 0,05$

TABLE 1. VIRAL LOAD IN IN MICE LUNGS, $p \leq 0.05$

Группа Group	Вирусная нагрузка в легких мышей, ЭИД ₅₀ Viral load in mice lungs, EID ₅₀		
	3-й день после инфицирования 3 rd day after infection	7-й день после инфицирования 7 th day after infection	14-й день после инфицирования 14 th day after infection
Группа № 1 (2,5 ЭИД ₅₀) Group No. 1 (2,5 EID ₅₀)	10 ¹	< 10 ¹	< 10 ¹
Группа № 2 (25 ЭИД ₅₀) Group No. 2 (25 EID ₅₀)	4 × 10 ¹	3 × 10 ¹	3 × 10 ¹
Группа № 3 (250 ЭИД ₅₀) Group No. 3 (250 EID ₅₀)	1,5 × 10 ¹	10 ²	10 ²
Контрольная группа Control group	< 10 ¹	< 10 ¹	< 10 ¹

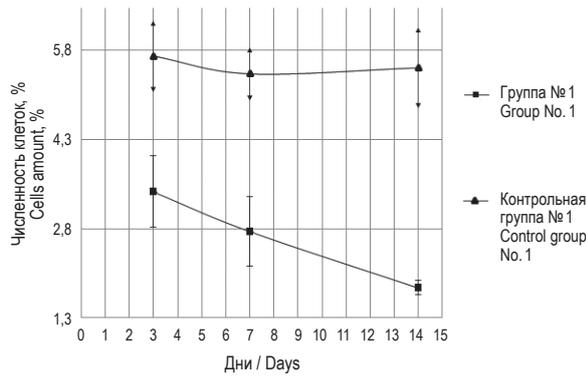


Рисунок 1. Изменение количества натуральных киллеров при низкой инфекционной дозе относительно контрольной группы, $p \leq 0,05$

Figure 1. Changes in the natural killer cells number at low infectious dose versus the control group, $p \leq 0.05$

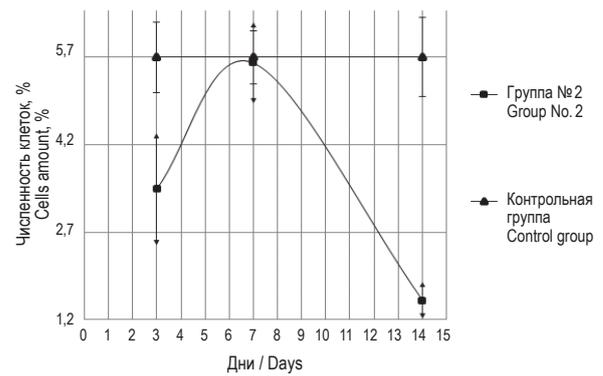


Рисунок 2. Изменение количества натуральных киллеров при средней инфекционной дозе относительно контрольной группы, $p \leq 0,05$

Figure 2. Changes in the natural killer cells number at medium infectious dose versus the control group, $p \leq 0.05$

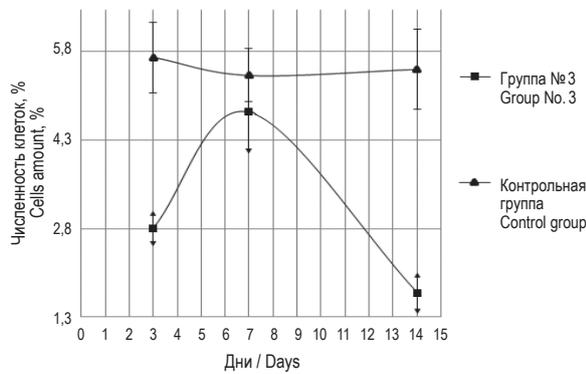


Рисунок 3. Изменение количества натуральных киллеров при высокой инфекционной дозе относительно контрольной группы, $p \leq 0,05$

Figure 3. Changes in the natural killer cells number at high infectious dose versus the control group, $p \leq 0.05$

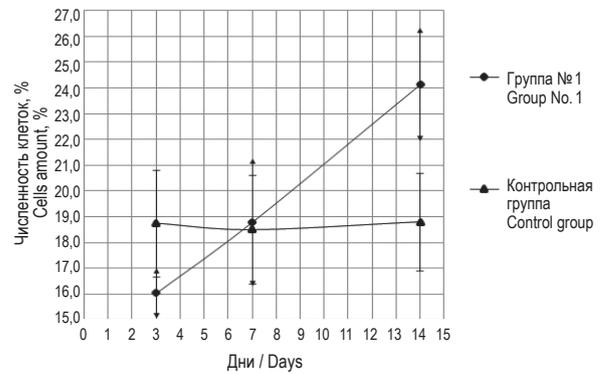


Рисунок 4. Изменение количества Т-хелперов при низкой инфекционной дозе относительно контрольной группы, $p \leq 0,05$

Figure 4. Changes in the Th cells number at low infectious dose versus the control group, $p \leq 0.05$

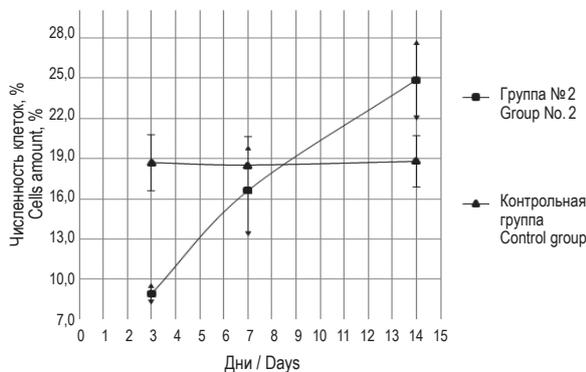


Рисунок 5. Изменение количества Т-хелперов при средней инфекционной дозе относительно контрольной группы, $p \leq 0,05$

Figure 5. Changes in the Th cells number at medium infectious dose versus the control group, $p \leq 0.05$

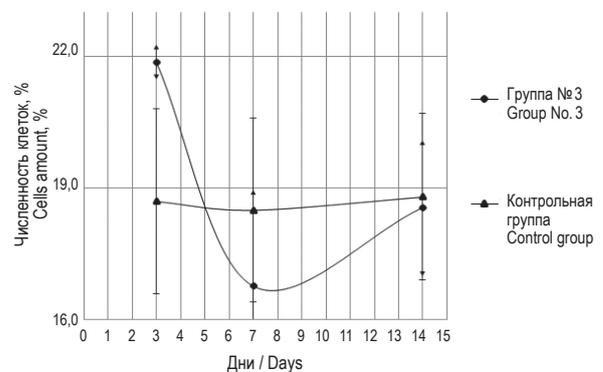


Рисунок 6. Изменение количества Т-хелперов при высокой инфекционной дозе относительно контрольной группы, $p \leq 0,05$

Figure 6. Changes in the Th cells number at high infectious dose versus the control group, $p \leq 0.05$

ТАБЛИЦА 2. ИЗМЕНЕНИЕ МАССЫ ТЕЛА МЫШЕЙ, $p \leq 0,05$

TABLE 2. THE CHANGE OF MICE BODY MASS, $p \leq 0.05$

	Масса тела, группа № 1 (2,5 ЭИД₅₀), г Body mass, group No. 1 (2,5 EID ₅₀), g	Масса тела, группа № 2 (25 ЭИД₅₀), г Body mass, group No. 2 (25 EID ₅₀), g	Масса тела, группа № 3 (250 ЭИД₅₀), г Body mass, group No. 3 (250 EID ₅₀), g	Масса тела, контрольная группа, г Body mass, control group, g
3-й день после инфицирования 3 rd day after infection	17,36±0,72	16,25±0,52	16,21±0,20	18,40±0,28
7-й день после инфицирования 7 th day after infection	17,66±1,47	18,47±0,15	17,07±0,05	18,90±0,86
14-й день после инфицирования 14 th day after infection	16,66±1,50	17,03±1,37	17,07±1,10	19,32±0,50

Одновременно нами было исследовано изменение массы тела у инфицированных мышей на 3-й, 7-й и 14-й день после заражения. Как видно из таблицы 2, у мышей, инфицированных низкой дозой вируса, наблюдалось невысокая потеря веса в период с 7-го по 14-й день. У мышей, инфицированных высокой и средней дозами вируса, была отмечена незначительная потеря веса на 14-й день после заражения.

Обсуждение

Штамм A/duck/Pennsylvania/10218/1984 (H5N2) вируса птичьего гриппа по нашим наблюдениям обладал высокой летальностью для мышей [1]. Поэтому нами были выбраны невысокие инфекционные дозы для заражения мышей, позволяющие наблюдать размножение в легких, но исключая быструю гибель животных.

На раннем этапе инфекции у мышей, инфицированных различными дозами вируса птичьего гриппа, наблюдалось снижение количества натуральных киллеров в селезенке (рис. 1, 2, 3), что, по-видимому, свидетельствует о миграции данной субпопуляции в очаг воспаления [3], а также о супрессивном влиянии вируса на иммунотропные клетки [4]. Появление пика количества натуральных киллеров к 7-му дню для групп средней и высокой инфекционных доз (рис. 2, 3) обусловлено высокой пролиферативной активностью натуральных киллеров в условиях высокой антигенной стимуляции. Предполагается, что снижение количества НК-клеток при низкой дозе на 7-й день, а также на 14-й день во всех трех группах мышей относительно контрольной группы обусловлено миграцией натуральных киллеров в легочную ткань.

При заражении мышей в зависимости от дозы инфицирования наблюдалась различная динамика изменения количества Т-хелперов. Инфекционный процесс, вызванный низкой дозой вируса, протекал в виде типичной острой вирусной инфекции, которая заканчивалась полным выздоровлением животных (табл. 1). При этом отмечалась активная клональная экспансия Т-хелперов с 7-го дня после начала инфекционного процесса (рис. 4).

Как видно из рисунка 5, характер изменения количества Т-хелперов после 7-го дня наблюдения у мышей, инфицированных средней дозой вируса, сходен с характером изменения количества Т-хелперов при инфицировании низкой дозой.

При заражении мышей высокой дозой вируса мы не наблюдали клональной экспансии Т-хелперов, что можно объяснить элиминацией Т-хелперов натуральными киллерами. Мы предполагаем, что в данном случае наблюдается эффект истощения Т-лимфоцитов, именно такие клетки распознаются и лизируются натуральными киллерами [8].

Регуляторная функция НК-клеток тесно связана с антигенпрезентирующими клетками. При вирусных инфекциях натуральные киллеры активируются дендритными клетками при помощи цитокинов, в частности, принадлежащих к семейству IL-12 [13]. Воздействие данных цитокинов приводит к секреции НК-клетками IFN γ [1] — главного противовирусного цитокина. Снижение количества Т-хелперов может быть вызвано как прямым воздействием на Т-хелперы, так и косвенно, посредством влияния на ДК. В первом случае уничтожение Т-хелперов происходит из-за недостаточного количества рецепторов к IFN γ на их поверхности [8], что описано при истоще-

нии Т-клеток [6]. Опосредованное влияние натуральных киллеров на Т-хелперы заключается в элиминации ДК, что снижает презентацию антигена Т-хелперам и их последующую клональную экспансию [8].

Вероятно, при заражении мышей средней дозой вируса эффект «истощения» развивается слабо или не развивается вовсе, но предполагается, что такое течение инфекции более губительно для организма. Высокая антигенная стимуляция Т-клеток приводит к неконтрольной аутоагрессии и, как следствие, становится причиной наиболее тяжелых осложнений после гриппа даже при сравнительно невысокой вирусной нагрузке. Возможно, сильную деструкцию легочной ткани вызывают в большей мере активированные клетки иммунной системы, чем вирус гриппа [11]. Элиминация Т-хелперов натуральными киллерами не помогает бороться с вирусом, однако играет существенную роль в снижении патологического воспаления и перехода воспалительного процесса в хроническую форму.

Заключение

Таким образом, иммунорегуляторная функция натуральных киллеров играет важную роль в формировании иммунного ответа при борьбе с инфекцией, вызванной вирусом гриппа птиц у млекопитающих. Уничтожая истощенные Т-лимфоциты, натуральные киллеры препятствуют развитию хронической инфекции и способствуют выживанию только тех клеток, которые способны оказывать сильное противовирусное действие, что в конечном счете приводит к успешной элиминации патогена и выздоровлению организма.

Благодарности

Авторы выражают благодарность коллективу лаборатории биосинтеза иммуноглобулинов НИИВС им. И.И. Мечникова за помощь в проведении экспериментов.

Список литературы / References

1. Кост В.Ю., Ртищев А.А., Минтаев Р.Р., Акопова И.И., Лисовская К.В., Маркушин С.Г. Изучение биологических свойств аттенуированных вариантов штамма A/WSN/33, полученных с помощью сайт-специфического мутагенеза PB2-гена // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии, 2019. Т. 96, № 2. С. 68-76. [Kost V.Yu., Rtischev A.A., Mintaev R.R., Akopova I.I., Lisovskaya K.V., Markushin S.G. Study of the biological properties of attenuated variants of the virulent A/WSN/33 strain of influenza virus, obtained by the site-specific mutagenesis of PB2-gene. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*, 2019, Vol. 96, no. 2, pp. 68-76. (In Russ.)]
2. Das Gupta S., Barua B., Fournié G., Hoque M.A., Henning J. Village and farm-level risk factors for avian influenza infection on backyard chicken farms in Bangladesh. *Sci. Rep.*, 2022, Vol. 12, no. 1, 13009. doi: 10.1038/s41598-022-16489-5.
3. Gismondi A., Santoni A. Migration of NK cells. *Lymphocyte Trafficking in Health and Disease*, 2006, pp. 95-112.
4. Hale B.G., Albrecht R.A., García-Sastre A. Innate immune evasion strategies of influenza viruses. *Future Microbiol.*, 2010, Vol. 5, no. 1, pp. 23-41.
5. Jost S., Altfeld M. Control of human viral infections by natural killer cells. *Annu Rev. Immunol.*, 2013, Vol. 31, pp. 163-194.
6. Kahan S.M., Wherry E.J., Zajac A.J. T cell exhaustion during persistent viral infections. *Virology*, 2015, Vol. 479-480, pp. 180-193.
7. Kreijtz J.H., Fouchier R.A., Rimmelzwaan G.F. Immune responses to influenza virus infection. *Virus Res.*, 2011, Vol. 162, no. 1-2, pp. 19-30.
8. Pallmer K., Oxenius A. Recognition and regulation of T cells by NK cells. *Front. Immunol.*, 2016, Vol. 7, 251. doi: 10.3389/fimmu.2016.00251.
9. Sims L.D., Ellis T.M., Liu K.K., Dyrting K., Wong H., Peiris M., Guan Y., Shortridge K.F. Avian influenza in Hong Kong 1997-2002. *Avian Dis.*, 2003, Vol. 47, 3 Suppl., pp. 832-838.
10. Smirnov Y.A., Lipatov A.S., van Beek R., Gitelman A.K., Osterhaus A.D., Claas E.C. Characterization of adaptation of an avian influenza A (H5N2) virus to mammalian host. *Acta Virol.*, 2000, Vol. 44, no. 1, pp. 1-8.
11. Uyeki T.M., Hui D.S., Zambon M., Wentworth D.E., Monto A.S. Influenza. *Lancet*, 2022, Vol. 400, no. 10353, pp. 693-706.

12. Waggoner S.N., Cornberg M., Selin L.K., Welsh R.M. Natural killer cells act as rheostats modulating antiviral T cells. *Nature*, 2011, Vol. 481, no. 7381, pp. 394-398.

13. Zwirner N.W., Ziblat A. Regulation of NK cell activation and effector functions by the IL-12 family of cytokines: The case of IL-27. *Front. Immunol.*, 2017, Vol. 8, 25. doi: 10.3389/fimmu.2017.00025

Авторы:

Шатунова П.О. — ассистент кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Министерства здравоохранения РФ; младший научный сотрудник лаборатории генетики РНК-содержащих вирусов ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова», Москва, Россия

Гаврилова М.В. — к.б.н., научный сотрудник лаборатории биосинтеза иммуноглобулинов ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова», Москва, Россия

Ртищев А.А. — младший научный сотрудник лаборатории генетики РНК-содержащих вирусов ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова», Москва, Россия

Кольганова Т.И. — ассистент кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Министерства здравоохранения РФ; младший научный сотрудник лаборатории физиологии грибов и бактерий ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова», Москва, Россия

Зайцева Т.А. — к.м.н., старший преподаватель кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Министерства здравоохранения РФ (Сеченовский университет), Москва, Россия

Маркушин С.Г. — д.м.н., старший научный сотрудник, заведующий лабораторией генетики РНК-содержащих вирусов ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова», Москва, Россия

Authors:

Shatunova P.O., Assistant Professor, Department of Microbiology, Virology and Immunology, I. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University); Junior Research Associate, Laboratory of Genetics of RNA Viruses, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation

Gavrilova M.V., PhD (Biology), Research Associate, Laboratory of Biosynthesis of Immunoglobulins, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation

Rtishchev A.A., Junior Research Associate, Laboratory of Genetics of RNA-Viruses, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation

Kolyganova T.I., Assistant Professor, Department of Microbiology, Virology and Immunology, I. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University); Junior Research Associate, Laboratory of Physiology of Fungi and Bacteria, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation

Zaytseva T.A., PhD (Medicine), Senior Lecturer, Department of Microbiology, Virology and Immunology, I. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russian Federation

Markushin S.G., PhD, MD (Medicine), Senior Research Associate, Head, Laboratory of Genetics of RNA-Viruses, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation

Поступила 31.10.2022

Отправлена на доработку 07.11.2022

Принята к печати 16.02.2023

Received 31.10.2022

Revision received 07.11.2022

Accepted 16.02.2023

ВЛИЯНИЕ КИШЕЧНЫХ МИКРОСИМБИОНТОВ НА ПРОДУКЦИЮ ЦИТОКИНОВ В СИСТЕМЕ *IN VITRO*

Бухарин О.В., Иванова Е.В., Чайникова И.Н.,
Перунова Н.Б., Никифоров И.А., Челпаченко О.Е.,
Бондаренко Т.А., Бекпергенова А.В.

Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза Уральского отделения Российской академии наук
ФГБУН «Оренбургский федеральный исследовательский центр» Уральского отделения Российской академии наук, г. Оренбург, Россия

Резюме. В сохранении иммунного гомеостаза кишечника важнейшая роль принадлежит иммунорегуляторным свойствам микробиоты, которая, взаимодействуя с образраспознающими рецепторами, активирует внутриклеточные сигнальные системы, экспрессию цитокинов, продукцию протективных факторов и ограничивает воспалительные реакции в кишечнике. Итог взаимодействий микробиоты и клеток хозяина (развитие воспалительного процесса или поддержание кишечного гомеостаза) зависит от многих факторов, включая потенциальную способность кишечных комменсалов влиять на цитокиновую сеть организма человека. При нарушении количественных и качественных характеристик микробиоты (дисбиоз) цитокиновый баланс, формируемый за счет влияния кишечных микросимбионтов и их метаболитов на иммунные и эпителиальные клетки кишечника, может изменяться, способствуя развитию различной патологии человека. Целью данного исследования явилась оценка иммунорегуляторных свойств эубиотических и дисбиотических кишечных микросимбионтов человека по влиянию их бесклеточных супернатантов на продукцию цитокинов в системе *in vitro*. Исследование было проведено на 49 эубиотических и 77 дисбиотических штаммах микроорганизмов, выделенных от условно здоровых пациентов, обследуемых на дисбиоз толстого кишечника. Для оценки иммунорегуляторных свойств кишечных микросимбионтов изучено влияние бесклеточных супернатантов исследуемых культур бактерий и грибов на продукцию про- (IFN γ , TNF α , IL-17, IL-8, IL-6) и противовоспалительных (IL-10, IL-1ra) цитокинов, секретируемых мононуклеарными клетками периферической крови здоровых людей. Микробиоту кишечника исследовали бактериологическим методом. Идентификацию выделенных микробных культур проводили с помощью MALDI TOF MS серии Microflex LT (Bruker Daltonics, Германия). Уровень цитокинов определяли иммуоферментным методом с использованием коммерческих тест-систем («Цитокин», Россия). Статистический анализ включал: дискриминантный анализ, классификационное дерево решений и метод картирования

Адрес для переписки:

Иванова Елена Валерьевна
Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза
Уральского отделения Российской академии наук
460000, Россия, г. Оренбург, ул. Пионерская, 11.
Тел.: 8 (3532) 77-26-19.
E-mail: walerewna13@gmail.com

Address for correspondence:

Elena V. Ivanova
Institute of Cellular and Intracellular Symbiosis
11 Pionerskaya St
Orenburg
460000 Russian Federation
Phone: +7 (3532) 77-26-19.
E-mail: walerewna13@gmail.com

Образец цитирования:

О.В. Бухарин, Е.В. Иванова, И.Н. Чайникова, Н.Б. Перунова, И.А. Никифоров, О.Е. Челпаченко, Т.А. Бондаренко, А.В. Бекпергенова «Влияние кишечных микросимбионтов на продукцию цитокинов в системе *in vitro*» // Медицинская иммунология, 2023. Т. 25, № 6. С. 1371-1388. doi: 10.15789/1563-0625-IVE-2622

© Бухарин О.В. и соавт., 2023
Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

O.V. Bukharin, E.V. Ivanova, I.N. Chainikova, N.B. Perunova, I.A. Nikiforov, O.E. Chelpachenko, T.A. Bondarenko, A.V. Bekpergenova "In vitro effects of intestinal microsymbionts on the cytokine production", *Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2023, Vol. 25, no. 6, pp. 1371-1388.

doi: 10.15789/1563-0625-IVE-2622

© Bukharin O.V. et al., 2023
The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License

DOI: 10.15789/1563-0625-IVE-2622

равнодействующих. Применение многомерного статистического анализа позволило определить круг наиболее информативных показателей (среди цитокинов и микробных культур, изменяющих их продукцию) для оценки состояния гомеостаза при эу- и дисбиозе кишечника. Установлено, что супернатанты эубиотических культур кишечных симбионтов характеризовались выраженной способностью ингибировать уровень провоспалительных цитокинов: $IFN\gamma$, IL-8 и стимулировать секрецию противовоспалительного цитокина (IL-10), а дисбиотические культуры – преимущественно индуцировали провоспалительные цитокины IL-17, $IFN\gamma$, $TNF\alpha$. В сохранение равномерного баланса между про- и противовоспалительными цитокинами при эубиозе вносили значимый вклад как ассоциации микросимбионтов (по мере убывания уровня факторных нагрузок: *Bacteroides* spp. > *E. coli* > *Lactobacillus* spp.), так и монокультуры (*Bifidobacterium* spp. и *Lactobacillus* spp.), через индукцию IL-10. При дисбиозе кишечника увеличивалось количество ассоциаций микросимбионтов, индуцирующих секрецию провоспалительных цитокинов. Провоспалительный профиль дисбиотических культур формировался через влияние на продукцию $IFN\gamma$ (по мере убывания уровня факторных нагрузок) ассоциаций *Bifidobacterium* spp. > *Enterococcus* spp. > *E. coli* > *Lactobacillus* spp., а также ассоциации *S. aureus* > *Candida* spp. На секрецию IL-17 влияли монокультура *Clostridium* spp. и ассоциация *C. acnes* > *S. aureus* > *Klebsiella* spp., на $TNF\alpha$ – монокультуры бифидобактерий и эшерихий. Таким образом, при эубиозе нормобиота поддерживает равномерный баланс про- и противовоспалительных цитокинов, а при дисбиозе кишечника может происходить смещение баланса цитокинов в сторону провоспалительных за счет усиления уровня их секреции, расширения спектра данной группы цитокинов и увеличения количества моно- и ассоциаций микробных культур, влияющих на их продукцию.

Ключевые слова: кишечные микросимбионты, провоспалительные цитокины, противовоспалительные цитокины, эубиоз, дисбиоз, методы многомерной статистики

IN VITRO EFFECTS OF INTESTINAL MICROSymbionTS ON THE CYTOKINE PRODUCTION

Bukharin O.V., Ivanova E.V., Chainikova I.N., Perunova N.B.,
Nikiforov I.A., Chelpachenko O.E., Bondarenko T.A.,
Bekpergenova A.V.

Institute of Cellular and Intracellular Symbiosis, Orenburg Federal Research Center, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Orenburg, Russian Federation

Abstract. The most important role in homeostasis of intestinal immune belongs to the immunoregulatory properties of the microbiota which activates intracellular signaling systems, cytokine expression, production of protective factors and limits inflammatory reactions in the intestine by interacting with the pattern recognition receptors. The outcome of interactions between the microbiota and host cells (development of an inflammatory process or maintenance of intestinal homeostasis) depends on many factors, including a potential ability of intestinal commensals to influence the cytokine network in human body. Due to disturbances of quantitative and qualitative microbiota profile (dysbiosis), the cytokine balance may be changed by the influence of intestinal microsymbionts and their metabolites on immune and epithelial cells of intestines, thus contributing to the development of various human disorders. The aim of this study was to evaluate the immunoregulatory properties of eubiotic and dysbiotic human intestinal microsymbionts by assessing the effects of their cell-free supernatants on cytokine production in the *in vitro* system. The study was conducted on 49 eubiotic and 77 dysbiotic strains of microorganisms isolated from conditionally healthy patients examined for colon dysbiosis. To assess immunoregulatory properties of intestinal microsymbionts, we studied the effects of cell-free supernatants from bacterial and fungal cultures up on production of proinflammatory ($IFN\gamma$, $TNF\alpha$, IL-17, IL-8, IL-6) and anti-inflammatory (IL-10, IL-1ra) cytokines secreted by mononuclear cells isolated from peripheral blood of healthy persons. The intestinal microbiota was determined by bacteriological methods. Identification of isolated microbial cultures was performed using MALDI TOF MS Microflex LT series (Bruker Daltonics, Germany). The level of cytokines was determined by enzyme immunoassay using commercial test systems (“Cytokine”, Russia). Statistical evaluation included discriminant analysis, classification decision tree

and resultant mapping method. The multivariate statistical analysis enabled us to determine the range of the most informative indexes among cytokines and microbial cultures that changing their production in order to assess the state of homeostasis in eubiosis and intestinal dysbiosis. It was found that the supernatants of eubiotic cultures of intestinal symbionts exhibited a pronounced ability to inhibit the level of pro-inflammatory cytokines (IFN γ , IL-8) and to stimulate the secretion of anti-inflammatory cytokine (IL-10), whereas the dysbiotic cultures predominantly induced pro-inflammatory cytokines (IL-17, IFN γ , TNF α). In maintaining a uniform balance between pro- and anti-inflammatory cytokines during eubiosis, both associations of microsymbionts (in descending order of factor loads): *Bacteroides* spp. > *E. coli* > *Lactobacillus* spp.), and monocultures (*Bifidobacterium* spp. and *Lactobacillus* spp.) made a significant contribution via IL-10 induction. In cases of intestinal dysbiosis, we found an increased number of associations between microsymbionts inducing secretion of pro-inflammatory cytokines was. The pro-inflammatory profile of dysbiotic cultures was determined by the influence on IFN γ production (ranged in descending order of factor loads) of *Bifidobacterium* spp. > *Enterococcus* spp. > *E. coli* > *Lactobacillus* spp. associations, as well as *S. aureus* > *Candida* spp associations. The secretion of IL-17 was influenced by the monoculture of *Clostridium* spp., and by association *C. acnes* > *S. aureus* > *Klebsiella* spp. Monocultures of *Bifidobacteria* and *Escherichia* exerted effects upon TNF α production. Thus, during eubiotic state, the normobiota maintains a uniform balance of pro- and anti-inflammatory cytokines, and, in presence of intestinal dysbiosis, a shift in the balance of cytokines towards pro-inflammatory ones may occur due to increased levels of their secretion, an expanded spectrum of cytokines from this group, and increased number of single bacteria and associations of microbial cultures affecting their production.

Keywords: intestinal microsymbionts, pro-inflammatory cytokines, anti-inflammatory cytokines, eubiosis, dysbiosis, multivariate statistical analysis

Введение

Введение термина «микробиом» позволило Дж. Ледербергу «раздвинуть» привычные рамки микробиоты, а организм хозяина определить как «суперорганизм» со всем микробным сообществом, где симбиотические связи оказывают влияние, как на физиологию «хозяина», так и определяют перестройки микробиоты [2, 31]. Рассмотрение инфекции в качестве модели ассоциативного симбиоза позволило использовать биологический потенциал микробиоты для решения вопросов о механизмах взаимодействия прокариот и эукариот [3]. Современные технологии секвенирования способствовали расширению исследований, связанных с микробиомом кишечника, и показали, что микробиота участвует в регулировании многих физиологических систем хозяина [39, 48]. Микробиота устанавливает симбиотические перекрестные связи со своим хозяином, продуцирует белки и метаболиты, модулирующие ключевые функции хозяина, включая переработку питательных веществ, поддержание энергетического гомеостаза и развитие иммунной системы [29, 36]. Вместе с тем кишечник является не только местом обитания многочисленных микроорганизмов, но и самым большим иммунологическим органом с разнообразным представительством иммунных клеток, организованных в структурные и изолированные лимфоидные фолликулы. Основой симбиотических взаимоотношений является ацептивный иммунитет, который в физиологических условиях на слизистых оболочках обеспечивает состо-

яние толерантности к представителям индигенной микробиоты, что является необходимым для формирования кишечного гомеостаза [8, 23].

Известно, что во взаимодействии хозяин-микробиота задействованы метаболиты, клеточные рецепторы и молекулы с антибактериальной и противовоспалительной активностью, включая цитокины, которые способны модулировать эпигенетический и иммунный ответ. При эубиозе вместе с эпителиальными и иммунными клетками эти сигнальные молекулы образуют сеть, необходимую для гомеостаза кишечника и противоинфекционной защиты. С другой стороны, при дисбиозе эти защитные механизмы нарушаются. Любые количественные или функциональные изменения кишечной микробиоты (дисбиоз) изменяют иммунный ответ, дестабилизируют гомеостаз кишечника, опосредуя транслокацию микробов и развитие инфекции (роль дисбиоза кишечника как «тroyанского коня») [28].

Цитокины, как медиаторы межклеточной «коммуникации», обеспечивают регуляцию иммунных реакций и скоординированное взаимодействие клеток иммунной системы [11]. Взаимодействие лигандов микроорганизмов с образраспознающими рецепторами ведет к активации внутриклеточных сигнальных систем, экспрессии цитокинов и продукции протективных факторов [18]. Итог таких взаимодействий зависит от многих факторов, включая потенциальную способность кишечных комменсалов влиять на цитокиновую сеть организма человека. Исследование взаимодействия кишечных микросимбиотонтов и цитокиновой сети человека представля-

ется важным, поскольку известна роль цитокинов и дисбиоза в формировании различной патологии: воспалительные заболевания кишечника, метаболические нарушения, аутоиммунные заболевания, онкология и др. [7, 9, 13, 25]. Вместе с тем отсутствуют комплексные исследования иммунорегуляторных свойств микросимбионтов при различных состояниях микросимбиоза (эубиоз/дисбиоз) кишечника человека, участие основных представителей дистального отдела кишечника в продукции различных функциональных групп цитокинов.

Указанные моменты и предопределили направленность наших исследований, которые могли бы способствовать лучшему пониманию роли микробиоты в поддержании иммунного гомеостаза кишечника, а также изысканию новых подходов для дальнейшей работы по отбору эффективных пробиотиков мишень-направленного действия.

Цель исследования – дать сравнительную оценку иммунорегуляторных свойств эубиотических и дисбиотических кишечных микросимбионтов человека по влиянию их супернатантов на продукцию цитокинов в системе *in vitro*.

Материалы и методы

Штаммы микроорганизмов

Материалом для исследования послужили 126 фекальных штаммов (49 эубиотических и 77 дисбиотических культур) облигатно-анаэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов, включая культуры *Bifidobacterium* spp. (*longum*, *bifidum*, *breve adolescentis*, *catenulatum*); *Lactobacillus* spp. (*fermentum*, *plantarum*, *acidophilus*, *rhamnosus*, *ruminis*, *paracasei*, *casei*); *Bacteroides* spp. (*fragilis*, *ovatus*, *vulgatus*); *Cutibacterium acnes*, *Clostridium* spp. (*difficile*, *novyi*); представителей семейства *Enterobacteriaceae* (*Escherichia coli*, *Klebsiellae* spp. (*pneumoniae*, *oxytoca*), *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter* spp. (*aerogenes* и *cloaceae*), *Citrobacter freundii*, *Proteus mirabilis*); *Staphylococcus* spp. (*aureus*, *warneri*, *xylosus*, *epidermalis* и *saprophyticus*); *Enterococcus faecium* и *Candida albicans*.

Микробиоту кишечника исследовали в соответствии с приказом Минздрава РФ № 231 (от 9.06.2003) «Об утверждении отраслевого стандарта «Протокол ведения больных. Дисбактериоз кишечника». Штаммы были выделены от условно здоровых пациентов в возрасте от 18 до 45 лет при обследовании на дисбиоз толстого кишечника человека. В результате у 20 пациентов был выявлен эубиоз и у 45 пациентов – дисбиоз кишечника I-III степени.

Идентификацию облигатно-анаэробных и факультативно-анаэробных бактерий и грибов проводили с помощью времяпролетной масс-

спектрометрии MALDI TOF MS серии Microflex LT (Bruker Daltonics, Германия), программное обеспечение Maldi BioTyper 3,0. Положительная идентификация на уровне рода соответствовала значению Score $\geq 1,7$ и на уровне вида – Score = 2,0 или выше.

Для исследования влияния метаболитов микроорганизмов на секрецию цитокинов в условиях *in vitro* использовали супернатанты бактериальных культур и грибов. Супернатанты получали из 24-48-часовой бульонной культуры в результате двукратного центрифугирования (3200 об/мин) с последующей фильтрацией (мембранные фильтры с диаметром пор 0,22 мкм, Millipore, США). Контроль стерильности супернатантов осуществляли высевом на питательные среды после предварительной их заморозки при $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Выделение мононуклеаров из периферической крови человека

Мононуклеарные клетки (МНК) выделяли в стерильных условиях из гепаринизированной крови, взятой стандартным методом из локтевой вены в вакуумные пробирки (BD Vacutainer™, Greiner-bio-one, Австрия) у 13 условно здоровых доноров обоего пола (средний возраст – $24,0 \pm 0,6$ года). Выделение МНК проводили посредством центрифугирования (400 g) на градиенте плотности фиколл-верографин (Pharmacia, Швеция) плотностью $1,077\text{ г/см}^3$. Число жизнеспособных клеток учитывали с помощью камеры Горяева после окраски 0,1% раствором трипанового синего. Готовую взвесь клеток МНК доводили до концентрации 1×10^6 /мл в культуральной среде и использовали для соинкубирования с бесклеточными супернатантами микроорганизмов.

Соинкубирование мононуклеаров с супернатантами исследуемых культур микросимбионтов

Сокультивирование взвеси МНК с супернатантами исследуемых микроорганизмов проводили в 96-луночных полистероловых планшетах в соотношении 1:4 (опыт) в культуральной среде, содержащей RPMI («ПанЭко», Россия), 10% инактивированную эмбриональную телячью сыворотку (Sigma-Aldrich, США), 0,01% L-глутамин и 80 мкг/мл гентамицина. Пробы инкубировали 24 часа во влажной атмосфере с 5% CO_2 (в CO_2 инкубаторе) при $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Исследование каждой клеточной культуры проводили в трех дублях. Контролем служили пробы: 1. контроль МНК в культуральной среде; 2. контроль МНК с добавлением питательной среды (бульон Шадлера, HiMedia, Индия), используемой для получения бульонной культуры исследуемых культур бактерий и грибов. По окончании срока инкубации культуральную жидкость собирали и замораживали ($-20\text{ }^{\circ}\text{C}$) для последующего определения концентрации цитокинов.

Исследование содержания цитокинов в культуральной жидкости

Уровни про- (IFN γ , TNF α , IL-17, IL-8, IL-6) и противовоспалительных (IL-10, IL-1ra) цитокинов в клеточных супернатантах определяли иммуоферментным методом на фотометре Multiskan (Labsystems, Финляндия) с использованием соответствующих коммерческих тест-систем («Цитокин», Россия). Результат влияния бесклеточных супернатантов кишечных микросимбионтов на секрецию цитокинов МНК оценивали по изменению концентрации цитокинов в культуральной среде по сравнению с контрольными пробами.

Статистический анализ

Результаты проведенных исследований обработаны методами вариационной статистики с использованием пакета прикладных программ Microsoft Excel и STATISTICA 10.0. Вычислялась средняя арифметическая величина (M) и стандартная ошибка средней арифметической (m). Для проверки нормальности распределения использован W-критерий Шапиро–Уилка. В случае распределения, приближенного к нормальному, использовали критерий Стьюдента, в остальных – применяли U-критерий Манна–Уитни для оценки значимости различий. Различия между выборками считались значимыми при уровне $p < 0,05$. Также были использованы дискриминантный анализ, метод дерева решений и метод картирования равнодействующих [40].

Результаты

Анализ влияния супернатантов кишечных микросимбионтов на секрецию цитокинов периферическими мононуклеарами показал, что большинство (82,1 \pm 3,6%) штаммов *Bifidobacterium* spp. ингибировали провоспалительный цитокин TNF α . Супернатанты исследуемых условно-патогенных кишечных микросимбионтов проявляли примерно в равной степени как ингибирующий, так и стимулирующий эффект. Исключение составили штаммы *Enterococcus* spp. и *Pseudomonas* spp., супернатанты которых во всех исследуемых случаях стимулировали продукцию данного цитокина (рис. 1А).

Уровень TNF α в среде культивирования мононуклеаров периферической крови человека в контроле составлял 37,12 \pm 2,15 пг/мл. В опытных пробах уровень его составил для *Bifidobacterium* spp. и *Lactobacillus* spp. 19,2 \pm 8,5 пг/мл и 51,4 \pm 23,5 пг/мл ($p < 0,05$ по сравнению контролем); для *Bacteroides* spp. и *Clostridium* spp. – 56,2 \pm 36,6 и 137,6 \pm 84,1 пг/мл ($p < 0,05$); для грамотрицательных условно-патогенных бактерий (УПБ) – 174,2 \pm 71,7 пг/мл ($p < 0,05$); для грамположительных УПБ – 157,2 \pm 73,2 пг/мл ($p < 0,05$),

для грибов рода *Candida* – 81,2 \pm 47,3 пг/мл ($p < 0,05$).

Оценка влияния супернатантов исследуемых культур на продукцию провоспалительного цитокина IFN γ лимфоцитами показала, что большинство штаммов (до 85,0 \pm 3,1%) стимулировали продукцию данного цитокина, а энтерококки и псевдомонады стимулировали во всех исследуемых случаях. Подавляли секрецию цитокина IFN γ супернатанты культур бифидобактерий (20,0 \pm 2,8%), кутибактерий (35,0 \pm 3,1%), лактобактерий (42,0 \pm 2,3%), клебсиелл (40,0 \pm 2,7%), золотистого стафилококка (50,0 \pm 2,9%) и клостридий (72,7 \pm 3,1%) (рис. 1Б).

Содержание цитокина IFN γ в среде культивирования лимфоцитов в контроле составляло 18,1 \pm 1,2 пг/мл. В опытных пробах уровень его составил для *Bifidobacterium* spp. и *Lactobacillus* spp. 51,3 \pm 10,2 пг/мл и 63,4 \pm 18,9 пг/мл, ($p < 0,05$); для *Bacteroides* spp. и *Clostridium* spp. – 86,3 \pm 30,1 пг/мл и 41,3 \pm 8,2 пг/мл ($p < 0,05$); для грамотрицательных УПБ – 131,4 \pm 36,5 пг/мл, ($p < 0,05$); для грамположительных УПБ – 66,3 \pm 15,7 пг/мл ($p < 0,05$); для грибов рода *Candida* – (77,3 \pm 15,2 пг/мл, $p < 0,05$).

В отношении IL-6 у супернатантов всех исследуемых культур проявлялся примерно в равной степени как ингибирующий, так и индифферентный эффект, вместе с тем около 20% исследуемых штаммов *Bifidobacterium* spp. стимулировали секрецию лимфоцитами этого цитокина. Уровень IL-6 в контроле составлял 514,1 \pm 20,2 пг/мл. В опытных пробах уровень его составил для *Bifidobacterium* spp. и *Lactobacillus* spp. 386,3 \pm 38,2 пг/мл и 336,3 \pm 28,9 пг/мл ($p < 0,05$); для *Bacteroides* spp. и *Clostridium* spp. – 456,1 \pm 29,2 пг/мл и 406,1 \pm 27,2 пг/мл ($p < 0,05$); для грамотрицательных УПБ – 461,7 \pm 25,7 пг/мл ($p \geq 0,05$); для грамположительных УПБ – 449,2 \pm 31,2 пг/мл ($p < 0,05$); для грибов рода *Candida* – 412,5 \pm 28,7 пг/мл ($p < 0,05$).

Оценка продукции хемокина IL-8 лимфоцитами в присутствии супернатантов кишечных микросимбионтов показала, что большинство культур (40-100%) оказывали стимулирующий эффект в отношении данного цитокина. Среди изученных штаммов только 23-25% культур бифидобактерий и лактобактерий подавляли секрецию IL-8, а остальные культуры либо не влияли на секрецию цитокина, либо ингибирующий эффект наблюдался в единичных случаях. В контроле содержание IL-8 составляло 615,3 \pm 25,0 пг/мл. В опытных пробах уровень его составил для *Bifidobacterium* spp. 626,8 \pm 113,1 пг/мл ($p \geq 0,05$); для *Bacteroides* spp. – 766,8 \pm 68,7 пг/мл ($p < 0,05$); для грамотрицательных УПБ – 935,1 \pm 147,4 пг/мл ($p < 0,05$); для грамположительных УПБ –

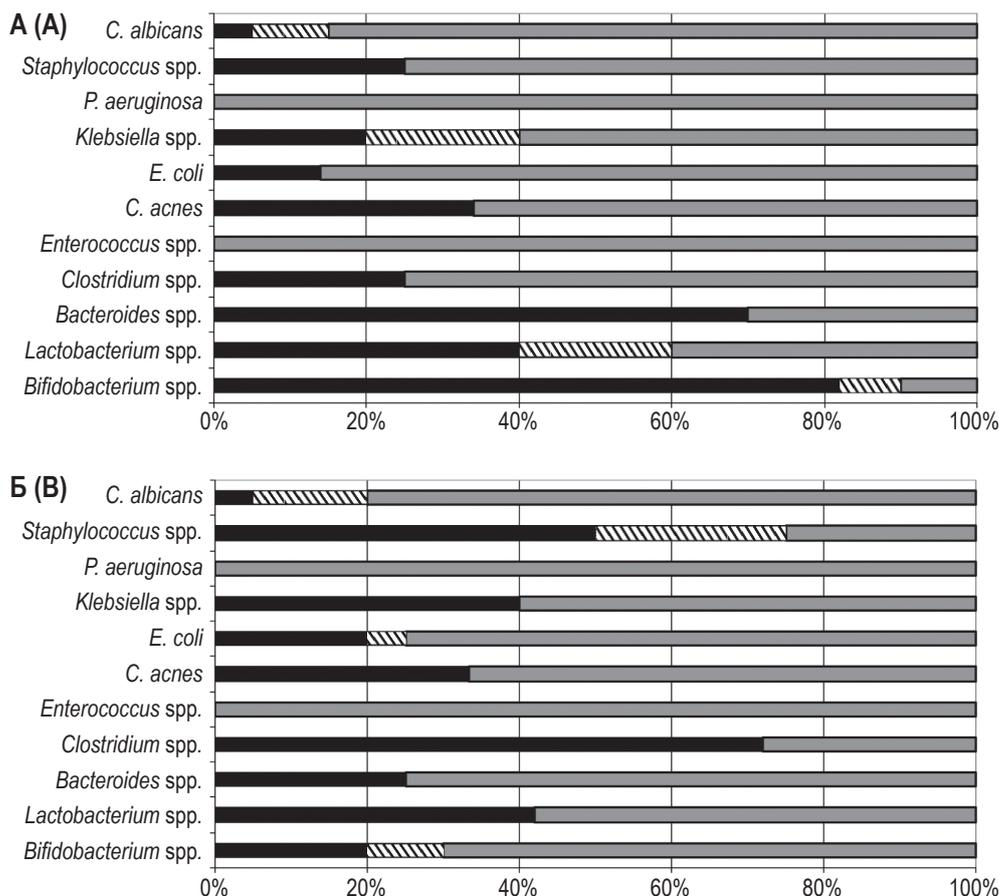


Рисунок 1. Частота встречаемости штаммов кишечных микросимбионтов с различным влиянием на продукцию провоспалительных цитокинов TNF α (А), IFN γ (Б) лимфоцитами (% от исследуемых штаммов)

Примечание. ■ – подавление продукции; ▨ – отсутствие влияния; ■ – увеличение продукции.

Figure 1. Frequency of occurrence of intestinal microsymbiote strains with different effects on the production of proinflammatory cytokines TNF α (A), IFN γ (B) by lymphocytes (% of the studied strains)

Note. ■, decreased of production; ▨, no effect; ■, increased of production.

833,8 \pm 78,5 пг/мл ($p < 0,05$); для грибов рода *Candida* – 723,8 \pm 84,9 пг/мл ($p < 0,05$).

Анализ влияния супернатантов кишечных микросимбионтов на продукцию ИЛ-17 лимфоцитами показал, что для большинства культур был характерен разнонаправленный эффект, кроме супернатантов бифидобактерий, лактобактерий и бактероидов, оказывающих в 97-100% случаев подавляющий эффект в отношении данного цитокина. Среди изученных штаммов 19-79% культур клостридий, кутибактерий, энтеробактерий, стафилококков и дрожжевых грибов проявляли стимулирующее влияние в отношении ИЛ-17. В контроле значение ИЛ-17 составляло 140,3 \pm 3,3 пг/мл. В опытных пробах уровень его составил для *Bifidobacterium spp.* и *Lactobacillus spp.* 59,4 \pm 29,1 пг/мл и 76,1 \pm 14,5 пг/мл ($p < 0,05$); для *Bacteroides spp.* и *Clostridium spp.* – 81,2 \pm 12,4 пг/мл и 166,1 \pm 35,6 пг/мл ($p < 0,05$); для грамотрицательных УПБ – 170,1 \pm 21,4 пг/мл ($p < 0,05$); для грамположительных УПБ – 153,6 \pm 24,1 пг/мл ($p < 0,05$);

для грибов рода *Candida* – 152,5 \pm 17,1 пг/мл ($p < 0,05$).

В отношении противовоспалительного цитокина ИЛ-10 было установлено, что большинство штаммов (18,0-100,0%) ингибировали секрецию данного цитокина. Стимулирующий эффект на продукцию ИЛ-10 лимфоцитами выявлялся у 75,0 \pm 4,3% культур бифидобактерий, у 63,6 \pm 2,7% бактероидов, у 50,0 \pm 1,8% лактобактерий, у 20,0 \pm 1,2% клебсиелл и у 33,0 \pm 1,5% эшерихий (рис. 2А). В контроле значения ИЛ-10 составляли 50,3 \pm 5,56 пг/мл. В опытных пробах уровень его составил для *Bifidobacterium spp.* и *Lactobacillus spp.* 63,5 \pm 20,9 пг/мл ($p < 0,05$) и 61,1 \pm 17,9 пг/мл ($p \geq 0,05$); для *Bacteroides spp.* и *Clostridium spp.* – 52,4 \pm 17,9 пг/мл ($p \geq 0,05$) и 22,3 \pm 9,7 пг/мл ($p < 0,05$); для грамотрицательных УПБ – 21,1 \pm 3,2 пг/мл ($p < 0,05$); для грамположительных УПБ – 32,1 \pm 14,6 пг/мл ($p < 0,05$); для грибов рода *Candida* – 37,8 \pm 8,4 пг/мл ($p < 0,05$).

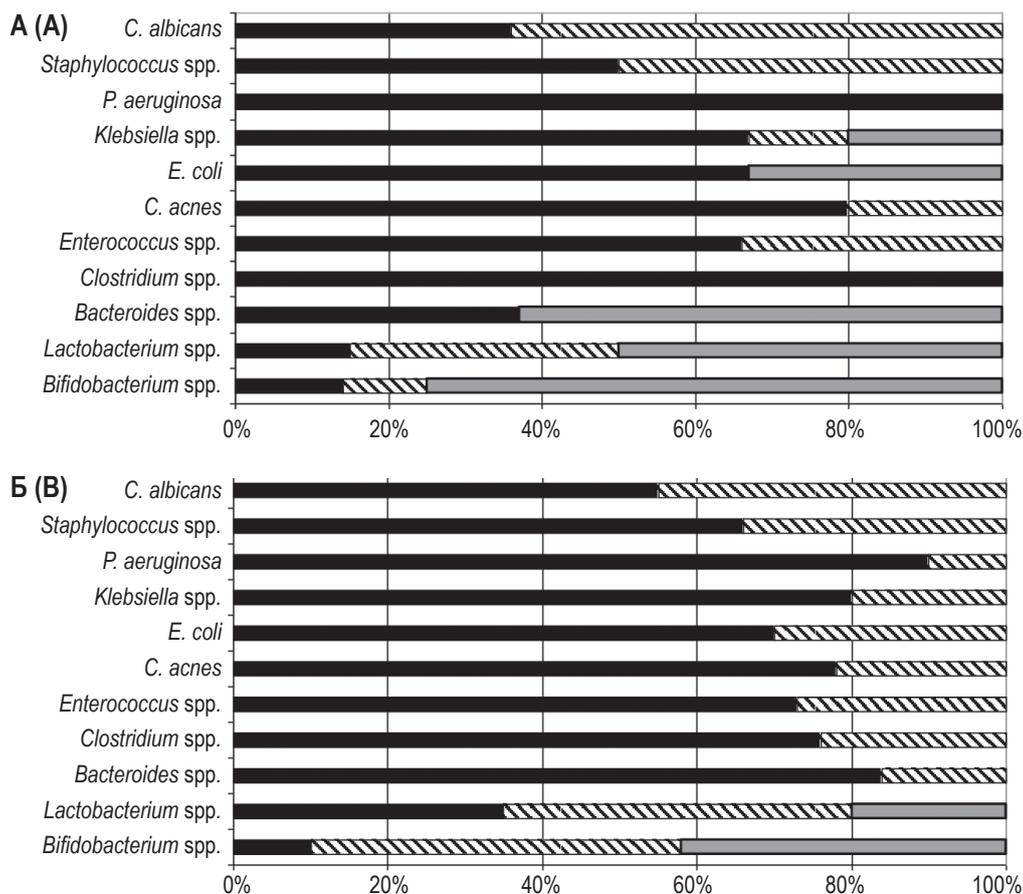


Рисунок 2. Частота встречаемости штаммов кишечных микросимбионтов с различным влиянием на продукцию противовоспалительных цитокинов IL-10 (А) и IL-1ra (Б) лимфоцитами (% от исследуемых штаммов)

Примечание. ■ – подавление продукции; ▨ – отсутствие влияния; ■ – увеличение продукции.

Figure 2. Frequency of occurrence of intestinal microsymbiote strains with different effects on the production of anti-inflammatory cytokines IL-10 (A) and IL-1ra (B) by lymphocytes (% of the studied strains)

Note. ■, decreased of production; ▨, no effect; ■, increased of production.

Изучение влияния супернатантов на продукцию другого противовоспалительного цитокина IL-1ra показало, что большинство исследуемых штаммов также снижали его продукцию (рис. 2Б). Вместе с тем $42,8 \pm 1,2\%$ культур бифидобактерий и $20,0 \pm 0,05\%$ лактобактерий стимулировали продукцию данного цитокина лимфоцитами.

В среде культивирования контрольных проб значения IL-1ra составляли $321,3 \pm 2,4$ пг/мл. В опытных пробах уровень его составил для *Bifidobacterium spp.* и *Lactobacillus spp.* $454,7 \pm 190,1$ пг/мл ($p < 0,05$) и $389,5 \pm 107,9$ пг/мл ($p \geq 0,05$); для *Bacteroides spp.* и *Clostridium spp.* – $184,2 \pm 74,9$ пг/мл и $212,3 \pm 70,1$ пг/мл ($p < 0,05$); для грамотрицательных УПБ – $177,4 \pm 75,2$ пг/мл ($p < 0,05$); для грамположительных УПБ – $190,2 \pm 78,6$ пг/мл ($p < 0,05$); для грибов рода *Candida* – $204,7 \pm 80,0$ пг/мл ($p < 0,05$).

Опираясь на полученный фактический материал, был проведен комплексный анализ влияния супернатантов различных видов микросимбионтов на цитокиновый профиль мо-

нонуклеаров периферической крови человека. Для выявления наиболее значимых различий между видами кишечных микросимбионтов и состояния микросимбиоза (эу- и дисбиоз дистального отдела кишечника), оцениваемых по способности супернатантов бактерий и грибов изменять секрецию цитокинов иммунными клетками, использовали методы многомерной математической статистики: дискриминантный анализ, метод картирования равнодействующих и дерево решений.

Построенная диаграмма значений ROOT1 по данным дискриминантного анализа выявила существенное различие эу- и дисбиотических штаммов по цитокиновому профилю (рис. 3). Поскольку для каждого штамма существовало свое решение данного уравнения, график значений ROOT1 по всей выборке отражает главную тенденцию различия иммунорегуляторной активности супернатантов микроорганизмов: для эубиотических штаммов значения ROOT1 ха-

рактизовались положительными значениями дискриминантного корня; для дисбиотических штаммов значения ROOT1 в большинстве случаев были ниже нулевых. Это сопровождалось значительным снижением значений TNF α и одновременно с этим происходит некоторый рост значений IL-1ra.

С использованием метода картирования равнодействующих [40] по 7 цитокинам была построена трехмерная диаграмма. Метод картирования наглядно представил разграничение эу- и дисбиотических культур по комплексу из 7 цитокинов, но оно не было стопроцентным для всех штаммов. Наблюдалось около 3 исключений из этого правила (т. е. четкое разграничение эу- и дисбиотических изолятов) для отдельных штаммов бифидобактерий, бактероидов и кутибактерий (рис. 4).

Дерево решений было построено по данным содержания исследуемых цитокинов (ед.) в культуральной среде (по отношению к контролю, т. е. уровню цитокинов в культуральной среде мнуклеаров без супернатантов микробных культур) при добавлении супернатантов различных видов микроорганизмов для разработки индуктивных правил распознавания особенностей иммунорегуляторного влияния культур в зависимости от источника выделения (эубиоз/дисбиоз). Правила генерируются при обобщении множества отдельных наблюдений, описывающих предметную область, представленную клинической выборкой. Форма решения представляется древовидной

иерархией, построенной путем статистического распознавания групп микроорганизмов через набор информативных показателей. Они вычисляются независимо от определенных ранее при дискриминантном анализе, что позволяет сравнить результаты обоих методов.

Интерпретация диаграммы дерева решений исследуемых микроорганизмов, выделенных при эубиозе, состояла в описании природы и компонентных связей каждого уровня возникшей древовидной структуры. Дерево было представлено 3 уровнями, которые распадались на ветви, продолжающие делиться, и 4 листьев, которые уже делению не подвержены.

Вклад каждого признака (содержание цитокинов в среде культивирования) в распознавание источника выделения культур микроорганизмов, необходимых дереву решений, уровень факторных нагрузок цитокинов позволили сформировать рейтинг информативных признаков, характерных для эубиотических штаммов кишечных микросимбионтов, представленный на рисунке 5.

Данные, представленные на рисунке 5А, демонстрируют сходство результатов нашей интерпретации дискриминантного анализа и дерева решений. Главная роль в обоих случаях принадлежала одним и тем же признакам, которые имели отрицательные факторные нагрузки. Значимыми для культур, выделенных при эубиозе, оказались признаки, характеризующие способность супер-

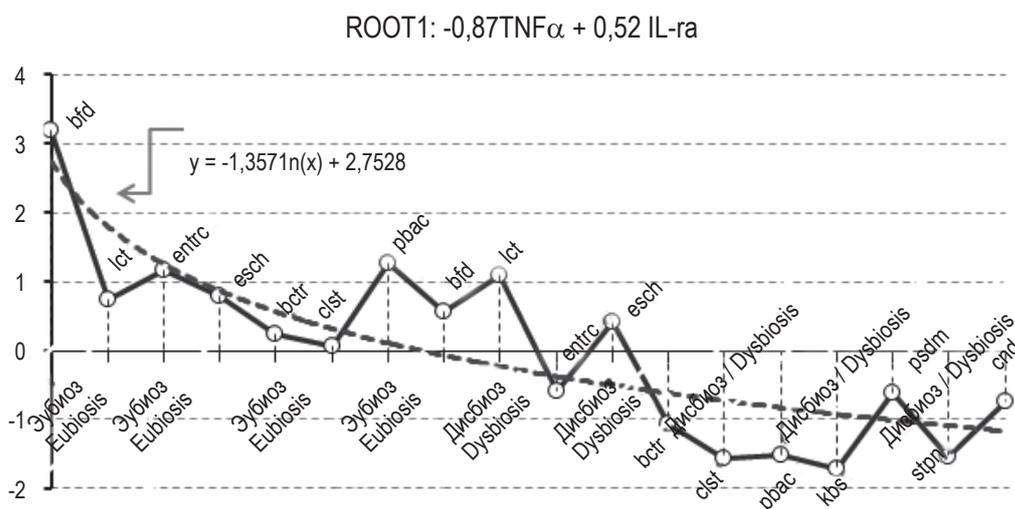


Рисунок 3. Диаграмма распределения штаммов по цитокиновому профилю с учетом состояния микросимбиоза толстого кишечника человека

Примечание. bfd – *Bifidobacterium* spp.; lct – *Lactobacillus* spp.; bctr – *Bacteroides* spp.; pbact – *C. acnes*; clst – *Clostridium* spp.; entrc – *Enterococcus* spp.; esch – *E. coli*; kbs – *Klebsiella* spp.; psdm – *P. aeruginosa*; stp – *S. aureus*; cnd – *C. albicans*.

Figure 3. Diagram of the distribution of strains by cytokine profile, taking into account the state of microsimbiocenosis of the human colon

Note. bfd, *Bifidobacterium* spp.; lct, *Lactobacillus* spp.; bctr, *Bacteroides* spp.; pbact, *C. acnes*; clst, *Clostridium* spp.; entrc, *Enterococcus* spp.; esch, *E. coli*; kbs, *Klebsiella* spp.; psdm, *P. aeruginosa*; stp, *S. aureus*; cnd, *C. albicans*.

натантов влиять на уровень $IFN\gamma$ и IL-8, а также IL-10.

Интерпретация диаграммы дерева решений исследуемых микроорганизмов, выделенных при дисбиозе толстого кишечника человека, состоящая в описании природы и компонентных связей каждого уровня возникшей древовидной структуры, установила, что дерево состояло из 7 уровней, которые распались на ветви, продолжающие делиться, и 8 листьев, которые уже не делились. На рисунке 5Б представлено участие микросимбионтов, выделенных при дисбиозе кишечника, в формировании цитокинового профиля мононуклеаров по данным метода дерева решений.

Уровень факторных нагрузок цитокинов позволил сформировать рейтинг информативных признаков, характерных для дисбиотических штаммов кишечных микросимбионтов. Значимыми информативными признаками для культур, выделенных при дисбиозе, оказались IL-17, $IFN\gamma$ и $TNF\alpha$, характеризующие выраженное влияние супернатантов исследуемых культур на секрецию указанных провоспалительных цитокинов.

Результаты анализа количественных и качественных взаимозависимостей родового состава и исследуемого набора признаков (продукция цитокинов) на основании примененного в работе метода «дерево решений», позволили решить вопрос о специфичном вкладе не только отдельных кишечных микросимбионтов, но и их ассоциаций в формирование цитокинового профиля кишечного биотопа и представлены схематично на рисунке 6. Интерпретация диаграммы дерева решений посредством описания природы и компонентных связей каждого уровня возникшей древовидной структуры позволила установить, что при эубиозе создается равномерный баланс между про- и противовоспалительными цитокинами (рис. 6). Значимый вклад в продукцию противовоспалительного цитокина IL-10 вносили как ассоциация микроорганизмов (*Bacteroides* spp. > *E. coli* > *Lactobacillus* spp.), так и отдельные изоляты *Bifidobacterium* spp. и *Lactobacillus* spp. Информативным признаком оказался IL-8, на секрецию которого влияла как ассоциация *C. acnes* > *Clostridium* spp. > *Enterococcus* spp., так и отдельные культуры (*Bifidobacterium* spp. и *E. coli*). Влияние на продукцию $IFN\gamma$ оказывали все исследуемые микроорганизмы (преимущественно *Bifidobacterium* spp., *Lactobacillus* spp, *Clostridium* spp. и *Enterococcus* spp.), за исключением *Bacteroides* spp. и *C. acnes*.

При дисбиозе толстого кишечника по данным диаграммы дерева решений увеличивалось количество ассоциаций микросимбионтов, влияющих на секрецию провоспалительных цитоки-

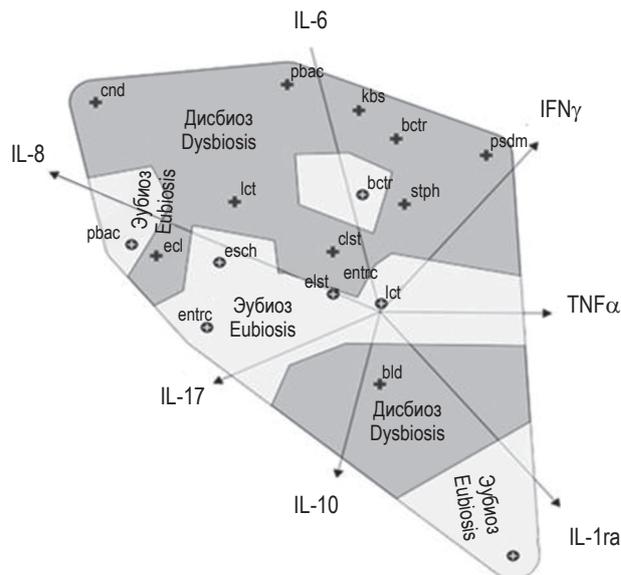


Рисунок 4. Распределение штаммов по комплексу из 7 цитокинов. Метод картирования равнодействующих
Примечание. См примечание к рисунку 3. ⊕ □ – эубиоз; ■ + – дисбиоз.

Figure 4. Distribution of strains by a complex of 7 cytokines. Method of mapping resultants

Note. As for Figure 3. ⊕ □, eubiosis; ■ +, dysbiosis.

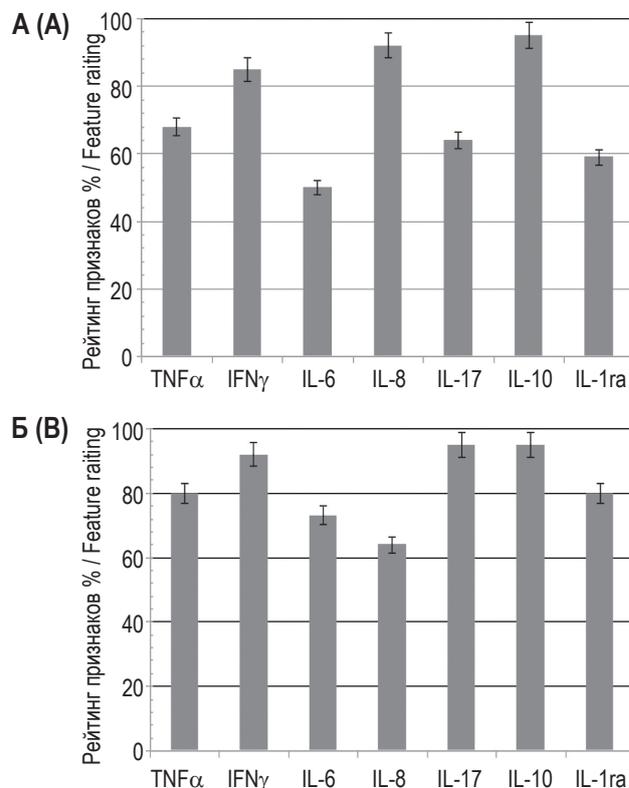


Рисунок 5. Рейтинг информативных признаков формирования дерева решений: А – при эубиозе; Б – при дисбиозе

Figure 5. Rating of informative signs of decision tree formation: A, in case of eubiosis B, in case of dysbiosis

нов. Наиболее информативными оказались провоспалительные цитокины $IFN\gamma$, IL-17 и $TNF\alpha$. На продукцию $IFN\gamma$ влияли ассоциация (по мере убывания) *Bifidobacterium* spp. > *Enterococcus* spp. > *E. coli* > *Lactobacillus* spp., а также ассоциация *S. aureus* > *Candida* spp. На секрецию IL-17 влияли монокультура *Clostridium* spp. и ассоциация *C. acnes* > *S. aureus* > *Klebsiella* spp., $TNF\alpha$ – монокультуры бифидобактерий и эшерихий. Оба исследуемых противовоспалительных цитокина – IL-10 и IL-1ra при дисбиозе оказались значимыми. На секрецию IL-1ra влияла ассоциация *Bacteroides* spp. > *P. aeruginosa* > *Lactobacillus* spp. В продукцию IL-10 значимый вклад вносили *Clostridium* spp. в монокультуре и ассоциация *C. acnes* > *Klebsiella* spp.

Анализ полученных данных свидетельствует, что результаты интерпретации дискриминантного анализа и дерева решений дополняют друг друга. Применение методов многомерного статистического анализа позволило определить круг наиболее информативных факторов, участвующих в формировании кишечного гомеостаза человека в условиях эу- и дисбиоза. Значимую роль (рейтинг) в формировании эу- и дисбиоза вносила способность микросимбионтов влиять на секрецию противовоспалительных цитокинов IL-10 и IL-1ra. При дисбиозе увеличивалось общее количество ассоциаций

микросимбионтов, влияющих на секрецию провоспалительных цитокинов, и расширялось количество цитокинов этой функциональной группы (IL-17, $IFN\gamma$, $TNF\alpha$) со значимым вкладом в развитие дисбиоза.

Таким образом, применение методов многомерного статистического анализа (дискриминантный анализ, метод картирования и дерева решений) показало, что при эубиозе создается равномерный баланс между про- и противовоспалительными цитокинами. При дисбиозе толстого кишечника превалирует провоспалительный профиль цитокинов за счет увеличения количества ассоциаций микросимбионтов, стимулирующих их секрецию. Полученные результаты дают основание полагать, что важным фактором поддержания кишечного гомеостаза в условиях эубиоза является способность супернатантов кишечных микросимбионтов оказывать дифференцированное воздействие по направленности, спектру и выраженности (индукция/ингибция/отсутствие влияния) на продукцию цитокинов разных функциональных групп (про- и противовоспалительных цитокинов, хемокина).

В условиях дисбиоза супернатанты микроорганизмов чаще оказывали провоспалительный эффект, усиливая секрецию IL-17, $TNF\alpha$ и $IFN\gamma$ иммунными клетками. Полученные результаты могут быть использованы для отбора и тестиро-

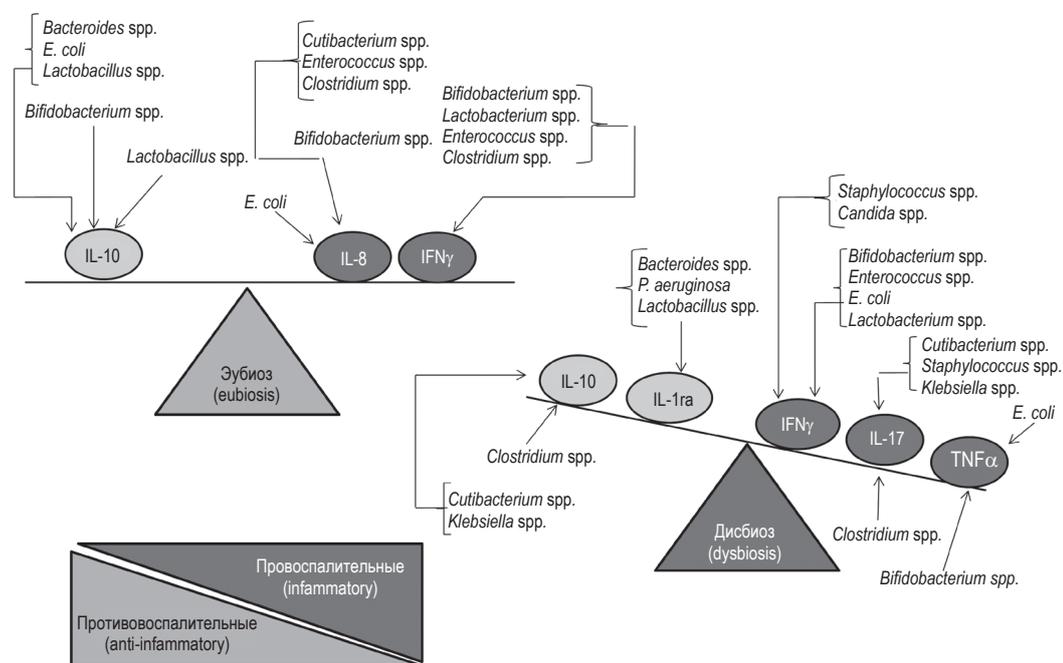


Рисунок 6. Схема формирования баланса цитокинов в присутствии супернатантов микросимбионтов при эубиозе и дисбиозе толстого кишечника человека

Примечание. Условные обозначения: { – ассоциации микроорганизмов

Figure 6. Scheme of cytokine balance formation in the presence of micronatants of microsymbionts in eubiosis and dysbiosis of the human colon

Note. Symbols: {, associations of microorganisms.

вания клинических штаммов по влиянию их на цитокиновый профиль клеток хозяина для создания новых бактериальных препаратов таргетного действия.

Обсуждение

Структуры слизистых оболочек кишечника, выполняющие пограничные функции, и симбиотическая микрофлора, заселяющая эти слизистые, филогенетически и онтогенетически являются функциональным единством и частью врожденной иммунной системы [14]. Взаимодействие кишечной микробиоты с хозяином осуществляется во многом посредством постоянной перекрестной связи между иммунными, эпителиальными клетками кишечника и микробиотой через сложную сеть цитокинов [15]. Исход таких взаимодействий во многом определяется качественно-количественным составом микробиоты, продуцирующей различные биологически активные молекулы и состоянием рецепторов хозяина, с которыми реализуются взаимодействия «микробиота-хозяин» [46]. Изменение микробиологического состояния биотопа дистального отдела толстого кишечника (дисбиоз) рассматривается в качестве одного из патогенетических звеньев при различной патологии человека, а разработка эффективных профилактических средств на основе микроорганизмов является актуальным направлением биотехнологии и медицины.

Недавние достижения в изучении взаимодействия между хозяином и микробиотой подтверждают ключевую роль микробных метаболитов в различных физиологических процессах, поскольку они служат посредниками в сложном «диалоге» между комменсальными бактериями, иммунными и эндокринными клетками хозяина [29, 33]. Спектр продуцируемых кишечными симбионтами метаболитов в целом можно разделить на три основные группы: метаболиты, образующиеся в результате микробной ферментации/разложения пищевых компонентов, метаболиты, полученные от хозяина, которые подвергаются микробной модификации, и биосинтез микробных метаболитов *de novo* [45]. Одними из ключевых метаболитов в кишечнике являются короткоцепочечные жирные кислоты (КЦЖК), образующиеся в результате анаэробного микробного метаболизма [47]. Наиболее распространенные КЦЖК в кишечнике — пропионат, бутират и ацетат, осуществляющие «сигналинг» через рецепторы, связанные с G-белком (GPCR), включая GPR43, GPR41 и GPR109A, которые экспрессируются как иммунными, так и эпителиальными клетками [17, 50]. Известно, что микросимбионты, обитающие в кишечнике, и их метаболиты способны индуцировать не только

локальные, но и иммунные реакции в отдаленных местах (органах) посредством двух основных механизмов: через транслокацию кишечных микробов и/или их компонентов или метаболитов в системный кровоток (прямой механизм) и благодаря локальной стимуляции эпителиальных, стромальных и иммунных клеток, сигналы от которых при участии цитокинов передаются в отдаленные органы (косвенный механизм) [34].

В нашей работе проведено сравнительное исследование различных видов микросимбионтов, изолированных при эу- и дисбиозе кишечника, по спектру влияния их бесклеточных супернатантов на секрецию цитокинов мононуклеарами периферической крови человека. Согласно полученным данным, выявленное разнонаправленное влияние (индукция/ингибирование/отсутствие влияния) супернатантов бактерий и грибов на продукцию различных функциональных групп цитокинов мононуклеарами периферической крови человека является штаммо- и видоспецифичным, как по частоте встречаемости, так и по уровню секреции цитокинов. Было установлено, что среди штаммов бифидо-, лактобактерий и бактероидов преобладали культуры, подавляющие продукцию цитокинов TNF α , IL-6, IL-17 и, напротив, стимулирующие секрецию IL-10 и IL-1ra. Способность штаммов бифидобактерий снижать экспрессию провоспалительных цитокинов TNF α , IL-1 β , IL-6 и совместно с лактобактериями препятствовать развитию TNF α -индуцированной проницаемости кишечника, ограничивая повреждение монослоя, была показана на модели Caco-2 [27, 58]. Влияние на целостность и индуцированную проницаемость кишечного барьера авторы связывают с наличием у кислотолюбивых бактерий такого метаболита, как ацетат, активирующего процесс укрепления целостности кишечного барьера. Ацетат и лактат, продуцируемый бифидобактериями после ферментации углеводов, далее могут быть преобразованы другими кишечными бактериями в бутират, обладающий противовоспалительными свойствами. Продукция данных метаболитов является одной из важных функций *Bifidobacterium* spp. [44]. Тем самым суммарные эффекты воздействия метаболитов нормобиоты на секрецию цитокинов иммунными клетками обеспечивают цитокиновый баланс, характеризующийся умеренным уровнем провоспалительных цитокинов, контролируемым супрессивным воздействием IL-10, продуцируемого преимущественно популяцией Treg-клеток [24, 51].

В работах ранее нами было показано, что уровень и спектр КЦЖК бифидобактерий варьировал в зависимости от состояния микросимбиоза [5]. Сравнительный анализ спектра

карбоновых кислот в супернатанте бифидобактерий при эу- и дисбиозе толстого кишечника человека показал снижение частоты встречаемости всех исследованных карбоновых кислот (C_1 - C_6) в супернатантах бифидобактерий при 2-3-й степени дисбиоза, за исключением уксусной и масляной кислот. При тяжелой степени дисбиоза (3-я степень) в супернатантах бифидобактерий была снижена суммарная концентрация КЦЖК, включая уровень уксусной и пропионовой кислот.

В последние годы вопрос о механизмах, лежащих в основе иммуномодулирующих свойств бифидобактерий, рассматривался на различных моделях [41, 57]. Установлено, что живые клетки *B. longum subsp. longum* GT15 при соинкубации с клетками ТНР-1 увеличивали экспрессию мРНК $TNF\alpha$, IL-8 и IL-10 [1]. Такая избирательная способность индуцировать выработку цитокинов в сочетании со способностью распознавать соответствующие цитокины позволяет предположить, что бифидобактерии могут быть вовлечены в регуляцию воспаления в кишечнике в качестве активного участника. В дополнение к этому было показано [21, 37, 38], что у автохтонных видов бифидобактерий выявлен белок FN3, кодируемый одним из генов, составляющих кластер PFNA, содержащий домены и мотивы цитокиновых рецепторов, способных избирательно связывать $TNF\alpha$. Как предполагают авторы, кластер PFNA может играть важную роль в распознавании бифидобактериями сигналов иммунной системы.

На основе экспериментальных и литературных данных в работе Бухарина О.В. и соавт. (2015) была представлена роль бифидобактерий в формировании иммунного гомеостаза кишечника человека. Было показано, что первичная дискриминация «чужеродного материала» бифидобактериями – инициальный этап последующего «сигналинга» в регуляции иммунного гомеостаза хозяина [4]. Дальнейшие этапы регуляции осуществляются активацией дендритных клеток непосредственно бифидобактериями, их метаболитами с последующим влиянием на дифференцировку наивных $CD4^+$ T-лимфоцитов в сторону регуляторных лимфоцитов и поддержанием оптимального цитокинового баланса кишечного биотопа человека.

О высокой иммунорегулирующей способности бифидобактерий свидетельствуют исследования Rabe Н. (2020), в которых было установлено, что дети с высоким содержанием *Bifidobacteriaceae* или колонизированные *Bifidobacterium spp.* в раннем младенчестве, имеют мононуклеарные клетки с более высокой способностью продуцировать цитокины (IL-5, IL-6, IL-13, TNF и IL-1 β) по-

сле ФГА-стимуляции в позднем детском возрасте [43]. Напротив, колонизация кишечника большим количеством *Enterococcus spp.*, *Clostridium spp.* и *S. aureus* была связана с более низкой способностью к продукции цитокинов в возрасте 3 лет. Характерно, что индукция секреции мононуклеарами $IFN\gamma$ не была связана с ранней колонизацией кишечника новорожденных бифидофлорой. Следует отметить, что экзополисахариды, секретлируемые молочнокислыми бактериями (бифидо- и лактобактерии), индуцируя синтез цитокинов, стимулируют фагоцитарную активность макрофагов и нейтрофилов [18, 20], усиливая тем самым колонизационную резистентность кишечного биотопа.

Анализ влияния супернатантов условно-патогенных микроорганизмов (УПМ) показал, что для большинства из них характерна стимуляция секреции провоспалительных цитокинов $TNF\alpha$, IL-8, IL-17 и супрессия – IL-10 и IL-1ra, что свидетельствует о преобладающем провоспалительном балансе у данных микроорганизмов. Вместе с тем у бактерий, изолированных при дисбиозе, высокая частота встречаемости и выраженный уровень индуцируемых противовоспалительных цитокинов были характерны для штаммов клебсиелл, кишечной палочки, бактероидов. Другими авторами было установлено, что способностью повышать экспрессию противовоспалительного цитокина TGF- β 1 обладали преимущественно бутират продуцирующие комменсальные штаммы клостридий через экспансию Treg-клеток в кишечнике [35]. Так как в нашей работе для оценки иммунорегуляторных свойств кишечных комменсалов использовались бесклеточные супернатанты, можно предположить, что продукция цитокинов мононуклеарами после прямого контакта с супернатантами УПМ может быть опосредована не только карбоновыми кислотами, но и рядом других биологически активных молекул. Так, на секрецию цитокинов и активацию иммунных клеток могут оказывать воздействие лиамины микробного происхождения; индол и его производные, продуцируемые бактериями с триптофаназой, такими, как кишечная палочка и лактобациллы; сидерофоры клебсиелл, индуцирующие IL-6 и хемокины; ацил-гомосериновые лактоны (3-оксо- $C_{12:2}$ -HSL *Pseudomonas aeruginosa*), влияющие на секрецию как про-, так и провоспалительных цитокинов различными иммунными и эпителиальными клетками [6, 19, 22, 26, 53]. Супернатанты микроорганизмов могут также содержать и внеклеточный АТФ, высвобождаемый бактериями и грибами, такими как *E. coli*, *Enterococcus spp.* и многими другими, включая и грибы рода *Candida*. Внеклеточный

микробный АТФ, действуя как сигнальная молекула, опосредует взаимодействие с клетками хозяина, может влиять на активность иммунных клеток и секрецию цитокинов [49].

Умеренно повышенное содержание провоспалительных цитокинов является необходимым для контроля инфекции, в этом проявляется позитивный эффект выявленного разнообразия стимулирующего влияния комменсалов на секрецию ранних цитокинов – TNF α и IL-8. Однако следует учитывать, что при избыточной продукции такое воздействие комменсалов может привести к повреждению тканей, структурными элементами которых являются клетки-продуценты цитокинов [10, 54]. Необходимо учитывать, что гетерогенность иммуномодулирующих свойств микросимбионтов во многом опосредована различными сигнальными путями активации генов цитокинов в иммунных и эпителиальных клетках кишечника [1, 16, 32, 52, 55, 56].

Обсуждение полученных данных по сравнительной оценке иммунорегуляторных свойств кишечных микросимбионтов при эу- и дисбиозе толстого кишечника представляет известные трудности, связанные с большим спектром членов микробных консорциумов в кишечном микросимбиозе, а также штаммовой специфичностью биологических свойств, метаболического профиля, секретируемых биологически активных молекул (КЦЖК, участков ДНК, коротких пептидов экзополисахаридов) и других потенциально иммуномодулирующих молекул. Учитывая вышесказанное, для выявления наиболее значимых различий между видами кишечных микросимбионтов и источника их выделения (эу- и дисбиоз), оцениваемых по способности супернатантов штаммов бактерий и грибов изменять секрецию цитокинов иммунными клетками, мы использовали методы многомерной математической статистики: дискриминантный анализ, метод картирования и дерево решений. Оценивая в целом полученные материалы, следует отметить, что при анализе методами многомерной статистики исследуемых признаков удалось конкретизировать круг наиболее информативных показателей для оценки иммунорегуляторной активности кишечных симбионтов в различных микрорэкологических состояниях (эу- и дисбиоз).

Рейтинг информативных признаков формирования дерева решений по уровню факторных нагрузок при эубиозе/дисбиозе показал, что значимой для культур эубиотических кишечных симбионтов оказалась способность супернатантов влиять на уровень провоспалительных цитокинов IFN γ , IL-8 и противовоспалительного цитокина IL-10, а для дисбиотических культур –

преимущественно на цитокины провоспалительного профиля – IL-17, IFN γ , TNF α . В сохранение равномерного баланса между про- и противовоспалительными цитокинами при эубиозе вносили значимый вклад ассоциации бактероидов, кишечной палочки, лактобацилл, а также монокультуры бифидо- и лактобактерий, стимулирующих секрецию IL-10. Провоспалительный профиль дисбиотических культур формировался через влияние на продукцию IFN γ ассоциациями, представленными бифидобактериями, энтерококками, кишечной палочкой, лактобактериями, а также золотистым стафилококком совместно с грибами рода *Candida*. На секрецию IL-17 влияли монокультура клостридий и ассоциация кутибактерий, золотистого стафилококка, клебсиелл, на TNF α – монокультуры бифидобактерий и эшерихий. Тем самым при дисбиозе увеличивалось общее количество ассоциаций микросимбионтов, влияющих на секрецию провоспалительных цитокинов, и расширялось количество цитокинов этой функциональной группы (IL-17, IFN γ , TNF α) со значимым вкладом (значения факторных нагрузок) в развитие дисбиоза. Обращаем внимание, что при дисбиозе по результатам метода «дерево решений» установлен высокий рейтинг и для IL-10 (факторные нагрузки, определяющие рейтинг данного параметра, практически совпадали с рейтингом IL-17). Эти результаты показывают, что смещение баланса цитокинов при дисбиозе в сторону провоспалительного профиля может реализовываться не только через расширение количества ассоциаций микросимбионтов, индуцирующих секрецию провоспалительных цитокинов, но и через ограничение индукции IL-10 дисбиотическими штаммами УПМ. Об усилении провоспалительного ответа с индукцией IFN γ и других провоспалительных цитокинов кишечными УПМ в условиях дисбиоза свидетельствуют также работы ряда авторов [30, 42]. На основании этого было предложено использовать уровень и спектр провоспалительных цитокинов как биомаркер дисбиоза кишечника [12].

В целом применение многомерных методов статистики для анализа влияния супернатантов кишечных микросимбионтов на секрецию иммунными клетками цитокинов показало сопоставимые результаты, характеризующие превалирование провоспалительного профиля у штаммов симбионтов, выделенных от людей с выраженными микрорэкологическими нарушениями толстого кишечника. Кроме того, при дисбиозе толстого кишечника увеличивалось количество и разнообразие по составу ассоциаций микросим-

бионтов, индуцирующих секрецию провоспалительных цитокинов.

Заключение

Полученные в работе данные свидетельствуют о том, что дисбиотическая микробиота толстого кишечника человека может препятствовать поддержанию гомеостатических реакций в кишечнике человека через влияние на цитокиновую сеть с формированием патологического цитокинового профиля со смещением баланса в сторону провоспалительных цитокинов.

Выделение информативных для эубиоза и дисбиоза цитокинов, секретируемых иммунными клетками при контакте с бесклеточными супернатантами кишечных микросимбионтов, может

служить обоснованным критерием при разработке пробиотиков, постбиотиков таргетного действия для коррекции микрoэкологических нарушений в кишечнике при различных заболеваниях. При проведении мероприятий по восстановлению микробиоты при дисбиозе важным критерием эффективности, наряду с изменением качественно-количественного состава микроорганизмов, может быть изменение цитокинового профиля кишечных микросимбионтов. Оба эти критерия являются взаимосвязанными. Следует учитывать и персонифицированный подход, поскольку микроорганизмы имеют штаммоспецифические характеристики, а человек — особенности генетики и физиологии, определяющие ответные реакции хозяина на присутствие в кишечном биотопе нормобиоты.

Список литературы / References

1. Аверина О.В., Ермоленко Е.И., Ратушный А.Ю., Тарасова Е.А., Борщев Ю.Ю., Леонтьева Г.Ф., Крамская Т.А., Котылева М.П., Даниленко В.Н., Суворов А.Н. Влияние пробиотиков на продукцию цитокинов в системах *in vitro* и *in vivo* // Медицинская иммунология, 2015. Т. 17, № 5. С. 443-454. [Averina O.V., Ermolenko E.I., Ratushnyy A.Yu., Tarasova E.A., Borshev Yu.Yu., Leontieva G.F., Kramskaya T.A., Kotyleva M.P., Danilenko V.N., Suvorov A.N. Influence of probiotics on cytokine production in the *in vitro* and *in vivo* systems. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2015, Vol. 17, no. 5, pp. 443-454. (In Russ.)] doi:10.15789/1563-0625-2015-5-443-454.
2. Бухарин О.В., Перунова Н.Б. Микросимбиоз. Екатеринбург: УрО РАН, 2014. 257 с. [Bukharin O.V., Perunova N.B. *Microsymbiogenesis*. Yekaterinburg: Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, 2014. 257 p.
3. Бухарин О.В., Лобакова Е.С., Немцева Н.В., Черкасов С.В. Ассоциативный симбиоз. Екатеринбург: УрО РАН, 2007. 264 с. [Bukharin O.V., Lobakova E.S., Nemtseva N.V., Cherkasov S.V. *Associative symbiosis*. Yekaterinburg: Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, 2007. 264 p.
4. Бухарин О.В., Иванова Е.В., Перунова Н.Б., Чайникова И.Н. Роль бифидобактерий в формировании иммунного гомеостаза человека // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии, 2015. № 6. С. 98-104. [Bukharin O.V., Ivanova E.V., Perunova N.B., Chaynikova I.N. The role of bifidobacteria in the formation of human immune homeostasis. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*, 2015, no. 6, pp. 98-104. (In Russ.)]
5. Бухарин О.В., Иванова Е.В., Перунова Н.Б., Чайникова И.Н., Андрющенко С.В. Метаболический профиль бифидофлоры при различных микрoэкологических состояниях биотопа толстого кишечника человека // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии, 2017. Т. 94, № 1. С. 3-11. [Bukharin O.V., Ivanova E.V., Perunova N.B., Chaynikova I.N., Andryushchenko S.V. Metabolic profile of bifidoflora in various microecological conditions of human colon biotope. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*, 2017, Vol. 94, no. 1, pp. 3-11. (In Russ.)]
6. Годовалов А.П., Карпунина Т.И. Влияние полиаминов бактериального происхождения на продукцию ключевых цитокинов в культуре мононуклеарных лейкоцитов человека // Медицинская иммунология, 2022. Т. 24, № 2. С. 257-262. Godovalov A.P., Karpunina T.I. Influence of polyamines of bacterial origin on the production of key cytokines in the culture of human mononuclear leukocytes. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2022, Vol. 24, no. 2, pp. 257-262. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-IOP-2399.
7. Демидова Т.Ю., Лобанова К.Г., Ойноткинова О.Ш. Кишечная микробиота как фактор риска развития ожирения и сахарного диабета 2-го типа // Терапевтический архив, 2020. Т. 92, № 10. С. 97-104. [Demidova T.Yu., Lobanova K.G., Oynotkinova O.Sh. Intestinal microbiota as a risk factor for the development of obesity and type 2 diabetes mellitus. *Terapevticheskiy arkhiv = Therapeutic Archive*, 2020, Vol. 92, no. 10, pp. 97-104. (In Russ.)]
8. Киселева Е.П. Акцептивный иммунитет – основа симбиотических взаимоотношений // Инфекция и иммунитет, 2015. Т. 5, № 2. С. 113-130. [Kiseleva E.P. Acceptive immunity – a basis for symbiotic relationships. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2015, Vol. 5, no. 2, pp. 113-130. (In Russ.)] doi: 10.15789/2220-7619-2015-2-113-130.

9. Лукичев Б.Г., Румянцев А.Ш., Акименко В. Микробиота кишечника и хроническая болезнь почек. Сообщение первое // Нефрология, 2018. Т. 22, № 4. С. 57-73. [Lukichev B.G., Rumyantsev A.S., Akimenko V. Colonic microbiota and chronic kidney disease. message one. *Nefrologiya = Nephrology*, 2018, Vol. 22, no. 4, pp. 57-73. (In Russ.)]
10. Семинский И.Ж., Серебренникова С.Н., Гузовская Е.В. Роль цитокинов в патогенезе заболеваний // Сибирский медицинский журнал (Иркутск), 2015. Т. 132, № 1. С. 14-17. [Seminsky I.Zh., Serebrennikova S.N., Guzovskaya E.V. The role of cytokines in the pathogenesis of diseases. *Sibirskiy meditsinskiy zhurnal (Irkutsk) = Siberian Medical Journal (Irkutsk)*, 2014, Vol. 131, no. 8, pp. 30-33. (In Russ.)]
11. Симбирцев А.С. Цитокины в патогенезе и лечении заболеваний человека. СПб.: Фолиант, 2018. 512 с. [Simbircev A.S. Cytokines in the pathogenesis and treatment of human diseases]. St. Petersburg: Foliant, 2018. 512 p.
12. Abe K., Takahashi A., Fujita M., Imaizumi H., Hayashi M., Okai K., Ohira H. Dysbiosis of oral microbiota and its association with salivary immunological biomarkers in autoimmune liver disease. *PLoS One*, 2018, Vol. 13, no. 7, e0198757. doi: 10.1371/journal.pone.0198757.
13. Al Bander Z., Nitert M.D., Mousa A., Naderpoor N. The gut microbiota and inflammation: An overview. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 2020, Vol. 17, no. 20, 7618. doi: 10.3390/ijerph17207618.
14. Allaire J.M., Crowley S.M., Law H.T., Chang S.Y., Ko H.J., Vallance B.A. The intestinal epithelium: central coordinator of mucosal immunity. *Trends Immunol.*, 2018, Vol. 39, no. 9, pp. 677-696.
15. Andrews C., McLean M.H., Durum S.K. Cytokine tuning of intestinal epithelial function. *Front. Immunol.*, 2018, Vol. 9, 1270. doi: 10.3389/fimmu.2018.01270.
16. Badi S.A., Khatami S.H., Irani S.H., Siadat S.D. Induction Effects of bacteroides fragilis derived outer membrane vesicles on Toll like receptor 2, Toll like receptor 4 genes expression and cytokines concentration in human intestinal epithelial cells. *Cell J.*, 2019, Vol. 21, no. 1, pp. 57-61.
17. Caffaratti C., Plazy C., Mery G., Tidjani A.R., Fiorini F., Thiroux S., Toussaint B., Hannani D., le Gouellec A. What we know so far about the metabolite-mediated microbiota-intestinal immunity dialogue and how to hear the sound of this crosstalk. *Metabolites*, 2021, Vol. 11, no. 6, 406. doi: 10.3390/metabo11060406.
18. Ciesielska A. TLR4 and CD14 trafficking and its influence on LPS-induced pro-inflammatory signaling. *Cell Mol. Life Sci.*, 2021, Vol. 78, no. 4, pp. 1233-1261.
19. Coquant G., Aguanno D., Brot L., Belloir C., Delugeard J., Roger N., Pham H.P., Briand L., Moreau M., de Sordi L., Carrière V., Grill J.P., Thenet S., Seksik P. 3-oxo-C12:2-HSL, quorum sensing molecule from human intestinal microbiota, inhibits pro-inflammatory pathways in immune cells via bitter taste receptors. *Sci. Rep.*, 2022, Vol. 12, no. 1, 9440. doi: 10.1038/s41598-022-13451-3.
20. Duary R.K., Batish V.K., Grover S. Immunomodulatory activity of two potential probiotic strains in LPS-stimulated HT-29 cells. *Genes Nutr.*, 2014, Vol. 9, no. 3, 398. doi: 10.1007/s12263-014-0398-2.
21. Dyakov I.N., Mavletova D.A., Chernyshova I.N., Snegireva N.A., Gavrilova M.V., Bushkova K.K., Dyachkova M.S., Alekseeva M.G., Danilenko V.N. FN3 protein fragment containing two type III fibronectin domains from *B. longum* GT15 binds to human tumor necrosis factor alpha *in vitro*. *Anaerobe*, 2020, Vol. 65, 102247. doi: 10.1016/j.anaerobe.2020.102247.
22. Gao J., Xu K., Liu H., Liu G., Bai M., Peng C., Li T., Yin Y. Impact of the gut microbiota on intestinal immunity mediated by tryptophan metabolism. *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, 2018, Vol. 8, 13. doi: 10.3389/fcimb.2018.00013.
23. Guzmán-Mejía F., Godínez-Victoria M., Vega-Bautista A., Pacheco-Yépez J., Drago-Serrano M.E. Intestinal homeostasis under stress siege. *Int. J. Mol. Sci.*, 2021, Vol. 22, no. 10, 5095. doi: 10.3390/ijms22105095.
24. Harrison O.J., Powrie F.M. Regulatory T cells and immune tolerance in the intestine. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, 2013, Vol. 5, no. 7, a018341. doi: 10.1101/cshperspect.a018341.
25. Hills R.D. Jr, Pontefract B.A., Mishcon H.R., Black C.A., Sutton S.C., Theberge C.R. Gut microbiome: profound implications for diet and disease. *Nutrients*, 2019, Vol. 11, no. 7, 1613. doi: 10.3390/nu11071613.
26. Holden V.I., Breen P., Houle S., Dozois C.M., Bachman M.A. *Klebsiella pneumoniae* siderophores induce inflammation, bacterial dissemination, and HIF-1 α stabilization during pneumonia. *mBio*, 2016, Vol. 7, no. 5, e01397-16. doi: 10.1128/mBio.01397-16.
27. Hsieh C.Y., Osaka T., Moriyama E., Date Y., Kikuchi J., Tsuneda S. Strengthening of the intestinal epithelial tight junction by bifidobacterium bifidum. *Physiol. Rep.*, 2015, Vol. 3, e12327. doi: 10.14814/phy2.12327.
28. Iacob S., Iacob D.G. Infectious threats, the intestinal barrier, and its trojan horse: dysbiosis. *Front Microbiol.*, 2019, Vol. 10, 1676. doi: 10.3389/fmicb.2019.01676.
29. Kayama H., Takeda K. Manipulation of epithelial integrity and mucosal immunity by host and microbiota-derived metabolites. *Eur. J. Immunol.*, 2020, Vol. 50, no. 7, pp. 921-931.
30. Laffont S., Siddiqui K.R., Powrie F. Intestinal inflammation abrogates the tolerogenic properties of MLN CD103⁺ dendritic cells. *Eur. J. Immunol.*, 2010, Vol. 40, no. 7, pp. 1877-1883.
31. Lederberg J. Infectious history. *Science*, 2000, Vol. 288, no. 5464, pp. 287-293.

32. Liu T., Wang S., Wornow M., Altman R.B. Construction of disease-specific cytokine profiles by associating disease genes with immune responses. *PLoS Comput. Biol.*, 2022, Vol. 18, no. 4, e1009497. doi: 10.1371/journal.pcbi.1009497.
33. Liu M., Nieuwdorp M., de Vos W.M., Rampanelli E. Microbial tryptophan metabolism tunes host immunity, metabolism, and extraintestinal disorders. *Metabolites*, 2022, Vol. 12, no. 9, 834. doi: 10.3390/metabo12090834.
34. Lo B.C., Chen G.Y., Núñez G., Caruso R. Gut microbiota and systemic immunity in health and disease. *Int. Immunol.*, 2021, Vol. 33, no. 4, pp. 197-209.
35. Martin-Gallausiaux C., Béguet-Crespel F., Marinelli L., Jamet A., Ledue F., Blottière H.M., Lapaque N. Butyrate produced by gut commensal bacteria activates TGF-beta1 expression through the transcription factor SP1 in human intestinal epithelial cells. *Sci Rep.*, 2018, Vol. 8, no. 1, 9742. doi: 10.1038/s41598-018-28048-y.
36. Martin-Gallausiaux C., Marinelli L., Blottière H.M., Larraufie P., Lapaque N. SCFA: mechanisms and functional importance in the gut. *Proc. Nutr. Soc.*, 2021, Vol. 80, no. 1, pp. 37-49.
37. Nezametdinova V.Z., Mavletova D.A., Alekseeva M.G., Chekalina M.S., Zakharevich N.V., Danilenko V.N. Species-specific ser-ine-threonine protein kinase Pkb2 of bifidobacterium longum subsp. Longum: genetic environment and substrate specificity. *Anaerobe*, 2018, Vol. 51, pp. 26-35.
38. Nezametdinova V.Z., Yunes R.A., Dukhinova M.S., Alekseeva M.G., Danilenko V.N. The role of the PFNA operon of bifidobacteria in the recognition of host's immune signals: prospects for the use of the FN3 protein in the treatment of COVID-19. *Int. J. Mol. Sci.*, 2021, Vol. 22, no. 17, 9219. doi: 10.3390/ijms22179219.
39. Nicolas G.R., Chang P.V. Deciphering the chemical lexicon of host-gut microbiota interactions. *Trends Pharmacol. Sci.*, 2019, Vol. 40, no. 6, pp. 430-445.
40. Nikiforov I.A. Geochemical classification by means of mapping resultants. *Geochem. Int.*, 2014, Vol. 52, no. 4, pp. 325-332.
41. Nogacka A.M., Oddi S., Salazar N., Reinheimer J.A., Gueimonde M., Vinderola G., de Los Reyes-Gavilán C.G. Intestinal immunomodulation and shifts on the gut microbiota of BALB/c mice promoted by two bifidobacterium and lactobacillus strains isolated from human samples. *Biomed Res. Int.*, 2019, Vol. 2019, 323540. doi: 10.1155/2019/2323540.
42. Perrotta G. The intestinal microbiota: Towards a multifactorial integrative model. Eubiosis and dysbiosis in morbid physical and psychological conditions. *Arch. Clin. Gastroenterol.*, 2021, Vol. 7, no. 2, pp. 024-035.
43. Rabe H., Lundell A.-C., Sjöberg F., Ljung A., Strömbeck A., Gio-Batta M., Maglio C., Nordström L., Andersson K., Nookaew I., Wold A.E., Adlerberth I., Rudin A. Neonatal gut colonization by Bifidobacterium is associated with higher childhood cytokine responses. *Gut Microbes*, 2020, Vol. 12, no.1, pp. 1-14.
44. Rivière A., Selak M., Lantin D., Leroy F., de Vuyst L. Bifidobacteria and butyrate-producing colon bacteria: importance and strategies for their stimulation in the human gut. *Front. Microbiol.*, 2016, Vol. 7, 979. doi: 10.3389/fmicb.2016.00979.
45. Sharon G., Garg N., Debelius J., Knight R., Dorrestein P.C., Mazmanian S.K. Specialized metabolites from the microbiome in health and disease. *Cell Metab.*, 2014, Vol. 20, no. 5, pp. 719-730.
46. Shehata E., Parker A., Suzuki T., Swann J.R., Suez J., Kroon P.A., Day-Walsh P. Microbiomes in physiology: insights into 21st-century global medical challenges. *Exp. Physiol.*, 2022, Vol. 107, no. 4, pp. 257-264.
47. Silva Y.P., Bernardi A., Frozza R.L. The Role of short-chain fatty acids from gut microbiota in gut-brain communication. *Front. Endocrinol.*, 2020, Vol. 1, 25. doi: 10.3389/fendo.2020.00025.
48. Sonnenburg J.L., Bäckhed F. Diet-microbiota interactions as moderators of human metabolism. *Nature*, 2016, Vol. 535, pp. 56-64.
49. Spari D., Beldi G. Extracellular ATP as an inter-kingdom signaling molecule: release mechanisms by bacteria and its implication on the host. *Int. J. Mol. Sci.*, 2020, Vol. 21, no. 15, 5590. doi: 10.3390/ijms21155590.
50. Sun M., Wu W., Liu Z., Cong Y. Microbiota metabolite short chain fatty acids, GPCR, and inflammatory bowel diseases. *J. Gastroenterol.*, 2017, Vol. 52, no. 1, pp. 1-8.
51. Telesford K.M., Yan W., Ochoa-Reparaz J., Pant A., Kircher C., Christy M. A., Begum-Haque S., Kasper D.L., Kasper L.H. A commensal symbiotic factor derived from *Bacteroides fragilis* promotes human CD39(+)Foxp3(+) T cells and Treg function. *Gut Microbes*, 2015, Vol. 6, no. 4, pp. 234-242.
52. Thaïss C.A., Levy M., Suez J., Elinav E. The interplay between the innate immune system and the microbiota. *Curr. Opin. Immunol.*, 2014, Vol. 26, pp. 41-48.
53. Turkina M.V., Vikström E. Bacteria-host crosstalk: sensing of the quorum in the context of pseudomonas aeruginosa infections. *J. Innate Immun.*, 2019, Vol. 11, no. 3, pp. 263-279.
54. Winter S.E. Lopez C.A., Bäumlér A.J. The dynamics of gut-associated microbial communities during inflammation. *EMBO Rep.*, 2013, Vol. 14, no. 4, pp. 319-327.
55. Yadav A.K., Tyagi A., Kumar A., Panwar S., Grover S., Saklani A.C., Hemalatha R., Batish V.K. Adhesion of lactobacilli and their anti-infectivity potential. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 2017, Vol. 57, no. 10, pp. 2042-2056.

56. Yang Y.H., Qian W., Hou X.H., Dai C.B. Bifidobacterium bifidum and Bacteroides fragilis induced differential immune regulation of enteric glial cells subjected to exogenous inflammatory stimulation. *Inflammation*, 2022. doi.org/10.1007/s10753-022-01700-6.

57. Yu R., Zuo F., Ma H., Chen S. Exopolysaccharide-producing *Bifidobacterium adolescentis* Strains with similar adhesion property induce differential regulation of inflammatory immune response in Treg/Th17 Axis of DSS-Colitis Mice. *Nutrients*, 2019, Vol. 11, no. 4, 782. doi: 10.3390/nu11040782.

58. Zhao L., Xie Q., Etareri Evivie S., Liu D., Dong J., Ping L., Liu F., Li B., Huo G. Bifidobacterium dentium N8 with potential probiotic characteristics prevents LPS-Induced intestinal barrier injury by alleviating the inflammatory response and regulating the tight junction in Caco-2 cell monolayers. *Food Funct.*, 2021, Vol. 12, pp. 7171-7184.

Авторы:

Бухарин О.В. — д.м.н., академик РАН, научный руководитель Института клеточного и внутриклеточного симбиоза Уральского отделения Российской академии наук ФГБУН «Оренбургский федеральный исследовательский центр» Уральского отделения Российской академии наук, г. Оренбург, Россия

Иванова Е.В. — д.м.н., доцент, ведущий научный сотрудник лаборатории инфекционной симбиологии, Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза Уральского отделения Российской академии наук ФГБУН «Оренбургский федеральный исследовательский центр» Уральского отделения Российской академии наук, г. Оренбург, Россия

Чайникова И.Н. — д.м.н., профессор, ведущий научный сотрудник лаборатории инфекционной симбиологии, Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза Уральского отделения Российской академии наук ФГБУН «Оренбургский федеральный исследовательский центр» Уральского отделения Российской академии наук, г. Оренбург, Россия

Перунова Н.Б. — д.м.н., профессор РАН, ведущий научный сотрудник лаборатории инфекционной симбиологии, Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза Уральского отделения Российской академии наук ФГБУН «Оренбургский федеральный исследовательский центр» Уральского отделения Российской академии наук, г. Оренбург, Россия

Authors:

Bukharin O.V., PhD, MD (Medicine), Full Member, Russian Academy of Sciences, Research Director, Institute of Cellular and Intracellular Symbiosis, Orenburg Federal Research Center, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Orenburg, Russian Federation

Ivanova E.V., PhD, MD (Medicine), Associate Professor, Leading Research Associate, Laboratory of Infectious Symbiology, Institute of Cellular and Intracellular Symbiosis, Orenburg Federal Research Center, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Orenburg, Russian Federation

Chaynikova I.N., PhD, MD (Medicine), Professor, Leading Research Associate, Laboratory of Infectious Symbiology, Institute of Cellular and Intracellular Symbiosis, Orenburg Federal Research Center, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Orenburg, Russian Federation

Perunova N.B., PhD, MD (Medicine), Professor, Russian Academy of Sciences, Leading Research Associate, Laboratory of Infectious Symbiology, Institute of Cellular and Intracellular Symbiosis, Orenburg Federal Research Center, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Orenburg, Russian Federation

Никифоров И.А. — к.г.-м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории инфекционной симбиологии, Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза Уральского отделения Российской академии наук ФГБУН «Оренбургский федеральный исследовательский центр» Уральского отделения Российской академии наук, г. Оренбург, Россия

Челпаченко О.Е. — д.м.н., профессор, ведущий научный сотрудник лаборатории инфекционной симбиологии, Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза Уральского отделения Российской академии наук ФГБУН «Оренбургский федеральный исследовательский центр» Уральского отделения Российской академии наук, г. Оренбург, Россия

Бондаренко Т.А. — научный сотрудник лаборатории инфекционной симбиологии, Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза Уральского отделения Российской академии наук ФГБУН «Оренбургский федеральный исследовательский центр» Уральского отделения Российской академии наук, г. Оренбург, Россия

Бекперженова А.В. — к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории инфекционной симбиологии, Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза Уральского отделения Российской академии наук ФГБУН «Оренбургский федеральный исследовательский центр» Уральского отделения Российской академии наук, г. Оренбург, Россия

Nikiforov I.A., PhD (Geology), Leading Research Associate, Laboratory of Infectious Symbiology, Institute of Cellular and Intracellular Symbiosis, Orenburg Federal Research Center, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Orenburg, Russian Federation

Chelpachenko O.E., PhD, MD (Medicine), Professor, Leading Research Associate, Laboratory of Infectious Symbiology, Institute of Cellular and Intracellular Symbiosis, Orenburg Federal Research Center, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Orenburg, Russian Federation

Bondarenko T.A., Research Associate, Laboratory of Infectious Symbiology, Institute of Cellular and Intracellular Symbiosis, Orenburg Federal Research Center, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Orenburg, Russian Federation

Bekpergenova A.V., PhD (Biology), Senior Research Associate, Laboratory of Infectious Symbiology, Institute of Cellular and Intracellular Symbiosis, Orenburg Federal Research Center, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Orenburg, Russian Federation

Поступила 07.12.2022
Принята к печати 20.02.2023

Received 07.12.2022
Accepted 20.02.2023

ЧАСТОТА ВСТРЕЧАЕМОСТИ АНТИТЕЛ К *HELICOBACTER PYLORI* СРЕДИ НАСЕЛЕНИЯ АЗЕРБАЙДЖАНА (ИРАН)

**Хамед Эбрахимзаде Лейлабадло, Сина Хамзезаде,
Парвин Сарбахш, Севда Зоги, Реза Готаслу**

Тебризский Медицинский университет, Табриз, Иран

Резюме. *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) является частой инфекцией, которая может приводить к развитию гастрита, язвы желудка и злокачественных опухолей в этой области. В данном исследовании мы изучали серопозитивность в отношении *H. pylori* по каждому классу иммуноглобулинов, а также их ассоциацию с полом и возрастом в выборке генеральной популяции Табриза (Иран).

В рамках этой работы обследованы 3733 участника, направленных в нашу лабораторию для тестирования в течение 2019-2022 гг. Иммуноферментная диагностика (ИФА) применялась для количественного выявления антител классов IgG, IgM и IgA к *H. pylori*. Статистический анализ проводили с помощью версии 20 пакета программ SPSS.

Из 3733 обследованных лиц 1235 (33,1%) были мужского пола и 2498 (66,9%) – женского. 57,9% участников имели позитивные тесты на антитела класса IgG. Для антител классов IgM и IgA к *H. pylori* этот показатель составил, соответственно, 0,3% и 11,6%. Средний возраст (\pm SD) составлял $40,72 \pm 16,91$ года. Не выявлено достоверной связи между полом и позитивностью тестов по IgG и IgA ($p = 0,11$ и $0,08$ соответственно). При исследовании антител класса IgM показана более высокая частота позитивных тестов у женщин (0,4% среди женщин и 0,2% среди мужчин; $p = 0,009$). Частота встречаемости положительных тестов по IgG также достоверно возростала (p -value $< 0,001$). При анализе частот антител классов IgM и IgA отмечено значительное повышение числа серопозитивных лиц с возрастом ($p = 0,005$ и $< 0,001$ соответственно).

Данное исследование показало, что частота выявления антител к *H. pylori* в Табризе составляет около 57%, что находится в пределах значений по Ирану в целом, но она выше, чем в развитых странах. Встречаемость всех классов антител против *H. pylori* достоверно увеличивается с возрастом.

Ключевые слова: *Helicobacter pylori*, антитела, серопозитивность, Табриз, Иран

Адрес для переписки:

Реза Готаслу
Центр исследования желудочно-кишечных болезней,
Медицинский университет
Табриз, Иран
Тел.: +98-41-33364661.
Факс: +98-41-33364661.
E-mail: rzgottaslo@yahoo.com

Address for correspondence:

Reza Ghotaslou
Liver and Gastrointestinal Diseases Research Center, Tabriz
University of Medical Sciences
Tabriz, Iran
Phone: +98-41-33364661.
Fax: +98-41-33364661.
E-mail: rzgottaslo@yahoo.com

Образец цитирования:

Хамед Эбрахимзаде Лейлабадло, Сина Хамзезаде,
Парвин Сарбахш, Севда Зоги, Реза Готаслу «Частота
встречаемости антител к *Helicobacter pylori* среди
населения Азербайджана (Иран)» // Медицинская
иммунология, 2023. Т. 25, № 6. С. 1389-1394.
doi: 10.15789/1563-0625-SOA-2605

© Хамед Эбрахимзаде Дейлабадло и соавт., 2023
Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

Hamed Ebrahimzadeh Leylabadlo, Sina Hamzehzadeh,
Parvin Sarbakhsh, Sevda Zoghi, Reza Ghotaslou
“Seroprevalence of anti-*Helicobacter pylori* antibodies
in population of Azerbaijan, Iran”, *Medical Immunology
(Russia)/Meditinskaya Immunologiya*, 2023, Vol. 25, no. 6,
pp. 1389-1394.

doi: 10.15789/1563-0625-SOA-2605

© Hamed Ebrahimzadeh Leylabadlo et al., 2023
The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License

DOI: 10.15789/1563-0625-SOA-2605

SEROPREVALENCE OF ANTI-*HELICOBACTER PYLORI* ANTIBODIES IN POPULATION OF AZERBAIJAN, IRAN

Hamed Ebrahimzadeh Leylabadlo, Sina Hamzehzadeh,
Parvin Sarbakhsh, Sevda Zoghi, Reza Ghotaslou

Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran

Abstract. *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) is a common infection which can lead to gastritis, peptic ulcer disease and gastric-originated malignancies. In this study prevalence of seropositivity of each immunoglobulins against *H. pylori* and also, their association with sex and age were evaluated in a sample of the ordinary population from Tabriz, Iran.

In this study, 3733 individuals referred to the laboratory for Para clinical tests between 2019 and 2022, participated. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was utilized to detect the quantity of anti-*H. pylori* Immunoglobulin G (IgG), Immunoglobulin M (IgM), and Immunoglobulin A (IgA). The statistical analysis was conducted using the 20th version of SPSS software.

Out of 3733 participants, 1235 (33.1%) were male and 2498 (66.9%) were female. 57.9% of the participants have positive IgG serology. Also, this index was 0.3% and 11.6% for IgM and IgA, respectively. The mean (SD) age was 40.72 (16.91). There was no significant relationship between gender and IgG and IgA positiveness (p-values = 0.11 and 0.08 respectively). For IgM, serum positiveness was higher in females (0.4% for females and 0.2% for males; p-value: 0.009). The prevalence of positive IgG was increasing significantly (p-value < 0.001). For IgM and IgA there was a significant increase in the number of seropositive individuals with an increase in age (p-value = 0.005; and < 0.001 respectively).

This study reveals that the prevalence of *H. pylori* in Tabriz is approximately 57% which is in the range estimated to be in Iran, but in comparison to developed countries, it was higher. The prevalence of anti-*H. pylori* immunoglobulins increases significantly with age.

Keywords: *Helicobacter pylori*, Immunoglobulins, seroprevalence, Tabriz, Iran

Introduction

Helicobacter pylori (*H. pylori*) is a common infection that affects gastric tissue and can lead to gastritis, peptic ulcer disease [11], and gastric-originated malignancies such as gastric adenocarcinoma and mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma (MALToma) [1, 6]. *H. pylori* infection is usually asymptomatic; therefore, most epidemiologic information originates from serologic-based studies [2]. There are several invasive and non-invasive methods to diagnose *H. pylori*. Invasive methods depend on endoscopic specimens that are used for histologic staining, polymerase chain reaction (PCR) testing, bacterial culture, and urease testing. Non-invasive methods include urea breath tests and anti-*H. pylori* serologic assays (qualitative or quantitative) stool antigen detecting [4, 14].

The prevalence of *H. pylori* infection depends on geographic area, age, race, and socioeconomic status [5, 12]. The distribution of *H. pylori* among various populations depends on the standards of public hygiene. It is imagined that in childhood *H. pylori* is transferred by the orofecal route from parents [16]. In developing countries, the infection commonly accrues in children and chronic infection continues into adulthood; however, in the developed

world infection is less in children and develops more commonly in adulthood [2]. Risk factors for *H. pylori* transmission encompass living in crowded places, living with infected individuals, and living in places with an unreliable supply of water [8, 12]. Age and sex are also suggested as factors associated with *H. pylori* infection [9]. A meta-analysis was conducted to quantify the relationship between sex and *H. pylori* infection and reported a male predominance of *H. pylori* infection both in children and adults; however, the need for future studies was also mentioned [7]. More prevalence of the infection in adults was also mentioned in previous studies [19]; however, the is limited evidence regards the rate of infection in different age groups in Iran.

For overcoming the mentioned limitations; in this study prevalence of seropositivity of each immunoglobulin against *H. pylori* and also, their association with sex and age were evaluated in a sample of the ordinary population from Tabriz, Iran.

Materials and methods

Ethical considerations

This study was conducted following the ethical principles mentioned in the Helsinki declaration. The ethics committee of Tabriz University of Medical

Sciences reviewed and approved all aspects of the study (n; 28577).

Participants

During this study from 2019 to 2022, 3733 individuals (either asymptomatic or symptomatic) referred to the laboratory for paraclinical tests, participated. All individuals were residents of Tabriz or nearby rural areas. Before sampling demographic information including sex and age was registered.

Sampling

Three milliliters of venous blood were drawn and stored in a refrigerator until laboratory evaluation. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA, Immunolab, German) method was utilized to detect the quantity of anti-*H. pylori* Immunoglobulin G (IgG), Immunoglobulin M (IgM), and Immunoglobulin A (IgA). The cut-off values were considered as following: negative (< 8), equivalent (8-12), and positive (> 12) results.

Statistics

The statistical analysis was conducted using the SPSS software version 25. The prevalence of seropositivity for each immunoglobulin was calculated and compared between males and females. Also, the trend of seropositivity in age groups was examined. To evaluate the relationship between age and the results of immunoglobulin assessments, individuals' age is divided into subgroups with 10 years intervals. The chi-square test and linear trend test were utilized to evaluate association between the prevalence of seropositivity and the sex and age groups respectively with a 0.05 level of significance for the p-value.

Results

In this study, 3733 individuals participated. The mean age of the patients was 40.72 and their median was 41.00 and 33.1 percentage of them were male. As it is shown in Table 1, 57.9% of the participants have positive IgG serology. Also, this index was 0.3% and 11.6% for IgM and IgA, respectively.

As presented in Table 2, the prevalence of positive IgG and IgA, was higher in males; however, there was no significant relationship between gender and IgG and IgA positiveness (p-values: 0.11 and 0.08 respectively). For IgM, serum positiveness was higher in females (0.4% for females and 0.2% for males) and there was a significant association (p-value: 0.009).

As it is shown in Table 3, the prevalence of positive IgG was increasing significantly with an increase in age (p-value < 0.001). For IgM, there was a significant increase in the number of seropositive individuals (p-value = 0.005). For IgA, also there was a significant increase in the number of seropositive participants with an increase in age (p-value < 0.001).

Also, we examine sex impact on seropositiveness in each age subgroups. For IgG, in some subgroups (for instance: 20-30, 60-70, > 70) we see significant difference between male and female in which seropositiveness is higher in males than females.

For IgM, we see significant difference between males and females in some age subgroups (for instance: For IgA, there is no positive case in some age subgroups, also, in other subgroups, there isn't significant difference between male and female.

TABLE 1. NUMBER AND RATE OF POSITIVE, EQUIVALENT, AND NEGATIVE RESULTS OF IMMUNOGLOBULIN ASSESSMENTS

Test result	IgG	IgM	IgA
Positive	1949 (57.9%)	8 (0.3%)	83 (11.6%)
Equivalent	417 (12.4%)	250 (10.1%)	97 (13.6%)
Negative	999 (29.7%)	2208 (89.5%)	533 (74.8%)

Note. IgG, Immunoglobulin G; IgM, Immunoglobulin M; IgA, Immunoglobulin A.

TABLE 2. NUMBER AND RATE OF POSITIVE, EQUIVALENT, AND NEGATIVE RESULTS OF IMMUNOGLOBULIN ASSESSMENTS IN MALES AND FEMALES

Test result	Sex subgroup	IgG	IgM	IgA
Positive	Male	634 (60.2%)	2 (0.2%)	44 (14.7%)
	Female	1315 (56.9%)	6 (0.4%)	39 (9.4%)
Equivalent	Male	115 (10.9%)	63 (7.6%)	41 (13.7%)
	Female	302 (13.1%)	187 (11.5%)	56 (13.5%)
Negative	Male	305 (28.9%)	768 (92.2%)	214 (71.6%)
	Female	694 (30.0%)	1440 (88.2%)	319 (77.1%)
p-value		0.11	< 0.01	0.08

Note. As for Table 1.

TABLE 3. NUMBER AND RATE OF POSITIVE, EQUIVALENT, AND NEGATIVE RESULTS OF IMMUNOGLOBULIN ASSESSMENTS IN DIFFERENT AGE GROUPS

Age group	Test result	IgG	IgM	IgA
≤ 10	Negative	101 (70.1%)	138 (88.5%)	61 (98.4%)
	Equivalent	15 (10.4%)	18 (11.5%)	1 (1.6%)
	Positive	28 (19.4%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)
11-20	Negative	165 (57.9%)	201 (84.8%)	50 (86.2%)
	Equivalent	32 (11.2%)	36 (15.2%)	6 (10.6%)
	Positive	88 (19.4%)	0 (0.0%)	2 (3.4%)
21-30	Negative	137 (32.3%)	254 (84.9%)	71 (84.5%)
	Equivalent	50 (11.8%)	43 (14.4%)	7 (8.3%)
	Positive	237 (55.9%)	2 (0.7%)	6 (7.1%)
31-40	Negative	190 (24.4%)	525 (88.8%)	100 (72.5%)
	Equivalent	84 (10.8%)	63 (10.7%)	18 (13.0%)
	Positive	504 (64.8%)	3 (0.5%)	20 (14.5%)
41-50	Negative	174 (22.5%)	498 (90.7%)	117 (73.6%)
	Equivalent	113 (14.6%)	50 (9.1%)	27 (17.0%)
	Positive	486 (62.9%)	1 (0.2%)	15 (9.4%)
51-60	Negative	121 (22.8%)	334 (93.3%)	71 (61.2%)
	Equivalent	79 (14.9%)	24 (6.7%)	25 (21.6%)
	Positive	330 (62.3%)	0 (0.0%)	20 (17.2%)
61-70	Negative	80 (25.1%)	187 (93.0%)	53 (66.3%)
	Equivalent	28 (8.8%)	13 (6.5%)	11 (13.8%)
	Positive	211 (66.1%)	1 (0.5%)	16 (20.0%)
≥ 71	Negative	31 (27.7%)	71 (94.7%)	10 (62.5%)
	Equivalent	16 (14.3%)	3 (4.0%)	2 (12.5%)
	positive	65 (58.0%)	1 (1.3%)	4 (25.0%)
p-value		< 0.01	< 0.01	< 0.01

Note. As for Table 1.

Discussion

This study was conducted to assess the rate of *H. pylori* immunoglobulin seropositivity in a sample of people in Tabriz, the capital city of East Azerbaijan Province in northwestern Iran. We found a significant association between positive IgM results and sex, which was more prevalent in females. Also, this study demonstrated an increasing number of seropositive individuals with aging.

Similar to our study, a study of *H. pylori* serology in 21,429 individuals during 2 years (2012 to 2014) in Tabriz city [13], revealed that seropositivity of *H. pylori* infection in Tabriz was 63.9% which is approximately compatible with our findings. Also, in the mentioned study, there wasn't a significant difference between males and females and it was indicated that by increasing age, the prevalence of IgG positiveness grows progressively which is compatible with our results.

By searching among other investigations all over the world, it can be concluded that age has a positive correlation with IgG positiveness which is known as the "cohort effect". This positive correlation is confirmed in our and other similar studies [17]. We must notice that the sampling of this study was taken from the ordinary population, not from highly probable gastric patients, which can affect the result.

Many studies were designed to determine the prevalence of *H. pylori* in Iran, also there is various conclusion among these studies. This rate is reported as 36.5% in Kurdistan [18], 44.5% in Sari [11], and 41% in patients with gastrointestinal disorders in Birjand [15]. According to a systematic review performed by Zamani in 2018 [19], the prevalence of *H. pylori* infection is estimated to be in the range of 55 to 69.9% in Iran. Our results were in this range (57%) too. This rate is higher than in developed countries which ranged between 30 to 50% [3]. Also, it was higher than in previous studies in other middle-eastern

counties such as the United Arab Emirates which was 41% in a sample of asymptomatic residents [10].

Our study demonstrated a significant association between sex and seropositivity of *H. pylori* IgM. A higher prevalence of *H. pylori* infection was mentioned in previous studies, too [10]. These results contradict a recent systematic review of the prevalence of *H. pylori*, which found no variations in *H. pylori* infection between males and females [19]. To comprehend the mechanisms through which sex may affect the acquisition and persistence of infection, future studies are required.

The prominent strength of our study is the high number of participants in comparison to similar studies, also, in this study, samples were selected from an general population. Other strengths were age- and sex-based analysis of all available Immunoglobulins distinctly. Unfortunately, because of lack of data for

participant's occupation, hygiene, smoking, and socio-economic status, the correlation between these items and *H. pylori* is not evaluated in this study.

Conclusion

In conclusion, our study reveals that the prevalence of *H. pylori* in Tabriz is approximately 57% which is in the range estimated to be in Iran, but in comparison to developed countries, it was higher. The prevalence of anti-*H. pylori* immunoglobulins increases significantly with age.

Acknowledgments

The authors would like to express their gratitude to the Liver and Gastrointestinal Diseases Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran.

References

1. Blecker U. *Helicobacter pylori* disease in childhood. *Clin. Pediatr. (Phila)*, 1996, Vol. 35, no. 4, pp. 175-183.
2. Brown L.M. *Helicobacter pylori*: Epidemiology and Routes of Transmission. *Epidemiol. Rev.*, 2000, Vol. 2, Iss. 2, pp. 283-297.
3. Burucoa C., Axon A. Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter*. 2017, Vol. 22, Suppl 1. doi: 10.1111/hel.12403.
4. Calvet X., Lehours P., Lario S., Mégraud F. Diagnosis of *Helicobacter pylori* Infection. *Helicobacter*, 2010, Vol. 15, no. s1, pp. 7-13.
5. Diaconu S., Predescu A., Moldoveanu A., Pop C.S., Fierbințeanu-Braticevici C. *Helicobacter pylori* infection: old and new. *J. Med. Life*, 2017, Vol. 10, no. 2, pp. 112-117.
6. Ghojzadeh M., Somi M.H., Naseri A., Salehi-Pourmehr H., Nikniaz Z., Hassannezhad S., Olia A.H., Kafshdouz L. Systematic review and meta-analysis of TP53, HER2/ERBB2, KRAS, APC, and PIK3CA genes expression pattern in gastric cancer. *Middle East J. Dig. Dis.*, 2022, Vol. 14, no. 3, pp. 335-345.
7. Ibrahim A., Morais S., Ferro A., Lunet N., Peleteiro B. Sex-differences in the prevalence of *Helicobacter pylori* infection in pediatric and adult populations: Systematic review and meta-analysis of 244 studies. *Dig. Liver Dis.*, 2017, Vol. 49, no. 7, pp. 742-749.
8. Kamboj A.K., Cotter T.G., Oxentenko A.S. *Helicobacter pylori*: The past, present, and future in management. *Mayo Clin. Proc.*, 2017, Vol. 92, no. 4, pp. 599-604.
9. Khan A.R. An age- and gender-specific analysis of *H. pylori* infection. *Ann. Saudi Med.*, 1998, Vol. 18, no. 1, pp. 6-8.
10. Khoder G., Muhammad J.S., Mahmoud I., Soliman S.S.M., Burucoa C. Prevalence of *Helicobacter pylori* and its associated factors among healthy asymptomatic residents in the united arab emirates. *Pathogens*, 2019, Vol. 8, no. 2, 44. doi: 10.3390/pathogens8020044.
11. Maleki I., Mohammadpour M., Zarrinpour N., Khabazi M., Mohammadpour R.A. Prevalence of *Helicobacter pylori* infection in Sari Northern Iran; a population based study. *Gastroenterol. Hepatol. Bed Bench*, 2019, Vol. 12, no. 1, pp. 31-37.
12. Mezmale L., Coelho L.G., Bordin D., Leja M. Review: Epidemiology of *Helicobacter pylori*. *Helicobacter*, 2020, Vol. 25, Suppl. 1, e12734. doi: 10.1111/hel.12734.
13. Mohammadzadeh N., Fard S. The seroepidemiology of *Helicobacter pylori* infection in Tabriz city. *Iran. J. Public Health*, 2014, Vol. 43, p. 22.
14. Patel S.K., Pratap C.B., Jain A.K., Gulati A.K., Nath G. Diagnosis of *Helicobacter pylori*: what should be the gold standard? *World J. Gastroenterol.*, 2014, Vol. 20, no. 36, pp. 12847-12859.
15. Shafaie E., Tavakoli Kareshk A., Namaei M.H., Rostami M. Seroepidemiology of *Helicobacter pylori* in patients with gastrointestinal disorders referring to Imam Reza Hospital in Birjand, Iran. *J. Birjand Univ. Med. Sci.*, 2021, Vol. 28, no. 1, pp. 70-76.
16. Sonnenberg A. Epidemiology of *Helicobacter pylori*. *Aliment. Pharmacol. Ther.*, 2022, Vol. 55, no. S1, pp. S1-S13.

17. Toscano E.P., Madeira F.F., Dutra-Rulli M.P., Gonçalves L.O.M., Proença M.A., Borghi V.S., Cadamuro A.C.T., Mazzale G.W., Acayaba R., Silva A.E. Epidemiological and clinical-pathological aspects of *Helicobacter pylori* infection in Brazilian children and adults. *Gastroenterol. Res. Pract.*, 2018, Vol. 2018, 8454125. doi: 10.1155/2018/8454125.
18. Yazdanpanah K., Rahimi E., Sharifian A., Eishi A. Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection in Kurdistan Province, 2006. *Sci. J. Kurdistan Univ. Med. Sci.*, 2009, Vol. 14, no. 1, pp. 1-8.
19. Zamani M., Ebrahimtabar F., Zamani V., Miller W.H., Alizadeh-Navaei R., Shokri-Shirvani J., Derakhshan M.H. Systematic review with meta-analysis: the worldwide prevalence of *Helicobacter pylori* infection. *Aliment. Pharmacol. Ther.*, 2018, Vol. 47, no. 7, pp. 868-876.

Авторы:

Хамед Эбрахимзаде Лейлабадло — к.м.н., Центр исследования желудочно-кишечных болезней Тебризского медицинского университета, Табриз, Иран

Сина Хамзезаде — к.м.н., Центр исследования желудочно-кишечных болезней Тебризского медицинского университета, Табриз, Иран

Парвин Сарбахши — к.м.н., кафедра статистики и эпидемиологии факультета здравоохранения Тебризского медицинского университета, Табриз, Иран

Севда Зоги — бакалавр, исследователь, Центр исследования желудочно-кишечных болезней, Тебризский Медицинский университет, Табриз, Иран

Реза Готаслу — д.м.н., Центр исследования желудочно-кишечных болезней Тебризского медицинского университета, Табриз, Иран

Authors:

Hamed Ebrahimzadeh Leylabadlo, PhD (Medicine), Liver and Gastrointestinal Diseases Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran

Sina Hamzehzadeh, MD (Medicine), Liver and Gastrointestinal Diseases Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran

Parvin Sarbakhsh, PhD (Medicine), Department of Statistics and Epidemiology, Faculty of Health, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran

Sevda Zoghi, B.S., Researcher, Liver and Gastrointestinal Diseases Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran

Reza Ghotaslou, PhD, MD (Medicine), Liver and Gastrointestinal Diseases Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran

Поступила 03.11.2022
Принята к печати 20.03.2023

Received 03.11.2022
Accepted 20.03.2023

ИЗМЕНЕНИЕ ЦИТОКИНОВОГО ПРОФИЛЯ КАПИЛЛЯРНОЙ И ВЕНОЗНОЙ КРОВИ БОЛЬНЫХ ПСОРИАЗОМ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ЛЕЧЕНИЯ

Сенникова С.В.¹, Топтыгина А.П.^{1,2}, Колобов А.А.³, Симбирцев А.С.⁴

¹ ФБУН «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Г.Н. Габричевского» Роспотребнадзора, Москва, Россия

² ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», Москва, Россия

³ ФГУП «Научно-исследовательский институт гигиены, профпатологии и экологии человека» Федерального медико-биологического агентства, Санкт-Петербург, Россия

⁴ ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов» Федерального медико-биологического агентства, Санкт-Петербург, Россия

Резюме. Псориаз — хроническое аутоиммунное заболевание кожи, с вовлечением Т-клеточного звена иммунитета. Цитокиновая ось интерлейкин IL-23/IL-17/IL-22 является ключевой в иммунопатогенезе псориаза. Показана роль подсемейства IL-36, регулирующего воспаление в коже. Для лечения псориаза используют топические препараты. Цель работы: изучение изменений в цитокиновом профиле венозной и капиллярной крови, взятой вблизи очага псориатического воспаления в зависимости от лечения топическими препаратами. Обследованы 40 пациентов с диагнозом псориаз, средний возраст 43,7 лет, группа 1а (20 чел.) получала местное лечение мометазоном, группа 1б (20 чел.) получала местно гель, содержащий рецепторный антагонист IL-36. 20 здоровых, средний возраст 46,6 года, составили контрольную группу 2. Капиллярную кровь собирали из пальца кисти, у больных рядом с очагом поражения 200 мкл в микровету с ЭДТА. Венозную кровь отбирали из локтевой вены 3 мл в вакуумную пробирку с ЭДТА. Концентрацию 15 цитокинов в плазме крови тестировали мультиплексным методом (MagPix, BioRad, США). Эффективность терапии оценивали с помощью индексов PASI и DLQI. На момент окончания лечения (14-й день) в обеих группах индексы PASI и DLQI значительно снизились. На 28-й день индекс PASI в группе 1а вернулся к исходному уровню, в группе 1б остался стабильно сниженным. До лечения в капиллярной крови больных псориазом уровни всех цитокинов кроме IL-10 были значительно повышены по сравнению с группой 2, в венозной крови были повышены уровни 5 цитокинов. Через 14 дней в группе 1а в капиллярной крови значительно снизились уровни IL-1, IL-4, IL-6, IL-21, IL-22, IL-23, IL-25, IL-33, а в венозной крови — только IL-17F, IL-21, IL-33 и TNF. На 28-й день концентрации практически всех цитокинов вернулись к исходному

Адрес для переписки:

Топтыгина Анна Павловна
ФБУН «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Г.Н. Габричевского» Роспотребнадзора
125212, Россия, Москва, ул. Адмирала Макарова, 10.
Тел.: 8 (495) 452-18-01.
Факс: 8 (495) 452-18-30.
E-mail: toptyginaanna@rambler.ru

Address for correspondence:

Anna P. Toptygina
G. Gabrichevsky Research Institute for Epidemiology and Microbiology
10 Adm. Makarov St
Moscow
125212 Russian Federation
Phone: +7 (495) 452-18-01.
Fax: +7 (495) 452-18-30.
E-mail: toptyginaanna@rambler.ru

Образец цитирования:

С.В. Сенникова, А.П. Топтыгина, А.А. Колобов, А.С. Симбирцев «Изменение цитокинового профиля капиллярной и венозной крови больных псориазом в зависимости от лечения» // Медицинская иммунология, 2023. Т. 25, № 6. С. 1395-1406.
doi: 10.15789/1563-0625-TDC-2592

© Сенникова С.В. и соавт., 2023

Эта статья распространяется по лицензии Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

S.V. Sennikova, A.P. Toptygina, A.A. Kolobov, A.S. Simbirtsev
“Treatment-dependent changes in cytokine profile of capillary and venous blood in patients with psoriasis”, *Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2023, Vol. 25, no. 6, pp. 1395-1406.
doi: 10.15789/1563-0625-TDC-2592

© Sennikova S.V. et al., 2023

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

DOI: 10.15789/1563-0625-TDC-2592

уровню. В группе 1б на 14-й день в капиллярной крови значительно снизились уровни $IFN\gamma$, IL-1, IL-4, IL-17F, IL-21, IL-22, IL-23, IL-25, IL-33, а в венозной крови – $IFN\gamma$, IL-21, IL-22, IL-23, IL-33. На 28-й день продолжалось снижение концентрации либо сохранялся сниженный уровень указанных цитокинов, в вене значительно снизился IL-6. Таким образом, метод определения профиля цитокинов капиллярной крови из зоны псориазического поражения можно использовать для мониторинга эффекта лечения у больных псориазом.

Ключевые слова: псориаз, цитокины, капиллярная кровь, венозная кровь, топические препараты, рецепторный антагонист IL-36, глюкокортикоидные гормоны

TREATMENT-DEPENDENT CHANGES IN CYTOKINE PROFILE OF CAPILLARY AND VENOUS BLOOD IN PATIENTS WITH PSORIASIS

Sennikova S.V.^a, Toptygina A.P.^{a, b}, Kolobov A.A.^c, Simbirtsev A.S.^d

^a G. Gabrichevsky Research Institute for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation

^b Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation

^c Research Institute of Human Hygiene, Occupational Pathology and Ecology, St. Petersburg, Russian Federation

^d State Research Institute of Highly Pure Biopreparations, St. Petersburg, Russian Federation

Abstract. Psoriasis is a chronic autoimmune skin disease with affected T-cell immunity. The interleukin IL-23/IL-17/IL-22 cytokine axis is a key to immunopathogenesis of psoriasis. Certain role of the IL-36 subfamily is shown in regulation of skin inflammation. Topically applied preparations are used to treat psoriasis. Our aim was to evaluate the treatment-related changes in the cytokine profile of venous and capillary blood collected close to the foci of psoriatic inflammation. Forty patients with psoriasis (mean age, 43.7 years), were examined. Group 1a (20 people) received local treatment with Mometasone, Group 1b (20 people) received topical gel containing an IL-36 receptor antagonist. Twenty healthy people (mean age, 46.6 years) comprised the control group 2. 200- μ L aliquots of capillary blood were collected in a microvette with EDTA from the patients' finger near to the lesion area. Venous blood (3 mL) was taken from the cubital vein to a vacuum tube with EDTA. The concentration of 15 cytokines in blood plasma was tested by the multiplex method (MagPix, BioRad, USA). Clinical effectiveness of therapy was assessed using the PASI and DLQI indexes. Upon completion of treatment (day 14), the PASI and DLQI indices were significantly decreased in both groups. On the 28th day, the PASI index in Group 1a returned to its original level, in group 1b it remained permanently reduced. Before treatment, the levels of all cytokines, except of IL-10, were significantly increased in capillary blood samples of patients with psoriasis compared to Group 2, and the levels of five cytokines were increased in the venous blood. In group 1a, the levels of IL-1, IL-4, IL-6, IL-21, IL-22, IL-23, IL-25, IL-33 were significantly decreased in capillary blood after 14 days, and only IL-17F, IL-21, IL-33 and TNF showed a decrease in the venous blood specimens. On the day +28, the concentrations of almost all cytokines returned to their original level. In Group 1b, on the 14th day, the levels of $IFN\gamma$, IL-1, IL-4, IL-17F, IL-21, IL-22, IL-23, IL-25, IL-33 were significantly decreased in capillary blood compared to altered $IFN\gamma$, IL-21, IL-22, IL-23, IL-33 in venous blood. On the 28th day, their concentration continued to decrease, or the level of these cytokines remained reduced, along with significant decrease of IL-6 in venous samples. Thus, the method for determining cytokine profile in capillary blood from the area of psoriatic lesions may be used for tracing the effects of therapy in psoriatic patients.

Keywords: psoriasis, cytokines, capillary blood, venous blood, topical drugs, IL-36 receptor antagonist, glucocorticoid hormones

Введение

Система цитокинов – универсальный язык межклеточного общения. Он понятен не только всем клеткам иммунной системы, но также

и эпителиальным клеткам, эндотелию сосудов, фибробластам и многим другим типам клеток. Воспалительная реакция сопровождается выраженными изменениями цитокинового профиля. Псориаз – хроническое воспалительное заболе-

вание кожи, имеющее аутоиммунную природу с вовлечением, преимущественно, Т-клеточного звена иммунитета, при котором изменения в цитокиновом профиле достаточно хорошо изучены [5, 19]. На данный момент считается доказанным, что цитокиновая ось интерлейкин IL-23/IL-17/IL-22 является ключевой в иммунопатогенезе псориаза [20, 24, 25]. Однако этими тремя интерлейкинами участие цитокиновой сети в развитии патологического воспаления в коже при псориазе не исчерпывается. Например, была показана роль системы про- и противовоспалительных цитокинов в развитии этого заболевания [11]. Эти исследования послужили основанием для использования антицитокиновых моноклональных антител для лечения псориаза [6, 23]. Относительно недавно была показана ключевая роль подсемейства IL-36, включающего провоспалительные IL-36 α , IL-36 β и особенно патогномичный для псориаза IL-36 γ , образующих петлю положительной обратной связи, поддерживающую псориазическое воспаление, и противовоспалительный рецепторный антагонист (IL-36ra), который блокирует рецептор для IL-36 и останавливает воспаление [14, 30]. Показано, что мутации в IL-36ra, подавляющие его активность, приводят к крайне тяжелым генерализованным формам псориаза [16]. Считают, что блокирование рецептора для IL-36 является перспективным направлением для терапии этого заболевания [3, 29, 31]. Следует отметить, что сведения об изменении концентрации цитокинов при псориазе получены из венозной крови или при культивировании клеток из кожного биоптата. При этом местные изменения в цитокиновом профиле непосредственно в зоне псориазической бляшки нивелируются уровнем цитокинов в целом организме, а культивирование клеток *in vitro* не вполне соответствует событиям *in vivo*. Более того, взятие гистологического материала из псориазической бляшки травматично и не может быть использовано для динамического наблюдения в процессе лечения. Ранее нами было показано, что в капиллярной крови, взятой рядом с очагом псориазического воспаления, выявляются более выраженные отклонения от здорового контроля в концентрации большего числа цитокинов, чем в венозной крови тех же пациентов [4]. Терапия антицитокиновыми препаратами больных с псориазом также проводится системно. Помимо терапевтического эффекта в очагах псориазического воспаления, такая терапия нарушает регуляцию иммунитета в целом, затрудняя его защитные функции [26]. Поэтому использование топических антицитокиновых препаратов обладает рядом преимуществ.

Исходя из всего вышесказанного, **целью настоящей работы** было изучение изменений в цитокиновом профиле венозной и капиллярной крови, взятой вблизи очага псориазического воспаления в зависимости от лечения топическими препаратами.

Материалы и методы

В рамках простого сравнительного проспективного исследования были обследованы 40 пациентов (29 мужчин и 11 женщин). Диагноз был установлен согласно клинико-anamnestическим критериям Российских клинических рекомендаций по диагностике и лечению псориаза. Критериями включения в исследование были: клинически подтвержденный псориаз, прогрессирующая стадия легкой и средней степени тяжести, возраст 18-70 лет. Средний возраст составил $43,7 \pm 2,33$ года. Для оценки эффективности терапии использовали индекс PASI (Psoriasis Area and Severity Index). При этом степень выраженности симптомов и площадь поражения оценивается врачом в баллах, затем баллы суммируются. Также использовали Дерматологический индекс качества жизни DLQI (Dermatology Life Quality Index), оценку влияния заболевания на качество жизни проводит сам пациент и результат также выражается в баллах. В контрольную группу вошли 20 практически здоровых взрослых (14 мужчин и 6 женщин), средний возраст $46,6 \pm 2,38$ года. Исследование одобрено локальным этическим комитетом (протокол № 52 от 29.01.2020), обследованные подписывали информированное согласие. Группа пациентов была разделена на две подгруппы. Пациенты группы 1a (20 человек) получали стандартную терапию: 0,1% крема мометазона локально на очаги поражения 1 раз в сутки на протяжении 14 дней. За период применения препарата было выявлено 1 нежелательное явление в виде чувства жжения в месте нанесения в момент первого применения препарата, самопроизвольно исчезнувшее в течение 30 минут и более не возникавшее при повторном нанесении препарата. У пациентов группы 1б (20 человек) была выявлена стойкая резистентность к предшествующей терапии топическими глюкокортикоидными препаратами. В качестве нового терапевтического подхода предложен гель, содержащий 0,4% рекомбинантного IL-36ra (RAIL-36 гель). Аппликация производилась локально на очаги поражения 1 раз в сутки на протяжении 14 дней. Гель разработан и предоставлен для исследования ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов» ФМБА. Никаких нежелательных явлений за период применения препарата выявлено не было. Пациенты оценивали нанесение

препарата как комфортное. Препарат быстро впитывался в кожу, не оставлял следов, не имел неприятного запаха.

Капиллярную кровь брали из пальца кисти у здоровых однократно, а у больных псориазом вблизи очага с клиническими проявлениями до лечения, на 14-й и 28-й день в объеме 200 мкл в микровету (Microvette 200 K3 EDTA). Венозную кровь из локтевой вены брали в те же сроки в вакуумную пробирку с ЭДТА в объеме 3 мл. Плазму крови получали путем отстаивания проб крови, разливали по 50 мкл в пробирки типа Эппендорф, замораживали и хранили при -30°C . Цитокины в плазме крови (IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-10, IL-17A, IL-17F, IL-21, IL-22, IL-23, IL-25, IL-33, IFN γ , TNF) определяли мультиплексным методом (MagPix, BioRad, США) с использованием коммерческих тест-систем Th17-Plex, согласно инструкции производителя.

Полученные результаты были подвергнуты статистическим методам обработки. Для исследуемых параметров была подтверждена гипотеза о нормальности распределения признаков методом Колмогорова–Смирнова. Вычисляли среднее арифметическое и ошибку среднего ($M \pm SE$), различия между группами оценивали с помощью параметрического t-критерия Стьюдента. Уровень $p < 0,05$ считали значимым.

Результаты

Клиническую оценку эффективности проводимой терапии осуществляли на основании индексов PASI (выраженность симптомов оценивается врачом) и DLQI (влияние заболевания на качество жизни оценивается пациентом). В таблице 1 представлены изменения индекса PASI. Из таблицы видно, что на момент вхождения в исследование, различий по степени выраженности симптомов между группами 1а и 1б не было. На момент окончания лечения в обеих группах выявлено значимое снижение индекса PASI ($p < 0,05$). При этом в группе 1а снижение составило 34,43%, а в группе 1б – 58,11%, различия между группами 1а и 1б на этом сроке наблюдения оказались значимыми ($p < 0,05$). К 28-му дню наблюдений (14-й день от завершения терапии) в группе 1а средний индекс PASI вернулся к исходному уровню, тогда как в группе 1б индекс PASI остался стабильным на уровне окончания лечения, различия между группами были значимы ($p < 0,05$). Следовательно, при использовании топических глюкокортикостероидов клинический эффект наблюдается только в процессе лечения, а при завершении терапии, достигнутый результат нивелируется. В то же время, при использовании геля RAIL-36 отмечается пролонги-

рованный результат, сохраняющийся по крайней мере 2 недели.

Индекс качества жизни дерматологических пациентов (DLQI) довольно чувствителен к стадии обострения и ремиссии псориаза. В таблице 2 представлены результаты оценки по индексу DLQI. Более выраженная удовлетворенность результатами лечения была в группе 1б, где индекс DLQI снизился на 61,04%, тогда как в группе 1а отмечено снижение индекса всего на 18,13%, различия оказались значимыми ($p < 0,05$). Следовательно, по мнению пациентов, RAIL-36 гель действует существенно лучше, чем топические стероиды.

Лабораторную оценку эффективности проводимой терапии осуществляли по изменению концентрации 15 изученных нами цитокинов в плазме капиллярной и венозной крови. В таблице 3 представлены исходные уровни цитокинов в капиллярной и венозной крови больных псориазом до начала лечения в сравнении с группой здоровых. До начала лечения в капиллярной крови больных псориазом уровни всех представленных в таблице цитокинов, кроме IL-10, были значимо повышены по сравнению со здоровым контролем, тогда как в венозной крови значимое повышение концентрации цитокинов было выявлено только для IL-4, IL-21, IL-23, TNF и sCD40L, а уровень IL-31 был значимо снижен ($p < 0,05$).

На рисунке 1 представлены изменения концентраций цитокинов-маркеров основных субпопуляций CD4⁺T-клеток. Из рисунка видно, что цитокины-маркеры основных субпопуляций T-хелперов реагировали на проводимое лечение. Однако в венозной крови группы 1а (см. рисунок 1Б) отмечалось значимое снижение только IL-21 (цитокин-маркер Tfh) с $13,78 \pm 1,22$ до $5,49 \pm 0,51$ пг/мл на 14-й день от начала лечения, но спустя 2 недели уровень этого цитокина резко поднялся до $19,15 \pm 1,77$ пг/мл, превысив и без того повышенный исходный уровень. В капиллярной крови группы 1а (см. рисунок 1А) было выявлено больше изменений. Так, на 14-й день (завершение терапии) выявлено значимое снижение IL-21 (Tfh) с $55,68 \pm 5,15$ до $29,79 \pm 3,01$ пг/мл и IL-22 (Th22) с $13,19 \pm 1,11$ до $6,99 \pm 0,64$ пг/мл, но через 2 недели после завершения лечения уровни этих цитокинов вновь вернулись к исходно повышенному уровню. IL-23 (Th17) снизился с $26,71 \pm 2,32$ до $14,92 \pm 1,31$ пг/мл и оставался на этом уровне спустя 2 недели, тогда как IL-17A, также продуцируемый Th17, оставался без изменений повышенным. IL-4 (Th2), значимо снизился только к 28-му дню с $15,40 \pm 1,47$ пг/мл до $8,93 \pm 0,88$ пг/мл ($p < 0,05$). Уровень IL-10 никак не реагировал на проводимое лечение ни в капиллярной, ни в венозной крови.

ТАБЛИЦА 1. ИЗМЕНЕНИЕ ИНДЕКСА PASI В ПРОЦЕССЕ ЛЕЧЕНИЯ (M±SE)

TABLE 1. CHANGE IN THE PASI INDEX DURING TREATMENT (M±SE)

Группа Group	День Day 0	День Day 14	День Day 28
Группа 1а Group 1a	9,99±0,44	6,55±0,55*	9,01±0,43
Группа 1б Group 1b	11,03±0,58	4,62±0,30*	4,47±0,31*

Примечание. * – p < 0,05 по сравнению с исходным уровнем.

Note. *, p < 0.05 compared to the baseline.

ТАБЛИЦА 2. ИЗМЕНЕНИЕ ИНДЕКСА КАЧЕСТВА ЖИЗНИ DLQI (M±SE)

TABLE 2. CHANGE IN THE QUALITY-OF-LIFE INDEX DLQI (M±SE)

Группа Group	День Day 0	День Day 14
Группа 1а Group 1a	11,86±0,78	9,71±1,04
Группа 1б Group 1b	12,45±0,60	4,85±0,35

Примечание. * – p < 0,05 по сравнению с исходным уровнем.

Note. *, p < 0.05 compared to the baseline.

В крови пациентов группы 1б также были выявлены значимые изменения цитокинового профиля. Так, в капиллярной крови (см. рис. 1В) на 14-й день (окончание терапии) значимо снизился IFN γ (Th1) с 15,23±1,33 пг/мл до 10,96±0,97 пг/мл и продолжал оставаться неотличимым от уровня группы здоровых на 28-й день (9,34±0,91 пг/мл). Аналогично уровень IL-23 (Th17) значимо снизился на 14-й день с 22,69±2,01 пг/мл до

14,83±1,26 пг/мл и продолжал снижаться, достигнув на 28-й день уровня 10,18±0,99 пг/мл (p < 0,05), хотя все еще превышал значимо уровень контрольной группы (p < 0,05). Тогда как концентрация IL-17A, другого цитокина субпопуляции Th17, значимо не менялась и не отличалась от контрольного уровня. В то же время концентрация IL-21 (Tfh) значимо прогрессивно снижалась с 40,04±4,12 пг/мл до 28,44±2,73 пг/мл

ТАБЛИЦА 3. ЦИТОКИНОВЫЙ ПРОФИЛЬ ВЕНОЗНОЙ И КАПИЛЛЯРНОЙ КРОВИ ЗДОРОВЫХ И БОЛЬНЫХ ПСОРИАЗОМ (пг/мл)

TABLE 3. CYTOKINE PROFILE IN VENOUS AND CAPILLARY BLOOD OF HEALTHY PEOPLE AND PATIENTS WITH PSORIASIS (pg/mL)

	Группа 1а Group 1a		Группа 1б Group 1b		Здоровые Healthy	
	Капилляр Capillary	Вена Vein	Капилляр Capillary	Вена Vein	Капилляр Capillary	Вена Vein
IL-1	57,34±5,44*	1,48±0,15	21,18±2,13*	1,27±0,13	1,89±0,21	1,39±0,17
IL-4	15,40±1,47*	5,79±0,51*	12,59±1,22*	5,48±0,52*	2,53±0,31	2,77±0,35
IL-6	7,45±0,72*	3,75±0,33	5,68±0,55	2,79±0,26	4,13±0,43	3,22±0,33
IL-10	3,67±0,35	1,90±0,18	3,36±0,32	1,74±0,17	4,24±0,53	2,13±0,29
IL-17A	5,48±0,51*	1,38±0,12	2,68±0,24*	1,53±0,15	1,36±0,17	1,02±0,14
IL-17F	23,48±2,12*	9,38±1,01	25,23±2,34*	11,01±1,05	12,53±1,53	11,97±1,68
IL-21	55,68±5,15*	13,78±1,22*	40,04±4,12*	14,06±1,34*	7,99±1,11	7,87±0,99
IL-22	13,19±1,11*	2,49±0,21	11,34±1,02*	2,84±0,23	4,52±0,46	3,88±0,37
IL-23	26,71±2,32*	9,37±0,89*	22,69±2,01*	10,87±1,09*	6,86±0,89	7,35±0,95
IL-25	4,68±0,43*	1,60±0,15	4,49±0,33*	1,23±0,11	1,77±0,23	1,11±0,18
IL-31	519,41±47,28	389,33±35,24*	504,26±48,38	220,60±21,73*	571,28±41,78	517,33±40,76
IL-33	44,19±4,12*	20,93±1,97	50,56±4,78*	21,26±1,82	19,20±2,11	18,47±2,18
IFN γ	16,54±1,32*	8,73±0,81	15,23±1,33*	9,33±0,91	11,6±1,28	10,03±1,17
TNF	10,35±0,99*	7,68±0,72*	10,28±0,95*	4,85±0,43*	2,12±0,29	1,16±0,19
sCD40L	806,89±77,23*	1454,93±98,64*	711,51±67,31*	504,56±49,25*	340,34±32,13	334,51±31,11

Примечание. * – p < 0,05 по сравнению с группой здоровых.

Note. *, p < 0.05 compared with the healthy group.

на 14-й день и до $16,92 \pm 1,53$ пг/мл на 28-й день ($p < 0,05$), хотя все еще значимо превышала соответствующий параметр здоровой группы. Цитокины IL-4 (Th2) и IL-22 (Th22) также снижались под действием терапии, достигая к 28-му дню значимых различий: $8,63 \pm 0,82$ пг/мл и $7,04 \pm 0,66$ пг/мл по сравнению с исходным уровнем $12,59 \pm 1,22$ пг/мл и $11,34 \pm 1,02$ пг/мл, соответственно ($p < 0,05$). Важно, что уровень IL-10 (цитокин-маркер Treg) не менялась в процессе лечения и не отличалась от уровня в контрольной группе. В венозной крови (см. рис. 1Г) концентрация IFN γ значимо снизилась на 14-й день с $9,33 \pm 0,91$ пг/мл до $6,52 \pm 0,63$ пг/мл и на 28-й день до $5,64 \pm 0,54$ пг/мл, что было даже значимо ниже уровня контрольной группы ($p < 0,05$). Уровень IL-23 значимо снизился с $10,87 \pm 1,09$ пг/мл на 14-й день до $8,44 \pm 0,82$ пг/мл, а на 28-й день до $7,01 \pm 0,69$ пг/мл, что значимо не отличалось от соответствующего показателя группы здоровых. Концентрация IL-21 значимо снизилась с $14,06 \pm 1,34$ пг/мл до $5,49 \pm 0,52$ пг/мл на 14-й день и оставался на уровне $5,43 \pm 0,51$ пг/мл на 28-й день наблюдения, что было значимо ниже контрольного уровня ($p < 0,05$). IL-22 также значимо снизился ниже контрольного уровня на 14-й день до $1,66 \pm 0,15$ пг/мл и на 28-й день — $1,63 \pm 0,15$ пг/мл ($p < 0,05$). Концентрация IL-4 не менялась в результате лечения, оставаясь повышенной ($p < 0,05$). Уровни IL-17A и IL-10 также не менялись по результатам лечения, не отличаясь от контрольной группы.

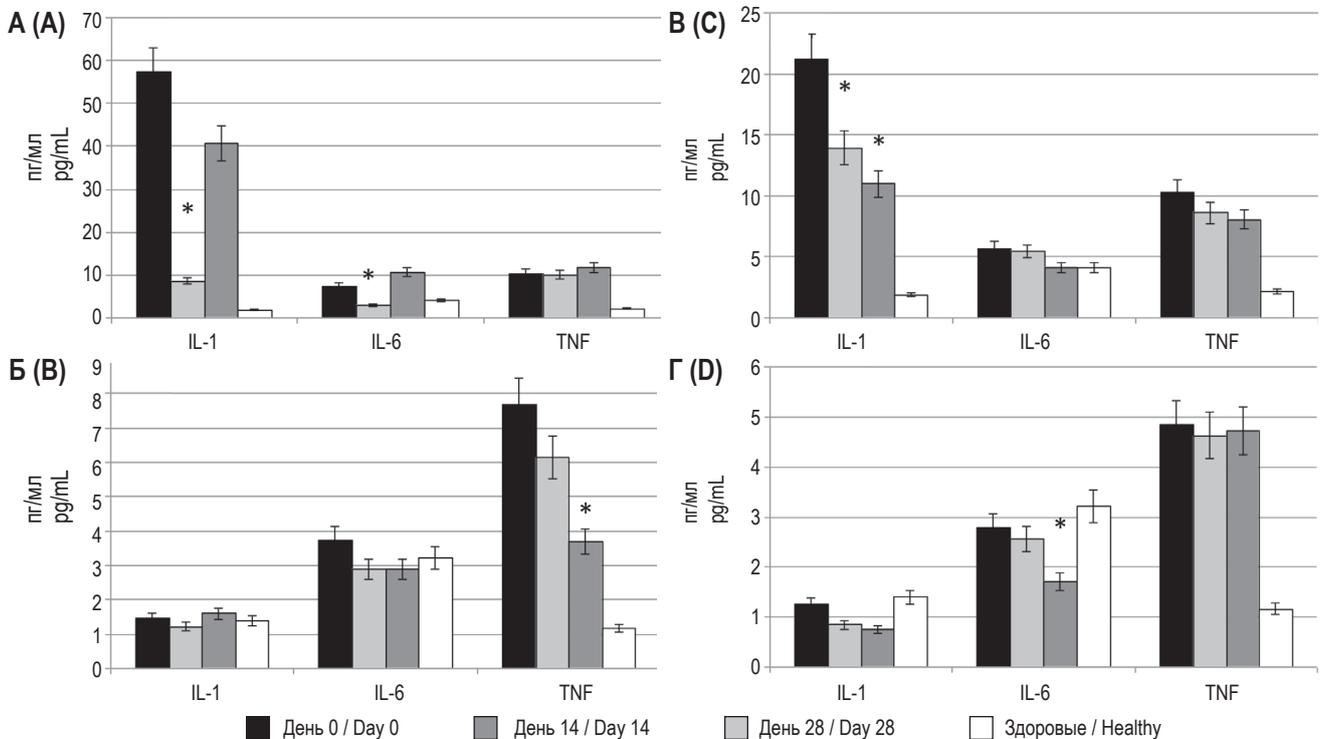
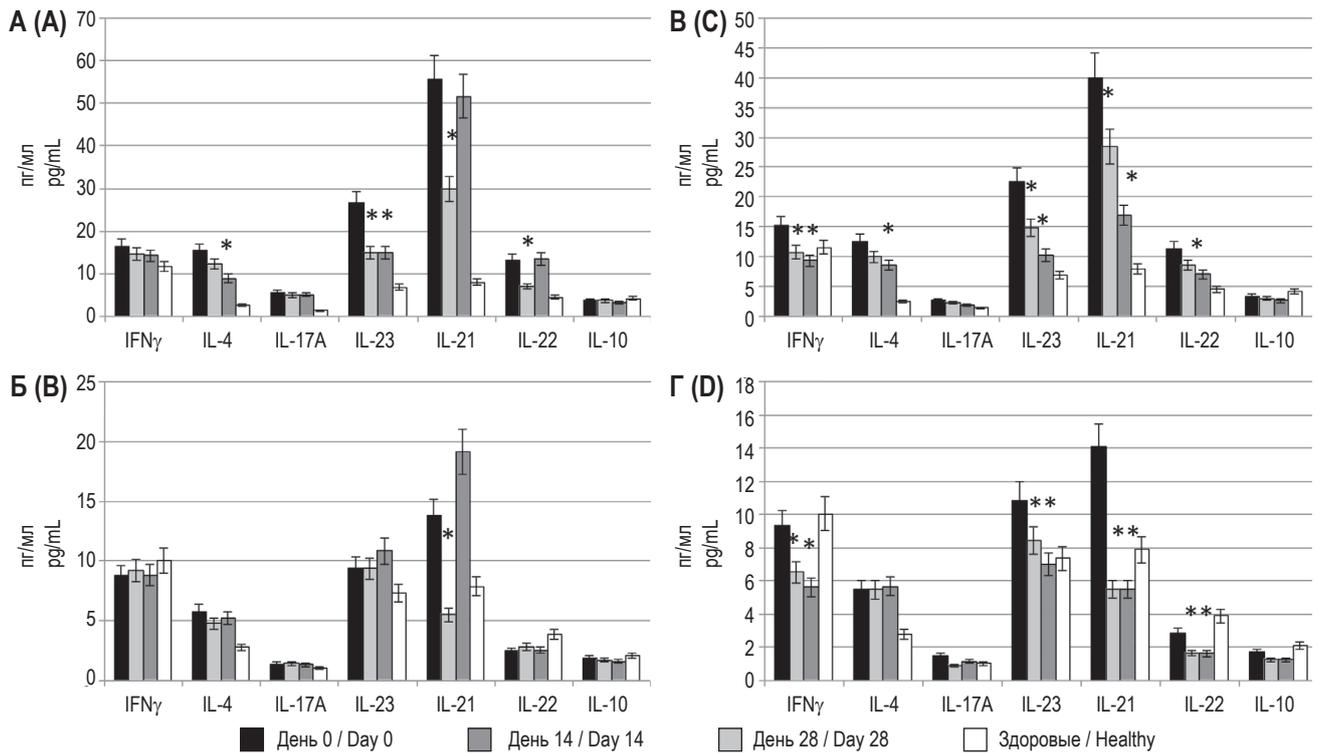
На рисунке 2 представлены изменения провоспалительных цитокинов. В группе 1a в капиллярной крови (см. рис. 2А) уровень IL-1 β , исходно превышавший уровень в контрольной группе более чем в 30 раз, значимо снижался на 14-й день до $8,63 \pm 0,74$ пг/мл, хотя все еще превышал контрольный уровень в 4,6 раза. Спустя 2 недели после лечения он вновь поднялся до $40,69 \pm 4,08$ пг/мл ($p < 0,05$). Концентрация другого провоспалительного цитокина, IL-6, изначально превышавшая соответствующий показатель контрольной группы в 1,8 раза также снизилась на 14-й день до $3,02 \pm 0,29$ пг/мл, не отличаясь от уровня группы здоровых. Однако спустя 2 недели после лечения также повысилась до $10,63 \pm 1,24$ пг/мл, превышая уже и исходный уровень в этой группе. При этом уровень TNF оставался повышенным и никак не менялся в процессе лечения. Интересно, что в венозной крови (см. рис. 2Б) концентрация IL-1 β и IL-6, изначально не отличавшаяся от группы здоровых, никак не менялась в процессе лечения. Тогда как уровень TNF, изначально превышавший контрольные цифры в 6,6 раза, снизился через 14 дней до $6,14 \pm 0,59$ пг/мл, а еще через 2 недели —

до $3,69 \pm 0,31$ пг/мл, значимо отличаясь от исходного, но все еще значимо превышая здоровый уровень ($p < 0,05$).

В группе 1б в капиллярной крови (см. рис. 2В) отмечено значимое снижение уровня IL-1 β с $21,18 \pm 2,13$ пг/мл до $13,94 \pm 1,24$ пг/мл на 14-й день и до $10,98 \pm 1,1$ пг/мл на 28-й день, что все еще значимо превышало уровень в контрольной группе. Уровень IL-6 значимо не отличался от контрольной группы и не менялся в результате лечения, а концентрация TNF оставалась значимо повышенной, несмотря на лечение. В венозной крови (см. рис. 2Г) концентрация IL-1 β не отличалась от соответствующего параметра группы здоровых, а TNF оставалась значимо повышенной. Оба параметра не менялись в процессе лечения. Концентрация IL-6 исходно не отличалась от уровня контрольной группы, но значимо снижалась до $1,71 \pm 0,19$ пг/мл на 28-й день наблюдения.

На рисунке 3 представлены цитокины, участвующие в защите эпителия. Показано, что в группе 1a в капиллярной крови (см. рис. 3А) на 14-й день отмечено значимое снижение концентрации IL-25 и IL-33 с $4,68 \pm 0,43$ пг/мл до $2,69 \pm 0,24$ пг/мл и с $44,19 \pm 4,12$ пг/мл до $22,59 \pm 2,08$ пг/мл соответственно. Достигнутые уровни значимо не отличались от соответствующих параметров контрольной группы. Однако спустя 2 недели после лечения уровни этих цитокинов вновь поднялись до $6,47 \pm 0,59$ пг/мл и $46,07 \pm 4,41$ пг/мл, значимо не отличаясь от исходного уровня. Интересно, что эти цитокины выделяют поврежденные эпителиальные клетки. В то же время цитокин IL-17F, который относится к цитокинам Th17, но отвечающий также за защиту эпителиальных клеток от инфекций, оставался повышенным, не реагируя на лечение. В венозной крови (см. рис. 3Б) обнаружено, напротив, значимое ($p < 0,05$) снижение концентрации IL-17F с $9,38 \pm 1,01$ пг/мл до $4,97 \pm 0,51$ пг/мл на 14-й день и $5,57 \pm 0,52$ пг/мл на 28-й день наблюдения, что было значимо ниже уровня контрольной группы ($p < 0,05$). Также выявлено значимое снижение концентрации IL-33 на 14-й день с $20,93 \pm 1,97$ пг/мл до $14,03 \pm 1,16$ пг/мл и подъем до $16,58 \pm 1,49$ пг/мл на 28-й день, что значимо не отличалось от контрольного уровня. Концентрация IL-25 значимо не менялась в ответ на лечение и не отличалась от уровня контрольной группы.

В группе 1б концентрация IL-25 в капиллярной крови значимо снизилась с $4,49 \pm 0,33$ пг/мл до $2,87 \pm 0,27$ пг/мл и $2,29 \pm 0,21$ пг/мл на 14-й и 28-й день наблюдений соответственно (см. рис. 3В), тогда как в венозной крови уровень этого цитокина не отличался от показателя здоровой группы и не менялся в процессе ле-



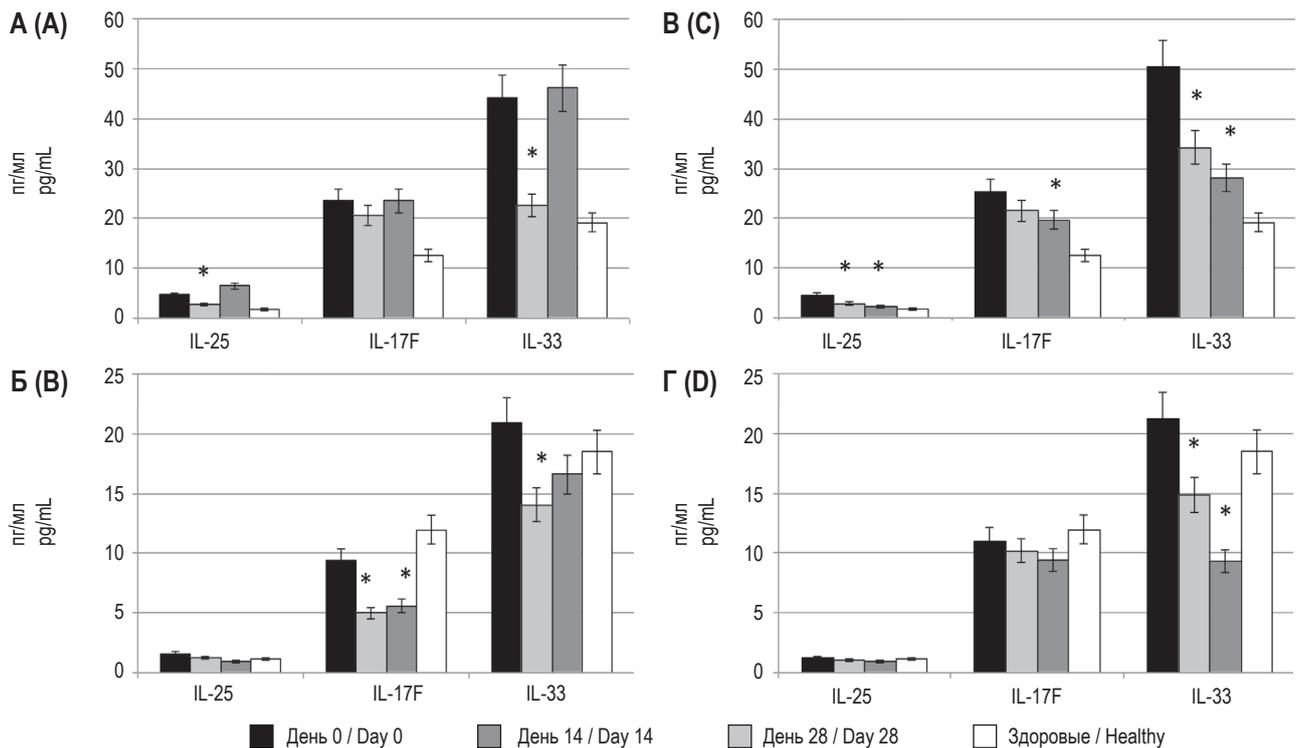


Рисунок 3. Динамика концентраций цитокинов, вовлеченных в защиту кератиноцитов, в зависимости от лечения

Примечание. См. примечание к рисунку 1.

Figure 3. Dynamics of cytokines involved in the protection of keratinocytes concentrations depending on the treatment

Note. As for Figure 1.

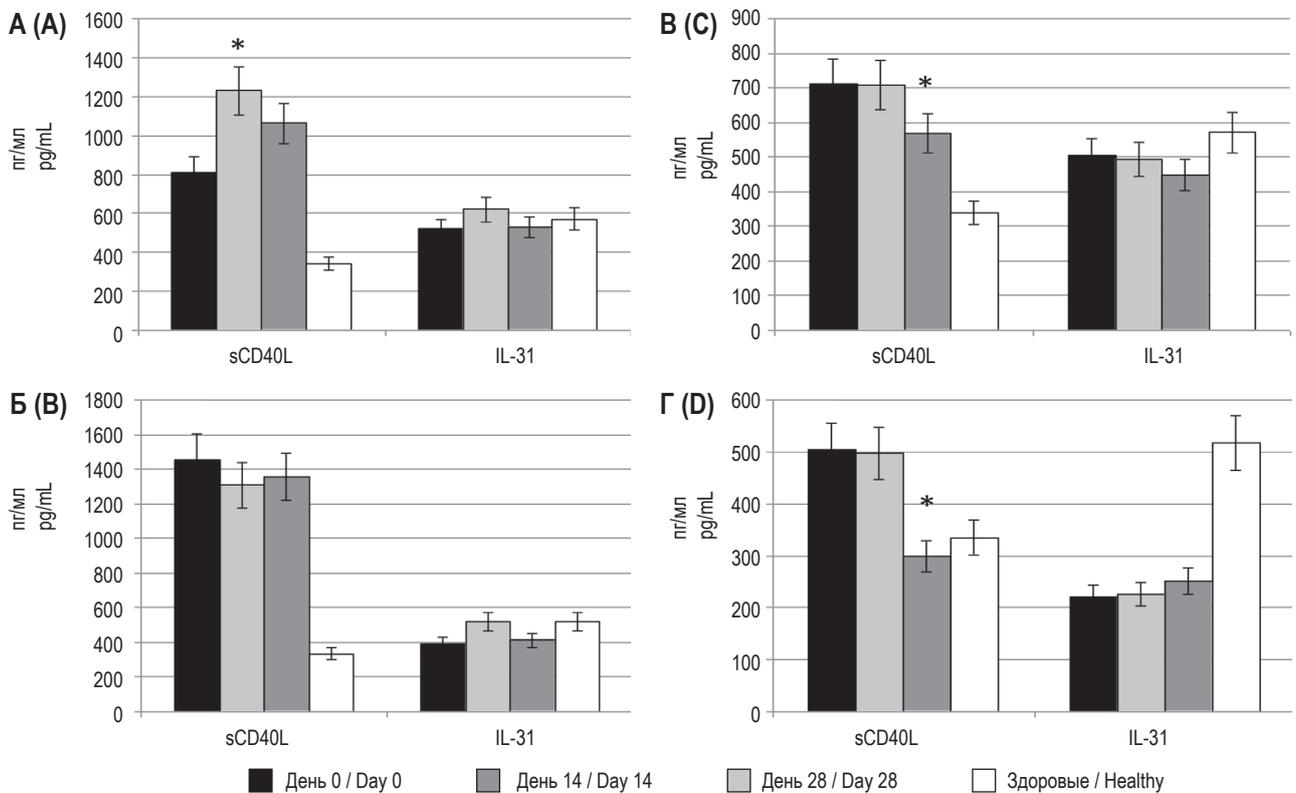


Рисунок 4. Динамика концентраций sCD40L и IL-31 в зависимости от лечения

Примечание. См. примечание к рисунку 1.

Figure 4 Dynamics of sCD40L and IL-31 concentrations depending on the treatment

Note. As for Figure 1.

чения (см. рис. 3Г). Концентрация IL-33 прогрессивно снижалась в капиллярной крови с $50,56 \pm 4,78$ пг/мл до $34,24 \pm 3,05$ пг/мл на 14-й день и до $28,15 \pm 2,31$ пг/мл на 28-й день, но все еще не достигая уровня контрольной группы ($p < 0,05$). Тогда как уровень этого цитокина в венозной крови значимо снижался с $21,26 \pm 1,82$ пг/мл до $14,83 \pm 1,11$ пг/мл на 14-й день и до $9,29 \pm 1,01$ пг/мл, что было даже значимо ниже соответствующего уровня группы здоровых ($p < 0,05$). Уровень IL-17F в капиллярной крови также снижался с $25,23 \pm 2,34$ пг/мл, достигая к 28-му дню значимых различий ($19,69 \pm 1,93$ пг/мл), $p < 0,05$. В то же время в венозной крови концентрация IL-17F значимо не отличалась от контрольной группы и не менялась в процессе лечения.

На рисунке 4 представлена динамика изменений двух оставшихся цитокинов. Интересно, что IL-31 никак не менялся в процессе лечения ни в группе 1а, ни в 1б. Что касается уровня sCD40L, то в группе 1а он значимо превышал уровень контрольной группы и даже еще повысился в капиллярной крови после лечения. В группе 1б уровень этого цитокина значимо ($p < 0,05$) снизился на 28-й день как в капиллярной, так и венозной крови.

Обсуждение

Оценивая эффективность лечения по изменениям индекса PASI, хорошо видно, что оба препарата приводили к снижению выраженности симптомов заболевания на момент окончания лечения, но спустя 2 недели после отмены препаратов в группе 1а уровень индекса практически возвращался к исходному, тогда как в группе 1б сниженный уровень индекса сохранялся спустя 2 недели после отмены препарата. По оценке самими больными индекс качества жизни (чем ниже, тем лучше) DLQI снизился в группе 1а в 1,24 раза, а в группе 1б – в 2,57 раза. Это свидетельствует о лучшей оценке пациентами полученного эффекта в группе 1б по сравнению с группой 1а.

Сопоставляя результаты лечения больных псориазом по данным, полученным в капиллярной и венозной крови, установили, что в капиллярной крови изменения касались большего количества цитокинов, чем в венозной крови. В группе 1а в капиллярной крови на момент окончания лечения (14 дней) обнаружены значимые снижения концентрации цитокинов-маркеров основных субпопуляций хелперов IL-4(Th2), IL-21(Tfh), IL-22(Th22), IL-23(Th17), а в вене – только IL-21. Учитывая вовлеченность этих субпопуляций и цитокинов в иммунопатогенез псориаза, такое снижение активности следует расценивать как положительный терапевтический эффект [18].

Однако спустя 2 недели после окончания лечения концентрации большинства этих цитокинов вернулись вновь к исходному уровню. Уровни провоспалительных цитокинов IL-1 β и IL-6 в капиллярной крови продемонстрировали аналогичную динамику: снизились на 14-й день и вернулись к исходному на 28-й день исследования. Цитокины, вырабатываемые поврежденными кератиноцитами IL-25 и IL-33 в капиллярной крови, также снижались в конце лечения и поднимались спустя 2 недели. Эти результаты хорошо коррелируют с клинической оценкой результатов лечения по индексам PASI и DLQI. Аналогичные результаты при лечении пациентов с псориазом топическими глюкокортикоидами были получены ранее. Так, было показано, что в результате терапии топическими глюкокортикоидами снижается продукция таких цитокинов, как IL-1, IL-2, IL-3, IL-5, IL-6, IL-8, IL-11, IL-12, TNF [10]. К сожалению, эффект глюкокортикоидных гормонов при лечении псориаза непродолжителен, что было показано рядом исследователей [2, 13, 28].

В группе 1б в капиллярной крови в результате лечения наблюдались значимые снижения цитокинов-маркеров IFN γ (Th1), IL-4(Th2), IL-21(Tfh), IL-22(Th22), IL-23(Th17), в венозной крови также были снижены все перечисленные цитокины, кроме IL-4. Важно, что это снижение наблюдалось на момент окончания лечения (14-й день) и сохранялось спустя 2 недели после лечения. Снижение концентраций основных цитокинов-маркеров субпопуляций Т-клеток, вовлеченных в псориазическое воспаление [12], несомненно, следует расценивать как положительный терапевтический эффект, пролонгированный, по крайней мере, на 2 недели после окончания лечения. Провоспалительные цитокины IL-1 β и IL-6 также были снижены на 14-й и 28-й день наблюдения, как и маркеры поражения кератиноцитов (IL-25 и IL-33). При сопоставлении изменений концентраций цитокинов в группе 1б с клинической картиной по индексам PASI и DLQI выявлено, что эти индексы значимо снижались на 14-й день и оставались на этом уровне спустя 2 недели, синхронно с изменением цитокинового профиля.

Интересные результаты были получены для цитокинов, которые не рассматривались ранее как важные игроки в иммунопатогенезе псориаза. Так известно, что в зоне псориазического воспаления уровень IL-25 превышает соответствующий уровень в здоровой коже, особенно в базальном и супрабазальном слое эпидермиса. Этот цитокин стимулировал M2 макрофаги для привлечения нейтрофилов, формирующих микроабсцессы Мунро [27]. Также в сыворотке венозной крови

больных псориазом было показано повышение уровня IL-33, по сравнению с контролем, а при лечении метотрексатом на фоне улучшения состояния кожи этот уровень снижался [9, 21]. Эти данные, несомненно, свидетельствуют о том, что IL-25 и IL-33 вовлечены в иммунопатогенез псориаза, однако считают, что у этих цитокинов разная роль. Если IL-25 активно участвует в остром воспалении и формировании псориазического воспаления, то у IL-33, скорее, протективная роль [8]. Снижение изначально повышенных концентраций этих цитокинов в капиллярной крови в зоне псориазического воспаления является признаком положительного эффекта проводимой терапии: снижение уровня IL-25 говорит о снижении активности псориазического воспаления, а снижение IL-33 свидетельствует об уменьшении повреждения кератиноцитов. Интересно, что уровень IL-31, который считают ответственным за чувство зуда при atopическом дерматите, никак не менялся в процессе лечения. Показано, что при псориазе выраженность зуда не связана с уровнем IL-31, и его роль, видимо, иная, чем при atopическом дерматите, в то же время полагают, что зуд при псориазе обусловлен повышенным уровнем IL-33 [7].

Известно, что гиперпродукция IL-36 у больных псориазом [15] или недостаточная эффективность его рецепторного антагониста [16] формируют петлю обратной положительной связи, которая поддерживает ось IL-17/IL-23/IL-22 и способствует воспалению кожи при псориазе,

но и сами цитокины IL-17/IL-23 и их биологическое действие индуцируется IL-36 [22]. Использование для терапии псориаза геля RAIL-36, содержащего рекомбинантный рецепторный антагонист IL-36, который является естественным блоком рецептора для IL-36 и разрывает эту петлю, поддерживающую псориазическое воспаление, приводит к нормализации цитокинового профиля и разрешению воспаления [1, 17].

Заключение

Исходя из изложенного, можно заключить, что исследование капиллярной крови, взятой близко к очагу псориазического поражения кожи, более информативно, чем венозной крови. Предложенный нами метод определения профиля цитокинов капиллярной крови из зоны псориазического поражения можно использовать для мониторинга эффекта лечения у больных псориазом. Он существенно менее травматичный, чем гистологический метод взятия кожного биоптата и более информативный, чем исследование венозной крови. Выявленные отклонения в цитокиновом профиле капиллярной крови из зоны псориазического воспаления отражают особенности иммунопатогенеза псориаза на местном уровне и хорошо коррелируют с ранее описанными характеристиками воспаления в псориазической бляшке. Оба исследованных препарата пригодны для лечения псориаза, однако необходимы дополнительные исследования для подбора наиболее эффективных схем терапии.

Список литературы / References

1. Колобов А.А., Сазонова Т.А., Александров Г.В., Петров А.В. Модель псориазоподобного поражения кожи у мышей при внутрикожном введении рекомбинантного ИЛ-36γ человека // Российский иммунологический журнал, 2019. Т. 13 (22), № 2. С. 807-809. [Kolobov A.A., Sazonova T.A., Alexandrov G.N., Petrov A.V. The model of psoriasisiform dermatitis in mice induced by intradermal administration of recombinant human IL-36γ. *Rossiyskiy immunologicheskii zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2019, Vol. 13 (22), no. 2, pp. 807-809. (In Russ.)] doi: 10.31857/S102872210006690-4.
2. Кунгуров Н.В., Филimonkova Н.Н., Кохан М.М., Зильберберг Н.В., Топычканова Е.П., Куклин И.А., Киселева Н.В. Оптимизация терапии больных вульгарным псориазом с учетом нарушений липидного обмена и коморбидной сердечно-сосудистой патологии. Учебное пособие. Екатеринбург, 2014. 18 с. [Kungurov N.V., Filimonkova N.N., Kokhan M.M., Zilberberg N.V., Topychkanova E.P., Kuklin I.A., Kiseleva N.V. Optimization of therapy in patients with psoriasis vulgaris, taking into account lipid metabolism disorders and comorbid cardiovascular pathology. Textbook]. Yekaterinburg, 2014. 18 p.
3. Сенникова С.В., Топтыгина А.П. Семейство интерлейкина 36 как новый регулятор воспалительного ответа в барьерных тканях // Медицинская иммунология, 2020. Т. 22, № 1. С. 49-60. [Sennikova S.V., Toptygina A.P. Interleukin-36 family as a novel regulator of inflammation in the barrier tissues *Meditsinskaya Immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2020, Vol. 22, no. 1, pp. 49-60. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-IFA-1880.
4. Сенникова С.В., Топтыгина А.П., Семикина Е.Л., Закиров Р.Ш., Акулова С.С. Субпопуляционный состав мононуклеаров и цитокиновый профиль венозной и капиллярной крови больных псориазом и здоровых людей // Медицинская иммунология, 2021. Т. 23, № 6. С. 1333-1346. [Sennikova S.V., Toptygina A.P., Semikina E.L., Zakirov R.Sh., Akulova S.S. Mononuclear subsets and cytokine profile of venous and capillary blood in patients with psoriasis and healthy people. *Meditsinskaya Immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2021, Vol. 23, no. 6, pp. 1333-1346. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-MSA-2391.

5. Afonina I.S., van Nuffel E., Beyaert R. Immune responses and therapeutic options in psoriasis. *Cell. Mol. Life Sci.*, 2021, Vol. 78, pp. 2709-2727. doi: 10.1007/s00018-020-03726-1.
6. Armstrong A.W., Read C. Pathophysiology, clinical presentation, and treatment of psoriasis: A review. *JAMA*, 2020, Vol. 323, pp. 1945-1960.
7. Bodoor K., Al-Qarqaz F., Heis L.A., Alfaqih M.A., Oweis A.O., Almomani R., Obeidat M.A. IL-33/13 Axis and IL-4/31 axis play distinct roles in inflammatory process and itch in psoriasis and atopic dermatitis. *Clin. Cosmet. Investig. Dermatol.*, 2020, Vol. 13, pp. 419-424.
8. Borgia F., Custurone P., Peterle L., Pioggia G., Gangemi S. Role of epithelium-derived cytokines in atopic dermatitis and psoriasis: evidence and therapeutic perspectives. *Biomolecules*, 2021, Vol. 11, 1843. doi:10.3390/biom11121843.
9. Borsky P., Fiala Z., Andrys C., Beranek M., Hamakova K., Malkova A., Svadlakova T., Krejsek J., Palicka V., Borska L., Rehacek V. Alarmins HMGB1, IL-33, S100A7, and S100A12 in Psoriasis Vulgaris. *Mediat. Inflamm.*, 2020, Vol. 2020, 8465083. doi: 10.1155/2020/8465083.
10. Cato A.C., Nestl A., Mink S. Rapid actions of steroid receptors in cellular signaling pathways. *Sci. STKE*, 2002, Vol. 138, re9. doi: 10.1126/stke.2002.138.re9.
11. Chiricozzi A., Guttman-Yassky E., Suarez-Farinas M., Nogales K.E., Tian S., Cardinale I., Chimenti S., Krueger J.G. Integrative responses to IL-17 and TNF-alpha in human keratinocytes account for key inflammatory pathogenic circuits in psoriasis. *J. Invest. Dermatol.*, 2011, Vol. 131, pp. 677-687.
12. Chiricozzi A., Romanelli P., Volpe E., Borsellino G., Romanelli M. Scanning the Immunopathogenesis of Psoriasis. *Int. J. Mol. Sci.*, 2018, Vol. 19, no. 1, 179. doi:10.3390/ijms19010179.
13. Clark R.A. Gone but not forgotten: lesional memory in psoriatic skin. *J. Invest. Dermatol.*, 2011, Vol. 131, pp. 283-285. doi: 10.1038/jid.2010.374.
14. Debets R., Timans J.C., Homey B., Zurawski S., Sana T.R., Lo S., Wagner J., Edwards G., Clifford T., Menon S., Bazar J.F., Kastelein R.A. Two novel IL-1 family members, IL-1 delta and IL-1 epsilon, function as an antagonist and agonist of NF-kappa B activation through the orphan IL-1 receptor-related protein 2. *J. Immunol.*, 2001, Vol. 167, pp. 1440-1446. doi:10.4049/jimmunol.167.3.1440.
15. D'Erme A.M., Wilsman-Theis D., Wagenpfeil J., Hölzel M., Ferring-Schmitt S., Sternberg S., Wittmann M., Peters B., Bosio A., Bieber T., Wenzel J. IL-36γ (IL-1F9) is a biomarker for psoriasis skin lesions. *J. Invest. Dermatol.*, 2015, Vol. 135, pp. 1025-1032.
16. Farooq M., Nakai H., Fujimoto A., Fujikawa H., Matsuyama A., Kariya N., Aizawa A., Fujiwara H., Ito M., Shimomura Y. Mutation analysis of the IL36RN gene in 14 Japanese patients with generalized pustular psoriasis. *Hum. Mutat.*, 2013, Vol. 34, pp. 176-183.
17. Ganesan R., Raymond E.L., Mennerich D., Woska J.R., Caviness G., Grimaldi C., Ahlberg J., Perez R., Roberts S., Yang D., Jerath K., Truncali K., Frego L., Sepulveda E., Gupta P., Brown S.E., Howell M.D., Canada K.A., Kroe-Barrett R., Fine J.S., Singh S., Mbow M.L. Generation and functional characterization of anti-human and anti-mouse IL-36R antagonist monoclonal antibodies. *MAbs*, 2017, Vol. 9, pp. 1143-1154.
18. Hirahara K., Nakayama T. CD4⁺T-cell subsets in inflammatory diseases: Beyond the Th1/Th2 paradigm. *Int. Immunol.*, 2016, Vol. 28, pp. 163-171.
19. Korman N.J. Management of psoriasis as a systemic disease: What is the evidence? *Br. J. Dermatol.* 2020, Vol. 182, 840. doi: 10.1111/bjd.18245.
20. Lowes M.A., Kikuchi T., Fuentes-Duculan J., Cardinale I., Zaba L.C., Haider A.S., Bowman E.P., Krueger J.G. Psoriasis vulgaris lesions contain discrete populations of Th1 and Th17 T cells. *J. Invest. Dermatol.*, 2008, Vol. 128, no. 5, pp. 1207-1211.
21. Meephansan J., Subpayasarn U., Ponnikorn S., Chakkavittumrong P., Juntongjin P., Komine M., Ohtsuki M., Poovorawan Y. Methotrexate, but not narrowband ultraviolet B radiation, suppresses interleukin-33 mRNA levels in psoriatic plaques and protein levels in serum of patients with psoriasis. *J. Dermatol.* 2017, Vol. 45, pp. 322-325.
22. Nakagawa S., Matsumoto M., Katayama Y., Oguma R., Wakabayashi S., Nygaard T., Saijo, Inohara N., Otto M., Matsue H, Nunez G., Nakamura Y. Staphylococcus aureus virulent PSMα peptides induce keratinocyte alarmin release to orchestrate IL-17-dependent skin inflammation. *Cell Host Microbe*, 2017, Vol. 22, pp. 667-677.e5.
23. Petit R.G., Cano A., Ortiz A., Espina M., Prat J., Muñoz M., Severino P., Souto E.B., García M.L., Pujol M., Sánchez-López E. Psoriasis: from pathogenesis to pharmacological and nano-technological-based therapeutics. *Int. J. Mol. Sci.*, 2021, Vol. 22, 4983. doi: 10.3390/ijms22094983.
24. Rendon A., Schäkel K. Psoriasis pathogenesis and treatment. *Int. J. Mol. Sci.*, 2019, Vol. 20, 1475. doi: 10.3390/ijms20061475.
25. Santini S.M., Lapenta C., Donati S., Spadaro F., Belardelli F., Ferrantini M. Interferon-α-conditioned human monocytes combine a TH1-orienting attitude with the induction of autologous TH17 responses: role of IL-23 and IL-12. *PLoS One*, 2011, Vol. 6, no. 2, e.17364. doi:10.1371/journal.pone.0017364.
26. Schadler E.D., Ortel B., Mehlis S.L. Biologics for the primary care physician: Review and treatment of psoriasis. *Dis. Mon.*, 2019, Vol. 65, no. 3, pp. 51-90.
27. Senra L., Stalder R., Martinez D.A., Chizzolini C., Boehncke W.-H., Brembilla N.C. Keratinocyte-derived IL-17E contributes to inflammation in psoriasis. *J. Investig. Dermatol.*, 2016, Vol. 136, pp. 1970-1980.
28. Suarez-Farinas M., Fuentes-Duculan J., Lowes M.A., Krueger J.G. Resolved psoriasis lesions retain expression of a subset of disease-related genes. *J. Invest. Dermatol.*, 2011, Vol. 131, pp. 391-400.

29. Tortola L., Rosenwald E., Abel B., Blumberg H., Schafer M., Coyle A.J., Renauld J.C., Werner S., Kisielow J., Kopf M. Psoriasisform dermatitis is driven by IL-36-mediated DC-keratinocyte crosstalk. *J. Clin. Invest.*, 2012, Vol. 122, pp. 3965-3976.
30. Towne J.E., Garka K., Renshaw B.R., Virca G.D., Sims J.E. Interleukin (IL)-1F6, IL-1F8, and IL-1F9 signal through IL-1Rrp2 and IL-1RAcP to activate the pathway leading to NF-kappa B and MAPKs. *J. Biol. Chem.*, 2004, Vol. 279, pp. 13677-13688.
31. Towne J.E., Renshaw B.R., Douangpanya J., Lipsky B.P., Shen M., Gabel C.A., Sims J.E. Interleukin-36 (IL-36) ligands require processing for full agonist (IL-36 α , IL-36 β and IL-36 γ) or antagonist (IL-36Ra) activity. *J. Biol. Chem.*, 2011, Vol. 286, pp. 42594-42602.

Авторы:

Сенникова С.В. — аспирант лаборатории цитокинов ФБУН «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Г.Н. Габричевского» Роспотребнадзора, Москва, Россия

Топтыгина А.П. — д.м.н., главный научный сотрудник, руководитель лаборатории цитокинов ФБУН «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Г.Н. Габричевского» Роспотребнадзора; профессор кафедры иммунологии ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», Москва, Россия

Колобов А.А. — к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории химии пептидов ФГУП «Научно-исследовательский институт гигиены, профпатологии и экологии человека» Федерального медико-биологического агентства, Санкт-Петербург, Россия

Симбирцев А.С. — д.м.н., профессор, член-корр. РАН, научный руководитель ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов» Федерального медико-биологического агентства, Санкт-Петербург, Россия

Authors:

Sennikova S.V., Postgraduate Student, Laboratory of Cytokines, G. Gabrichevsky Research Institute for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation

Toptygina A.P., PhD, MD (Medicine), Chief Research Associate, Head, Laboratory of Cytokines, G. Gabrichevsky Research Institute for Epidemiology and Microbiology; Professor, Department of Immunology, Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation

Kolobov A.A., PhD (Biology), Senior Research Associate, Laboratory of Peptide Chemistry, Research Institute of Human Hygiene, Occupational Pathology and Ecology, St. Petersburg, Russian Federation

Simbirtsev A.S., PhD, MD (Medicine), Professor, Corresponding Member, Russian Academy of Sciences, Research Director, State Research Institute of Highly Pure Biopreparations, St. Petersburg, Russian Federation

Поступила 12.10.2022
Принята к печати 08.11.2022

Received 12.10.2022
Accepted 08.11.2022

ПРОДУКЦИЯ ЦИТОКИНОВ КЛЕТКАМИ КРОВИ И ОБРАЗЦАМИ ОПУХОЛИ, И ЕЕ СОПРЯЖЕННОСТЬ С ЭКСПРЕССИЕЙ микроРНК У ПАЦИЕНТОВ С РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Студеникина А.А.^{1,2}, Перепечаева М.Л.^{1,2}, Михайлова Е.С.^{1,2},
Вараксин Н.А.³, Аутеншлюс А.И.^{1,2}

¹ ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Новосибирск, Россия

² Научно-исследовательский институт молекулярной биологии и биофизики ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины», г. Новосибирск, Россия

³ АО «Вектор-Бест», г. Новосибирск, Россия

Резюме. Опухоли молочной железы имеют сложную структуру и отличаются высокой гетерогенностью. Исследование цитокинов, оказывающих большое влияние на опухолевые клетки и микроРНК, которые, помимо собственного влияния на пролиферацию и миграцию неопластических клеток, могут воздействовать на работу цитокинов, способствует углублению понимания патологических процессов, происходящих при раке молочной железы. Цель работы – анализ взаимосвязи продукции цитокинов с экспрессией miR-181a и miR-25 у пациентов с инвазивной карциномой молочной железы неспецифического типа (ИКНТ) при различных молекулярных подтипах.

Пациентов с ИКНТ разделили на пять подгрупп согласно молекулярно-генетическому подтипу опухоли, определенному с помощью иммуногистохимического анализа рецептора эстрогена (ER), прогестерона (PR), эпидермального фактора роста 2 (HER2) и маркера пролиферации Ki-67. С помощью иммуноферментного анализа определили концентрацию 14 цитокинов в супернатантах иммунокомпетентных клеток крови и опухоли. Экспрессию miR-181a и miR-25 микроРНК, выделенных из сыворотки крови пациентов, оценивали с помощью цифровой капельной полимеразной цепной реакции (цкПЦР).

При люминальном А подтипе концентрации цитокинов и экспрессия miR-181a и miR-25 значительно ниже по сравнению с другими подтипами. Для пациентов с люминальным В HER2-отрицательным подтипом было характерно значительное повышение экспрессии обеих изучаемых микроРНК, особенно по сравнению с люминальным А подтипом. В то же время пациенты с тройным негативным молекулярным подтипом, наоборот, выделялись высокими концентрациями цитокинов

Адрес для переписки:

Студеникина Анастасия Александровна
ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный
медицинский университет» Министерства
здравоохранения РФ
630091, Россия, г. Новосибирск, Красный пр., 52.
Тел.: 8 (383) 226-35-60.
E-mail: lpciip@211.ru

Address for correspondence:

Anastasia A. Studenikina
Novosibirsk State Medical University
52 Krasny Ave
Novosibirsk
630091 Russian Federation
Phone: +7 (383) 226-35-60.
E-mail: lpciip@211.ru

Образец цитирования:

А.А. Студеникина, М.Л. Перепечаева, Е.С. Михайлова,
Н.А. Вараксин, А.И. Аутеншлюс «Продукция
цитокинов клетками крови и образцами опухоли,
и ее сопряженность с экспрессией микроРНК
у пациентов с раком молочной железы» // Медицинская
иммунология, 2023. Т. 25, № 6. С. 1407-1416.
doi: 10.15789/1563-0625-CPB-2647

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

For citation:

A.A. Studenikina, M.L. Perepechaeva, E.S. Mikhaylova,
N.A. Varaksin, A.I. Autenshlyus "Cytokine production by
blood cells and tumor samples and its coupling to microRNA
expression in breast cancer patients", Medical Immunology
(Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2023, Vol. 25, no. 6,
pp. 1407-1416.
doi: 10.15789/1563-0625-CPB-2647

© Studenikina A.A. et al., 2023
The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License
DOI: 10.15789/1563-0625-CPB-2647

в супернатанте образцов опухолей и клеток крови по сравнению с остальными подтипами. В общей группе пациентов с ИКНТ были выявлены прямые корреляционные связи между экспрессией обеих изучаемых микроРНК и концентрацией фактора роста эндотелия сосудов (VEGF) в супернатанте образцов опухоли, что, вероятно, свидетельствует о взаимном влиянии miR-181a и miR-25 и процессе ангиогенеза в опухоли.

Уровень цитокинов в супернатантах крови и опухолях при инвазивной карциноме молочной железы не только изменяется в зависимости от молекулярного подтипа опухоли, но также имеет непосредственные связи с уровнем miR-181a и miR-25 в сыворотке крови. Особо примечательны оказались результаты измерения концентраций цитокинов и микроРНК при люминальном А, люминальном В HER2-отрицательном и тройном негативном молекулярных подтипах.

Ключевые слова: цитокины, микроРНК, miR-181a, miR-25, рак молочной железы, инвазивная карцинома неспецифического типа, тройной негативный рак, молекулярные подтипы

CYTOKINE PRODUCTION BY BLOOD CELLS AND TUMOR SAMPLES AND ITS COUPLING TO microRNA EXPRESSION IN BREAST CANCER PATIENTS

Studenikina A.A.^{a, b}, Perepechaeva M.L.^{a, b}, Mikhaylova E.S.^{a, b},
Varaksin N.A.^c, Autenshlyus A.I.^{a, b}

^a Novosibirsk State Medical University, Novosibirsk, Russian Federation

^b Institute of Molecular Biology and Biophysics, Federal Research Center of Fundamental and Translational Medicine, Novosibirsk, Russian Federation

^c Vector-Best JSC, Novosibirsk, Russian Federation

Abstract. Breast tumors show a complex structure and are highly heterogeneous. The study of cytokines, which exert great influence on tumor cells, and microRNAs, which, along with their influence on the proliferation and migration of neoplastic cells, may affect the work of cytokines, will contribute to a deeper understanding of pathological processes occurring in breast cancer. The aim of our work was to analyze the relationship of cytokine production with expression of miR-181a and miR-25 in patients with invasive breast carcinoma of a non-specific type (IBC NST) with various molecular subtypes.

Patients with IBC NST were divided into five subgroups according to the molecular genetics subtype of the tumor classified by immunohistochemical analysis of estrogen receptor (ER), progesterone (PR), epidermal growth factor 2 (HER2) and proliferation marker Ki-67. Using enzyme immunoassay, the concentration of 14 cytokines was determined in the supernatants of immunocompetent blood cells and tumors: IL-2, IL-6, IL-8, IL-10, IL-17, IL-18, IL-1 β , IL-1ra, TNF α , IFN γ , G-CSF, GM-CSF, VEGF and MCP-1. The expression of miR-181a and miR-25 microRNAs isolated from the patients' blood serum was evaluated using digital droplet polymerase chain reaction (ddPCR).

In the luminal A subtype, cytokine concentrations and expression of miR-181a and miR-25 are significantly lower compared to other subtypes. Patients with the luminal B HER2-negative subtype were characterized by significantly increased expression of both studied microRNAs, especially when compared with the luminal A subtype. At the same time, patients with a triple negative molecular subtype, on the contrary, were characterized by high concentrations of cytokines in the supernatants of tumor samples and blood cells compared to other subtypes. In the general group of patients with IBC NST, direct correlations were found between the expression of both studied microRNAs and the concentration of vascular endothelial growth factor (VEGF) in the supernatant of tumor samples, which may presume mutual interactions existing between miR-181a and miR-25, and the process of angiogenesis in the tumor.

The levels of cytokines in blood supernatants and tumors in invasive breast carcinoma may vary, depending on distinct molecular subtypes of the tumor. Moreover, they also have direct links with the levels of miR-181a and miR-25 in blood serum. Particularly noteworthy were the results of measuring the cytokines and microRNAs concentrations in luminal A, luminal B HER2-negative and triple negative molecular subtypes.

Keywords: cytokines, microRNA, miR-181a, miR-25, breast cancer, invasive carcinoma, non-specific type, triple negative cancer, molecular subtypes

Введение

Ввиду сложной биологии молочной железы и высокой гетерогенности злокачественных опухолей молочной железы, проявляющейся в варьирующих популяциях опухолевых клонов, разных соотношениях доли клеточных компонентов в микроокружении опухоли, а также в разной экспрессии биомаркеров [21, 27], в настоящее время исследователи и клиницисты используют классификацию, основанную на иммуногистохимической оценке экспрессии биомаркеров рецепторов эстрогена (ER) и прогестерона (PR), второго рецептора фактора роста эпидермиса (HER2) и маркера пролиферации Ki-67 [13]. Согласно определению молекулярных подтипов, принятому на международной конференции по раку молочной железы в Санкт-Галлене в 2013 году, злокачественные опухоли молочной железы следует подразделять на пять подтипов: люминальный А (ER⁺, PR^{+/-}, HER2⁻, Ki-67 < 20%), люминальный В HER2-отрицательный (ER⁺, PR^{+/-}, HER2⁻, Ki-67 ≥ 20%), люминальный В HER2-положительный (ER⁺, PR^{+/-}, HER2⁺), с гиперэкспрессией HER2 (ER⁻, PR⁻, HER2⁺) и тройной негативный молекулярный подтип (ER⁻, PR⁻, HER2⁻) [12]. Как правило, люминальные подтипы имеют благоприятный клинический прогноз из-за их чувствительности к таргетной терапии, в то время как у пациентов с гиперэкспрессией HER2 и тройным негативным молекулярных подтипах отсутствуют целевые варианты лечения и их выживаемость намного ниже по сравнению с пациентами, страдающими люминальными подтипами [5, 9, 18].

Известно, что цитокины, белки, передающие информацию на короткие расстояния паракринным и аутокринным образом, играют важную роль в процессах иммуномодуляции, и нарушение регуляции их уровня в крови и тканях связано с появлением различных типов опухолей [16, 28]. Исследователи отмечают, что опухоли способны формировать уникальное иммунное микроокружение [8, 17, 24, 32], важным фактором которого является опухолевая интерстициальная жидкость, окружающая опухолевые и стромальные клетки. Она содержит множество цитокинов, питательных веществ и других факторов, которые непосредственно определяют исход ангиогенеза, роста, метастазирования, ответа на терапию опухолевого очага [11]. Исходя из представленных литературных данных, мы предполагаем, что концентрации цитокинов в крови и опухолевой интерстициальной жидкости подвержены динамическим изменениям в зависимости от клеточного состава и скорости опухолевого роста и, вероятно, могут значительно варьироваться в зависимости от молекулярного подтипа опухоли.

В последнее время появляется все больше данных о роли микроРНК, небольших некоди-

рующих регуляторных РНК, как потенциальных опухолевых маркеров. Особенно в связи с тем, что эти молекулы способны стимулировать или ингибировать экспрессию генов-мишеней путем прямого связывания с мРНК-мишенями и влиять на стабильность мРНК [19]. Это приводит к тому, что микроРНК влияют на различные биологические процессы, такие как регуляция клеточного цикла, дифференцировка, пролиферация, апоптоз и миграция клеток [3] и изменяют работу и синтез различных соединений, в том числе протеинкиназ и цитокинов [33].

Из изучаемых научным сообществом микроРНК нами были выбраны miR-181 и miR-25, поскольку известно, что обе эти микроРНК оказывают влияние на множество сигнальных путей, связанных с процессами инвазии и пролиферации опухолей различных локализаций, а также связаны с работой иммунных клеток [4, 23, 25]. Наше исследование дополнит существующую картину об участии некоторых цитокинов и ростовых факторов, а также miR-181 и miR-25 в патологическом процессе у разных групп пациентов с заболеваниями молочной железы.

Целью работы являлся анализ взаимосвязи продукции цитокинов с экспрессией miR-181 и miR-25 у пациентов с инвазивной карциномой молочной железы неспецифического типа при различных молекулярных подтипах.

Материалы и методы

Исследовали кровь и образцы опухолей молочной железы 48 женщин, с гистологическим типом – инвазивная карцинома неспецифического типа (ИКНТ) в возрасте от 23 до 72 лет, средний возраст 55 лет. Диагноз устанавливался врачом-онкологом и врачом-патологоанатомом. Забор крови у всех исследуемых пациентов осуществляли до оперативного вмешательства. Пациенткам проводили мастэктомию на базе онкологического отделения ГKB № 1 г. Новосибирска. Неoadьювантная терапия не проводилась. Окончательный диагноз устанавливался на основании патоморфологического исследования. Все пациенты с ИКНТ имели размер опухоли T1-2 и G2 – умеренную дифференцировку опухоли. Исследование проведено в соответствии с Хельсинкской декларацией и одобрено комитетом по этике Научно-исследовательского института молекулярной биологии и биофизики подразделения ФИЦ ФТМ (протокол № 2016-3). От каждого пациента получено информированное согласие на проведение исследования и получения образцов опухолей, подписанное самим пациентом и заверенное врачом.

Пациентов с ИКНТ раздели на пять подгрупп согласно молекулярно-генетическому подтипу опухоли, определенному с помощью иммуногистохимического анализа ER, PR, HER2 и Ki-67.

Люминальный подтип А (1-я группа) был выявлен у 14 пациентов в возрасте от 36 до 72 лет, средний возраст 56 лет; люминальный В HER2-отрицательный подтип (2-я группа) был выявлен у 11 пациентов в возрасте от 23 до 74 лет, средний возраст 54 года; люминальный В HER2-положительный подтип (3-я группа) был выявлен у 4 пациентов в возрасте от 47 до 68 лет, средний возраст 57 лет; HER2-положительный подтип (4-я группа) был выявлен у 5 пациентов в возрасте от 40 до 69 лет, средний возраст 55 лет; а тройной негативный подтип (5-я группа) был выявлен у 14 пациентов в возрасте от 38 до 72 лет, средний возраст 56 лет.

Для изучения спонтанной секреции цитокинов 1 мл крови в стерильных условиях вносили во флакон, содержащий 4 мл стерильной поддерживающей среды (DMEM), гепарин (2,5 ЕД/мл), гентамицин (100 мкг/мл) и L-глутамин (0,6 мг/мл), инкубировали при 37 °С в течение суток, после окончания инкубации клетки крови осаждали центрифугированием при 900 g в течение 15 мин. В то же время образцы опухолей объемом 8 мм³, полученные методом трепанобиопсии, аналогично инкубировали в питательной среде DMEM-F12 в объеме 1 мл при 37 °С в течение 72 ч, после чего клетки осаждали центрифугированием при 900 g, при 25 °С в течение 15 мин. В полученных супернатантах образцов крови и опухолей определяли концентрации: IL-2, IL-6, IL-8, IL-10, IL-17, IL-18, IL-1 β , IL-1 α , TNF α , IFN γ , G-CSF, GM-CSF, VEGF и MCP-1 с использованием наборов реагентов АО «Вектор-Бест» (Россия).

МикроРНК выделяли с использованием NucleoSpin miRNA PlasmaKit (Macherey-Nagel, Германия) в соответствии с протоколом производителя. Обратную транскрипцию проводили с помощью miRNA-специфичных адаптеров и обратной транскриптазы M-MuLV-RH («Биолабмикс», Россия) в соответствии с протоколом производителя. Смесь инкубировали при 18 °С в течение 30 мин, затем при 42 °С еще 30 мин и при 85 °С в течение 5 мин. Последовательности адаптеров были следующими: miR-181a а: 5'-GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATT CGCACTGGATACGACACTCACCG-3'; miR-25: 5'-GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGT ATTTCGCACTGGATACGACTCAGACCG-3'; U6: 5'-GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAG GTATTTCGCACTGGATACGACGGCCATGC-3'. Экспрессию микроРНК оценивали с помощью с цифровой капельной полимеразной цепной реакции (цкПЦР) и TaqMan зондов. Для генерации капель в конечном объеме 20 мкл использовали 2 супермикс для цкПЦР (Bio-rad, США), 7 мкл кДНК и смесь праймеров, состоящую из 5 мкл зонда и 20 мкл прямого и обратного праймеров. Последовательности праймеров были следующими: miR-181a а: пря-

мой 5'-GCCGCAACATTTCAACGCTGT-3', зонд 5'-(FAM)-TTCGCACTGGATACGACTCACCG-(BHQ1)-3'; miR-25: прямой 5'-GCCGCCATTGCACTTGTCT-3', зонд 5'-(FAM)-TTCGCACTGGATACGACTCAGACCG-(BHQ1)-3'; U6: прямой 5'-GCCGCATACAGAGAAGATTA-3', зонд 5'-(FAM)-TTCGCACTGGATACGACGGCCATGC-(BHQ1)-3'; и обратный (общий для всех) 5'-AGTGCAGGGTCCGAGGTA-3'. Генерация капель производилась с помощью автоматического генератора капель QX200 (Bio-rad, США). Реакцию проводили при следующих условиях: нагревание при 95 °С в течение 10 мин, затем 39 циклов денатурации при 95 °С в течение 30 с и отжиг при 55 °С в течение 10 мин, затем 98 °С в течение 10 мин. Затем использовали считыватель капель QX200 и анализировали результаты в программном обеспечении Quantasoft™ (Bio-rad, США). В каждый анализ был включен контроль без матрицы. В качестве внутреннего стандарта для исследуемых микроРНК использовали малую ядерную РНК U6.

Статистическую обработку проводили с использованием SPSS v. 22.0 for Windows. При определении характера распределения данных применяли уравнение Колмогорова–Смирнова с определением поправки Лиллифорса. Поскольку распределение отличалось от нормального, проводили анализ с использованием непараметрического U-критерия Манна–Уитни для двух независимых выборок. Для сравнения одной группы с несколькими использовали поправку на множественные сравнения – H-критерий Краскела–Уоллиса. С целью обнаружения взаимосвязи между исследуемыми показателями проводили корреляционный анализ путем вычисления коэффициента ранговой корреляции Спирмена (R). Статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$. Результаты исследования представлены как медиана и интерквартильный размах – Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$).

Работа выполнена с использованием оборудования ЦКП «Протеомный анализ», поддержанного финансированием Минобрнауки России (соглашение № 075-15-2021-691).

Результаты

Было проведено определение концентрации цитокинов в супернатанте образцов опухолей пациентов с ИКНТ между разными молекулярными подтипами. При использовании H-критерия Краскела–Уоллиса, позволяющего в принципе определить, изменяются ли концентрации цитокинов при сравнении 5 групп пациентов, оказалось, что пациенты с разными молекулярными подтипами статистически значимо отличались по концентрации IL-8 ($p = 0,015$), IL-18 ($p = 0,011$), IFN γ ($p = 0,007$) и GM-CSF ($p = 0,004$). После чего при попарном сравнении с помощью U-критерия Манна–Уитни были определены особенности

цитокинового профиля супернатантов образцов опухолей, присущих каждому конкретному молекулярному подтипу (табл. 1).

Супернатанты образцов опухолей 1-й группы (люминального А молекулярного подтипа) характеризовались наиболее низкой концентрацией IL-8 по сравнению с другими группами. Кроме того, в 1-й группе концентрации TNF α и GM-CSF были ниже по сравнению с 3-й и 5-й группами (люминальным В HER2-положительным и тройным негативным подтипами), а IFN γ ниже по сравнению с 4-й и 5-й группами (HER2-положительным и тройным негативным подтипами). Для люминального В HER2-положительного подтипа (3-я группа) характерна более низкая концентрация IL-4 по сравнению

с 1-й и 2-й группами (люминальным А и люминальным В HER2-отрицательным подтипами), а также самая высокая концентрация IL-10 по сравнению с остальными группами. Пятая группа пациентов характеризуется более высокими концентрациями: IL-17, IL-1 β и VEGF по сравнению с 1-й группой (люминальным А подтипом), IL-18 по сравнению с 1-й и 3-й группами, а также IFN γ по сравнению с тремя люминальными подтипами (с 1-й, 2-й и 3-й группами).

Что касается концентрации цитокинов в супернатанте клеток крови, результаты определения Н-критерия Краскела–Уоллиса у пациентов с ИКНТ показали, что группы пациентов с разными молекулярными подтипами статистически значимо различались только по концентрации

ТАБЛИЦА 1. КОНЦЕНТРАЦИИ ЦИТОКИНОВ В СУПЕРНАТАНТЕ ОБРАЗЦОВ ОПУХОЛЕЙ ПАЦИЕНТОВ С ИКНТ (пг/мл) В ЗАВИСИМОСТИ ОТ МОЛЕКУЛЯРНОГО ПОДТИПА ОПУХОЛИ, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

TABLE 1. CYTOKINE CONCENTRATIONS IN TUMOR SAMPLE SUPERNATANTS FROM PATIENTS WITH IBC NST TUMORS (pg/mL) DEPENDING ON THE MOLECULAR TUMOR SUBTYPE, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

Цитокины Cytokine	1-я группа Group 1	2-я группа Group 2	3-я группа Group 3	4-я группа Group 4	5-я группа Group 5
IL-4	3,8 (2,3-4,8)	3,2 (2,7-6,6)	1,5 (1,0-1,8)	3,2 (1,7-13,1)	2,6 (1,9-3,5)
	p ₁₋₃ = 0,029		p ₂₋₃ = 0,013		
IL-8	192,1 (87,9-363,0)	433,7 (325,5-671,0)	620,8 (386,2-774,1)	407,6 (160,2-651,7)	424,0 (315,7-677,8)
	p ₁₋₂ = 0,010		p ₁₋₃ = 0,011		
IL-10	8,1 (1,8-12,6)	6,2 (1,0-14,9)	19,4 (15,3-31,8)	10,8 (3,1-12,9)	6,6 (3,6-15,8)
	p ₁₋₃ = 0,019		p ₂₋₃ = 0,036		
IL-17	1,6 (1,0-3,0)	2,9 (1,6-4,8)	3,5 (1,7-6,2)	3,9 (1,4-19,8)	4,4 (1,9-12,4)
	p ₁₋₅ = 0,012				
IL-18	29,1 (7,5-85,6)	90,3 (46,7-279,1)	37,6 (28,6-43,4)	187,3 (29,4-719,4)	283,9 (101,9-1407,1)
	p ₁₋₅ = 0,003		p ₃₋₅ = 0,044		
IL-1 β	23,2 (8,9-41,4)	45,5 (16,1-108,9)	21,5 (10,4-230,2)	41,9 (19,6-140,6)	100,6 (23,2-313,9)
	p ₁₋₅ = 0,004				
TNF α	2,1 (1,3-4,2)	6,9 (2,3-11,6)	2,7 (1,3-4,7)	5,2 (2,5-7,2)	4,7 (2,9-9,0)
	p ₁₋₂ = 0,040				p ₁₋₅ = 0,015
IFN γ	5,0 (2,6-9,6)	4,4 (2,3-10,4)	4,2 (2,5-10,0)	10,6 (5,4-33,6)	14,9 (8,4-42,2)
	p ₁₋₅ = 0,002		p ₂₋₅ = 0,014		
GM-CSF	6,7 (3,3-11,4)	28,1 (8,2-33,1)	26,3 (3,6-52,1)	12,4 (9,0-26,3)	33,5 (15,1-52,9)
	p ₁₋₂ = 0,005				
VEGF	951,9 (133,0-2076,3)	1904,0 (1515,1-2161,9)	1389,9 (184,3-2384,1)	1903,2 (506,3-2399,7)	2124,7 (1743,4-2284,7)
	p ₁₋₅ = 0,031				

Примечание. Значения концентраций цитокинов указаны только при p < 0,05; 1-я группа – люминальный А; 2-я группа – люминальный В HER2-отрицательный; 3-я группа – люминальный В HER2-положительный; 4-я группа – HER2-положительный; 5-я группа – тройной негативный молекулярный подтип.

Note. The cytokine concentrations are indicated only at p < 0.05; group 1, luminal A; group 2, luminal B negative; group 3, luminal B positive; group 4 HER2 positive; group 5, triple-negative molecular subtype.

ТАБЛИЦА 2. КОНЦЕНТРАЦИИ ЦИТОКИНОВ В СУПЕРНАТАНТЕ КЛЕТОК КРОВИ ПАЦИЕНТОВ С ИКНТ (пг/мл) В ЗАВИСИМОСТИ ОТ МОЛЕКУЛЯРНОГО ПОДТИПА ОПУХОЛИ, Ме ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)

TABLE 2. CYTOKINE CONCENTRATIONS IN THE SUPERNATANT BLOOD CELLS OF PATIENTS WITH IBC NST TUMORS, DEPENDING ON TUMOR MOLECULAR SUBTYPE (pg/mL), Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)

Цитокины Cytokine	1-я группа Group 1	2-я группа Group 2	3-я группа Group 3	4-я группа Group 4	5-я группа Group 5
IL-17	1,0 (1,0-1,0)	1,0 (1,0-1,3)	1,0 (1,0-3,6)	1,0 (1,0-2,6)	1,0 (1,0-10,1)
	$p_{1-5} = 0,034$				
IL-18	34,8 (25,4-47,1)	36,1 (28,7-46,8)	26,4 (18,3-31,9)	29,8 (24,0-44,9)	33,5 (25,8-39,1)
		$p_{2-3} = 0,043$			
IFN γ	5,0 (2,0-5,0)	2,0 (2,0-5,0)	5,0 (3,7-14,8)	5,0 (3,7-5,0)	5,0 (3,4-9,2)
		$p_{2-3} = 0,025$			
GM-CSF	2,0 (2,0-2,0)	2,0 (2,0-8,9)	2,0 (2,0-23,2)	2,0 (2,0-12,0)	6,6 (2,0-14,0)
	$p_{1-5} = 0,004$				
VEGF	45,8 (26,1-74,9)	40,5 (24,8-68,0)	53,5 (21,9-91,5)	67,2 (21,3-68,7)	70,3 (44,3-85,4)
					$p_{2-5} = 0,037$

ТАБЛИЦА 3. ЭКСПРЕССИЯ miR-181a И miR-25 В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ПАЦИЕНТОВ С ИКНТ (у. е.) В ЗАВИСИМОСТИ ОТ МОЛЕКУЛЯРНОГО ПОДТИПА ОПУХОЛИ, Ме ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)

TABLE 3. EXPRESSION OF miR-181a AND miR-25 IN THE BLOOD SERUM OF PATIENTS WITH IBC NST TUMORS (с. у.), DEPENDING ON TUMOR MOLECULAR SUBTYPE, Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)

МикроРНК miR	1-я группа Group 1	2-я группа Group 2	3-я группа Group 3	4-я группа Group 4	5-я группа Group 5
miR-181a	1,35 (0,63-3,40)	13,10 (4,50-50,80)	2,90 (0,83-39,85)	14,40 (1,40-54,60)	2,80 (1,50-9,40)
	$p_{1-2} = 0,005$				
miR-25	1,90 (0,58-4,30)	38,60 (7,70-88,60)	4,15 (1,05-25,33)	7,70 (0,65-172,10)	3,60 (2,88-25,80)
	$p_{1-2} = 0,001$	$p_{2-5} = 0,033$			$p_{1-5} = 0,034$

IFN γ ($p = 0,028$), хотя при парном сравнении с использованием U-критерия Манна–Уитни были выявлены характерные особенности продукции пяти цитокинов в крови у пациентов в зависимости от молекулярного подтипа опухоли (табл. 2).

Установлено, что у пациентов 2-й группы (при люминальном В HER2-отрицательном подтипе) концентрация IL-18 была выше по сравнению с 3-й группой (люминальным В HER2-положительным подтипом), а концентрация IFN γ была ниже по сравнению с этим молекулярным подтипом, а также по сравнению с 4-й и 5-й группой (HER2-положительным и тройным негативным молекулярными подтипами). Для тройного негативного подтипа (5-я группа) характерна более высокая концентрация: IL-17 и GM-CSF в крови, по сравнению с люминальным А подтипом (1-я группа), IFN γ и VEGF по срав-

нению с люминальным В HER2-отрицательным подтипом, составляющим 2-ю группу пациентов.

Ввиду имеющейся информации о способности микроРНК оказывать воздействие на мРНК [19, 30], что может приводить к изменению продукции цитокинов, было проведено сравнение экспрессии miR-181a и miR-25 микроРНК в сыворотке крови между разными молекулярными подтипами пациентов с ИКНТ. Были получены статистически значимые различия, как при применении H-критерия Краскела–Уоллиса miR-181a ($p = 0,045$), miR-25 ($p = 0,016$), так и при парном сравнении с использованием U-критерия Манна–Уитни (табл. 3).

Экспрессия обеих исследуемых микроРНК была минимальной в 1-й группе (при люминальном А подтипе), что подчеркивает онкогенные роли этих микроРНК и согласуется с литературными данными [14, 25]. При тройном негативном подтипе (5-я группа) уровень экспрессии

ТАБЛИЦА 4. КОЭФФИЦИЕНТЫ КОРРЕЛЯЦИИ МЕЖДУ КОНЦЕНТРАЦИЯМИ ЦИТОКИНОВ В СУПЕРНАТАНТЕ БИОПТАТОВ, СУПЕРНАТАНТЕ КЛЕТОК КРОВИ И ЭКСПРЕССИЕЙ miR-181a, miR-25 В ЗАВИСИМОСТИ ОТ МОЛЕКУЛЯРНОГО ПОДТИПА ОПУХОЛИ У БОЛЬНЫХ ИКНТ

TABLE 4. CORRELATION COEFFICIENTS BETWEEN CYTOKINE CONCENTRATIONS IN THE SUPERNATANT OF BIOPSIES, BLOOD CELL SUPERNATANT AND EXPRESSION OF miR-181a, miR-25 DEPENDING ON TUMOR MOLECULAR SUBTYPE IN PATIENTS WITH IBC NST

Молекулярный подтип Molecular subtype	Пары параметров Pairs of parameters		R	p
1-я группа Group 1	miR-181a	IL-18 blood	0,595	0,025
		IL-18 tumor	0,695	0,006
		IL-1 β tumor	0,623	0,017
		VEGF tumor	0,579	0,030
	miR-25	IL-18 tumor	0,658	0,011
		VEGF tumor	0,648	0,012
2-я группа Group 2	miR-181a	VEGF tumor	0,618	0,043
3-я группа Group 3	miR-25	INF γ tumor	0,800	0,037

Примечание. R – коэффициент ранговой корреляции Спирмена, p – уровень статистической значимости.

Note. R, Spearman's rank correlation coefficient; p, the level of statistical significance.

miR-25 был выше чем при люминальном А подтипе (1-я группа), при этом уровень экспрессии miR-181a был ниже, чем при люминальном В HER2-отрицательном молекулярном подтипе (2-я группа), это подчеркивает противоречивость роли miR-181a при ИКНТ, что также отмечает ряд других исследователей [33, 36].

Учитывая сложность интерпретации результатов экспрессии miR-181a и miR-25, а также их способность посттранскрипционно регулировать экспрессию генов и оказывать влияние на различные пути, участвующие в онкогенезе [3], мы решили проанализировать характер взаимосвязи их экспрессии с концентрациями цитокинов. С этой целью было проведено определение коэффициента корреляции Спирмена между продукцией цитокинов и экспрессией микроРНК у пациентов с ИКНТ с разными молекулярными подтипами (табл. 4).

В общей группе пациентов с ИКНТ были выявлены прямые корреляционные связи между экспрессией обеих изучаемых микроРНК и концентрацией VEGF в супернатанте образцов опухоли, что, вероятно, свидетельствует о взаимном влиянии miR-181a и miR-25 и процесса ангиогенеза в опухоли.

У пациентов 1-й группы (с люминальным А подтипом) были выявлены прямые корреляционные связи между концентрацией цитокинов в супернатанте образцов опухоли, а именно VEGF, IL-18 и уровнем экспрессии обеих микроРНК, кроме того, отмечались прямые корреляционные связи между уровнем экспрессии miR-181a и концентрацией IL-1 β в супернатанте образцов

опухоли и концентрацией IL-18 в супернатанте клеток крови. У пациентов 2-й группы (с люминальным В HER2-отрицательным подтипом) была выявлена прямая корреляционная связь между уровнем экспрессии miR-181a и концентрацией VEGF в супернатанте образцов опухоли. У пациентов 3-й группы (с люминальным В HER2-положительным подтипом) была выявлена прямая корреляционная связь между уровнем экспрессии miR-25 и концентрацией INF γ в супернатанте образцов опухолей.

Обсуждение

Исследование показало, что люминальный А молекулярный подтип значительно отличается от других подтипов более низкими концентрациями цитокинов в супернатанте опухолей и клеток крови и, кроме того, низким уровнем экспрессии miR-181a и miR-25. Особо примечательным оказалось то, что супернатанты образцов опухолей люминального А молекулярного подтипа характеризовались наиболее низкой концентрацией IL-8 по сравнению с другими молекулярными подтипами. Это согласуется с литературными данными, согласно которым синтез и секреция IL-8 в клетках рака молочной железы тесно связаны со статусом рецептора эстрогена, при этом более высокая экспрессия IL-8, характерная для базальноподобных (ER-отрицательных) и HER2-положительных подтипов карцином молочной железы [20, 22], что отличает их от люминального А подтипа, при котором наблюдается высокая экспрессия ER и PR. Было высказано предположение, что повышенная концентрация IL-8, се-

кретируемого опухолевыми клетками, инвазивными нейтрофилами и связанными с опухолью макрофагами, может действовать как аутокринный фактор подвижности и роста, усиливая ангиогенез, пролиферацию и миграцию опухолевых клеток [2], не исключено, что именно этим объясняется более низкое лимфогенное метастазирование при люминальном А подтипе.

В то же время пациенты с тройным негативным молекулярным подтипом, наоборот выделялись высокими концентрациями цитокинов в супернатанте образцов опухолей и клеток крови по сравнению с остальными подтипами, так при тройном негативном подтипе отмечалась более высокая концентрация IL-17 и GM-CSF в супернатантах крови и опухоли по сравнению с люминальным А подтипом. Согласно данным других исследователей эти цитокины способствуют прогрессированию опухоли, поддерживая рост, пролиферацию и миграцию клеток. GM-CSF способен индуцировать синтез матриксных металлопротеиназ и активировать эпителиально-мезенхимальный переход [1]. Также оба этих цитокина способны привлекать миелоидные супрессорные клетки и направлять пролиферацию макрофагов в M2-, а нейтрофилов в N2-фенотипы [10, 31]. Это способствует формированию иммуносупрессивного микроокружения, в котором активно подавляются противоопухолевые CD8⁺T-клетки, что в итоге приводит к более агрессивному типу опухоли, что лишний раз подтверждает низкую способность опухоли, относящейся к люминальному А подтипу, к лимфогенному метастазированию.

Также у пациентов с тройным негативным подтипом были самые высокие концентрации IFN γ и VEGF в супернатантах крови и опухоли. Высокая концентрация IFN γ при тройном негативном молекулярном подтипе может быть следствием высокой пролиферативной активности опухоли, при которой клетки микроокружения опухоли в качестве ответной реакции начинают секретировать IFN γ в больших количествах. Этот цитокин способен активировать сигнальный путь JAK/STAT, что приводит к ингибированию роста опухоли [11, 37]. Известно, что VEGF является ключевым медиатором ангиогенеза и способен связываться с рецепторами поверхности эндотелиальных клеток, которые влияют на рост опухоли [29]. Поэтому не удивительно, что

именно при тройном негативном подтипе клетки опухоли продуцируют этот цитокин в больших количествах для образования новых кровеносных сосудов, усиления собственного роста и повышения миграционного потенциала, что было обнаружено и в других исследованиях [15, 35].

Что касается люминального В HER2-отрицательного подтипа, то, несмотря на умеренное повышение уровня цитокинов в супернатанте образцов опухолей и клеток крови, для этой группы пациентов было характерно значительное повышение экспрессии обеих изучаемых микроРНК, особенно по сравнению с люминальным А подтипом. Это может свидетельствовать о связи miR-181a и miR-25 с пролиферацией, а именно с ее маркером Ki-67, который, как известно, тесно связан с ростом опухолевых клеток и является показателем прогноза и исхода злокачественной прогрессии [7]. Необходимо также подчеркнуть вероятную связь изученных нами микроРНК с пролиферативной активностью опухоли, это подтверждают данные о том, что эктопическая экспрессия miR-181a способствует вхождению в S-фазу и пролиферации клеток [26]. Исходя из полученных результатов, необходимо подчеркнуть, что miR-181a и miR-25, вероятно, поддерживают высокую секрецию IL-18 и VEGF опухолевыми клетками, и можно предположить, что miR-181a и miR-25 могут оказывать влияние на процесс ангиогенеза через концентрацию VEGF.

Заключение

Уровень цитокинов в супернатантах крови и опухолях при инвазивной карциноме молочной железы не только изменяется в зависимости от молекулярного подтипа опухоли, но также имеет непосредственные связи с уровнем miR-181a и miR-25 в сыворотке крови. Особо примечательны оказались результаты измерения концентраций цитокинов и микроРНК при люминальном А, люминальном В HER2-отрицательном и тройном негативном молекулярных подтипах. Таким образом, рекомендуется исследовать взаимодействия описанных нами микроРНК и цитокинов у большего числа пациентов, поскольку их использование расширит и углубит представление об уникальных характеристиках и гетерогенности молекулярных подтипов инвазивной карциномы молочной железы.

Список литературы / References

1. Аутеншлюс А.И., Давлетова К.И., Студеникина А.А., Михайлова Е.С., Вараксин Н.А., Жураковский И.П., Проскура А.В., Сидоров С.В., Ляхович В.В. Продукция цитокинов иммунокомпетентными клетками крови, опухолью и ее микроокружением, особенности состояния внеклеточного матрикса у больных инвазивной карциномой молочной железы неспецифического типа // Биомедицинская химия, 2019. Т. 65, № 5. С. 424-431. [Autenshlyus A.I., Davletova K.I., Studenikina A.A., Mikhaylova E.S., Varaksin N.A., Zhurakovskiy I.P., Proskura A.V., Sidorov S.V., Lyakhovich V.V. Cytokine production by blood immune cells, tumor and its microenvironment, characteristic of extracellular matrix in patients with invasive ductal carcinoma of no special type. *Biomeditsinskaya khimiya = Biomedical Chemistry*, 2019, Vol. 65, no. 5, pp. 424-431. (In Russ.)]

2. Al-Khalaf H.H., Al-Harbi B., Al-Sayed A., Arafah M., Tulbah A., Jarman A., Al-Mohanna F., Aboussekhra A. Interleukin-8 activates breast cancer-associated adipocytes and promotes their angiogenesis- and tumorigenesis-promoting effects. Molecular and cellular biology. *Mol. Cell. Biol.*, 2019, Vol. 39, no. 2, e00332-18. doi: 10.1128/MCB.00332-18.
3. Bakr N.M., Mahmoud M.S., Nabil R., Boushnak H., Swellam M. Impact of circulating miRNA-373 on breast cancer diagnosis through targeting VEGF and cyclin D1 genes. *J. Genet. Eng. Biotechnol.*, 2021, Vol. 19, no. 1, 84. doi: 10.1186/s43141-021-00174-7.
4. Benedetti R., Papulino C., Sgueglia G., Chianese U., De Marchi T., Iovino F., Rotili D., Mai A., Nimeus E., Dell' Aversana C., Altucci L. Regulatory Interplay between miR-181a-5p and Estrogen Receptor Signaling Cascade in Breast Cancer. *Cancers (Basel)*, 2021, Vol. 13, no. 3, 543. doi: 10.3390/cancers13030543.
5. Bianchini G., De Angelis C., Licata L., Gianni L. Treatment landscape of triple-negative breast cancer – expanded options, evolving needs. *Nat. Rev. Clin. Oncol.*, 2022, Vol. 19, no. 2, pp. 91-113.
6. Costa A., Kieffer Y., Scholer-Dahirel A., Pelon F., Bourachot B., Cardon M., Sirven P., Magagna I., Fuhrmann L., Bernard C., Bonneau C., Kondratova M., Kuperstein I., Zinovyev A., Givel A.M., Parrini M.C., Soumelis V., Vincent-Salomon A., Mechta-Grigoriou F. Fibroblast heterogeneity and immunosuppressive environment in human breast cancer. *Cancer Cell*, 2018, Vol. 33, no. 3, pp. 463-479.e10.
7. Davey M.G., Hynes S.O., Kerin M.J., Miller N., Lowery A.J. Ki-67 as a prognostic biomarker in invasive breast cancer. *Cancers*, 2021, Vol. 13, no. 17, 4455. doi: 10.3390/cancers13174455.
8. Deepak K.G.K., Vempati R., Nagaraju G.P., Dasari V.R., Rao D.N., Malla R.R. Tumor microenvironment: Challenges and opportunities in targeting metastasis of triple negative breast cancer. *Pharmacol. Res.*, 2020, Vol. 153, 104683. doi: 10.1016/j.phrs.2020.104683.
9. Derakhshan F., Reis-Filho J.S. Pathogenesis of triple-negative breast cancer. *Ann. Rev. Pathol.*, 2022, Vol. 17, pp. 181-204.
10. Dougan M., Dranoff G., Dougan S.K. GM-CSF, IL-3, and IL-5 family of cytokines: regulators of inflammation. *Immunity*, 2019, Vol. 50, no. 4, pp. 796-811.
11. Fan Y., He S. The Characteristics of tumor microenvironment in triple negative breast cancer. *Cancer Manag. Res.*, 2022, Vol. 14, pp. 1-17.
12. Goldhirsch A., Winer E.P., Coates A.S., Gelber R.D., Piccart-Gebhart M., Thürlimann B., Senn H.J. Personalizing the treatment of women with early breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2013. *Ann. Oncol.*, 2013, Vol. 24, no. 9, pp. 2206-2223.
13. Horne H.N., Oh H., Sherman M.E., Palakal M., Hewitt S.M., Schmidt M.K., Milne R.L. E-cadherin breast tumor expression, risk factors and survival: Pooled analysis of 5,933 cases from 12 studies in the Breast Cancer Association Consortium. *Sci. Rep.*, 2018, Vol. 8, no. 1, 6574. doi: 10.1038/s41598-018-23733-4.
14. Jiang M., Zhang W., Zhang R., Liu P., Ye Y., Yu W., Guo X., Yu J. Cancer exosome-derived miR-9 and miR-181a promote the development of early-stage MDSCs via interfering with SOCS3 and PIAS3 respectively in breast cancer. *Oncogene*, 2020, Vol. 39, no. 24, pp. 4681-4694.
15. Kiso M., Tanaka S., Saji S., Toi M., Sato F. Long isoform of VEGF stimulates cell migration of breast cancer by filopodia formation via NRP1/ARHGAP17/Cdc42 regulatory network. *Int. J. Cancer*, 2018, Vol. 143, no. 11, pp. 2905-2918.
16. Loo S.W., Pui T.S. Cytokine and cancer biomarkers detection: the dawn of electrochemical paper-based biosensor. *Sensors (Basel)*, 2020, Vol. 20, no. 7, 1854. doi: 10.3390/s20071854.
17. Lotfinejad P., Asghari M., Shadbad M., Kazemi T., Pashazadeh F., Sandoghchian S., Jadidi F., Baghbanzadeh A., Vahed N., Silvestris N., Baradaran B. Prognostic role and clinical significance of Tumor-Infiltrating Lymphocyte (TIL) and Programmed Death Ligand 1 (PD-L1) Expression in Triple-Negative Breast Cancer (TNBC): A systematic review and meta-analysis study. *Diagnostics (Basel)*, 2020, Vol. 10, no. 9, 704. doi: 10.3390/diagnostics10090704.
18. Luo C., Wang P., He S., Zhu J., Shi Y., Wang J. Progress and prospect of immunotherapy for triple-negative breast cancer. *Front. Oncol.*, 2022, Vol. 12, 919072. doi: 10.3389/fonc.2022.919072.
19. Manzano-Moreno F.J., Costela-Ruiz V.J., García-Recio E., Olmedo-Gaya M.V., Ruiz C., Reyes-Botella C. Role of Salivary MicroRNA and cytokines in the diagnosis and prognosis of oral squamous cell carcinoma. *Int. J. Mol. Sci.*, 2021, Vol. 22, no. 22, 12215. doi: 10.3390/ijms222212215.
20. Milovanović J., Todorović-Raković N., Radulović M. Interleukin-6 and interleukin-8 serum levels in prognosis of hormone-dependent breast cancer. *Cytokine*, 2019, Vol. 118, pp. 93-98.
21. Mueller C., Haymond A., Davis J.B., Williams A., Espina. V. Protein biomarkers for subtyping breast cancer and implications for future research. *Expert Rev Proteomics*, 2018, Vol. 15, no. 2, pp. 131-152.
22. Papadimitropoulou A., Vellon L., Atlas E., Steen T. V., Cuyàs E., Verdura S., Espinoza I., Menendez J.A., Lupu R. Heregulin drives endocrine resistance by altering IL-8 expression in er-positive breast cancer. *Int. J. Mol. Sci.*, 2020, Vol. 21, no. 20, 7737. doi: 10.3390/ijms21207737.
23. Rady M., Watzl C., Claus M., Khorshid O., Mahran L., Abou-Aisha K. Altered expression of miR-181a and miR-146a does not change the expression of surface NCRs in human NK cells. *Sci Rep.*, 2017, Vol. 7, 41381. doi: 10.1038/srep41381.
24. Sahin Ozkan H., Ugurlu M.U., Yumuk P.F., Kaya H. Prognostic role of immune markers in triple negative breast carcinoma. *Pathol. Oncol. Res.*, 2020, Vol. 26, no. 4, pp. 2733-2745.
25. Sárközy M., Kahán Z., Csont T. A myriad of roles of miR-25 in health and disease. *Oncotarget*, 2018, Vol. 9, no. 30, pp. 21580-21612.
26. Strotbek M., Schmid S., Sanchez-Gonzalez I., Boerries M., Busch H., Olayioye M. A. MiR-181 elevates Akt signaling by co-targeting PHLPP2 and INPP4B phosphatases in luminal breast cancer. *Int. J. Cancer*, 2017, Vol. 140, no. 10, pp. 2310-2320.
27. Vasconcelos I., Hussainzada A., Berger S., Fietze E., Linke J., Siedentopf F., Schoenegg W. The St. Gallen surrogate classification for breast cancer subtypes successfully predicts tumor presenting features, nodal involvement, recurrence patterns and disease free survival. *Breast*, 2016, Vol. 29, pp. 181-185.
28. Waldmann T.A. Cytokines in cancer immunotherapy. *Cold Spring Harbor Perspect. Biol.*, 2018, Vol. 10, no. 12, a028472. doi: 10.1101/cshperspect.a028472.

29. Welte J., Loges S., Dimmeler S., Recent molecular discoveries in angiogenesis and antiangiogenic therapies in cancer. *J. Clin. Invest.*, 2013, Vol. 123, no. 8, pp. 3190-3200.
30. Wu B., Xiong X., Jia J., Zhang W. MicroRNAs: New actors in the oral cancer scene. *Oral Oncol.*, 2011, Vol. 47, no. 5, pp. 314-319.
31. Wu L., Saxena S., Awaji M., Singh R.K. Tumor-associated neutrophils in cancer: Going Pro. *Cancers (Basel)*, 2019, Vol. 11, no. 4, 564. doi: 10.3390/cancers11040564.
32. Wu Q., Li B., Li Z., Li J., Sun S., Sun S. Cancer-associated adipocytes: key players in breast cancer progression. *J. Hematol. Oncol.*, 2019, Vol. 12, no. 1, 95. doi: 10.1186/s13045-019-0778-6.
33. Yang C., Tabatabaei S. N., Ruan X., Hardy P. The Dual Regulatory Role of MiR-181a in Breast Cancer. *Cell Physiol Biochem.*, 2017, Vol. 44, no. 3, pp. 843-856.
34. Yin H.L., Wu C.C., Lin C.H., Chai C.Y., Hou M.F., Chang S.J., Tsai H.P., Hung W.C., Pan M.R., Luo C.W. $\beta 1$ integrin as a prognostic and predictive marker in triple-negative breast cancer. *Int. J. Mol. Sci.*, 2016, Vol. 17, no. 9, 1432. doi: 10.3390/ijms17091432.
35. Yu T., Di G. Role of tumor microenvironment in triple-negative breast cancer and its prognostic significance. *Chin. J. Cancer Res.*, 2017, Vol. 29, no. 9, pp. 237-252.
36. Zhai Z., Mu T., Zhao L., Li Y., Zhu D., Pan Y. MiR-181a-5p facilitates proliferation, invasion, and glycolysis of breast cancer through NDRG2-mediated activation of PTEN/AKT pathway. *Bioengineered*, 2022, Vol. 13, no. 1, pp. 83-95.
37. Zhang X., Zeng Y., Qu Q. PD-L1 induced by IFN- γ from tumor-associated macrophages via the JAK/STAT3 and PI3K/AKT signaling pathways promoted progression of lung cancer. *Int. J. Clin. Oncol.*, 2017, Vol. 22, no. 6, pp. 1026-1033.

Авторы:

Студеникина А.А. — к.м.н., научный сотрудник центральной научно-исследовательской лаборатории ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ; научный сотрудник, Научно-исследовательский институт молекулярной биологии и биофизики ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины», г. Новосибирск, Россия

Перепечаева М.Л. — к.б.н., научный сотрудник центральной научно-исследовательской лаборатории ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ; старший научный сотрудник, Научно-исследовательский институт молекулярной биологии и биофизики ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины», г. Новосибирск, Россия

Михайлова Е.С. — научный сотрудник центральной научно-исследовательской лаборатории ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ; старший научный сотрудник, Научно-исследовательский институт молекулярной биологии и биофизики ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины», г. Новосибирск, Россия

Вараксин Н.А. — заведующий лабораторией АО «Вектор-Бест», г. Новосибирск, Россия

Аутеншлюс А.И. — д.б.н., профессор, заведующий центральной научно-исследовательской лабораторией ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ; главный научный сотрудник, Научно-исследовательский институт молекулярной биологии и биофизики ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины», г. Новосибирск, Россия

Authors:

Studenikina A.A., PhD (Medicine), Research Associate, Central Research Laboratory, Novosibirsk State Medical University; Research Associate, Institute of Molecular Biology and Biophysics, Federal Research Center of Fundamental and Translational Medicine, Novosibirsk, Russian Federation

Perpechaeva M.L., PhD (Biology), Research Associate, Central Research Laboratory, Novosibirsk State Medical University; Senior Research Associate, Institute of Molecular Biology and Biophysics, Federal Research Center of Fundamental and Translational Medicine, Novosibirsk, Russian Federation

Mikhaylova E.S., Research Associate, Central Research Laboratory, Novosibirsk State Medical University; Senior Research Associate, Institute of Molecular Biology and Biophysics, Federal Research Center of Fundamental and Translational Medicine, Novosibirsk, Russian Federation

Varaksin N.A., Head of Laboratory, Vector-Best JSC, Novosibirsk, Russian Federation

Autenshlyus A.I., PhD, MD (Biology), Professor, Head, Central Research Laboratory, Novosibirsk State Medical University; Chief Research Associate, Institute of Molecular Biology and Biophysics, Federal Research Center of Fundamental and Translational Medicine, Novosibirsk, Russian Federation

Поступила 31.01.2023

Отправлена на доработку 09.02.2023

Принята к печати 16.02.2023

Received 31.01.2023

Revision received 09.02.2023

Accepted 16.02.2023

СИСТЕМНЫЕ ЦИТОКИНЫ У ПОЖИЛЫХ ПАЦИЕНТОВ С ИШЕМИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНЬЮ СЕРДЦА ПОСЛЕ COVID-19 В РАННИЕ СРОКИ ВЫЗДОРОВЛЕНИЯ

Агарков Н.М.^{1,2}, Жернакова Н.И.², Негребецкий В.А.³

¹ ФГБОУ ВО «Юго-Западный государственный университет», г. Курск, Россия

² ФГАОУ ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет», г. Белгород, Россия

³ ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Резюме. Развитие COVID-19 сопровождается вовлечением в патологический процесс различных цитокинов, и их изменение зависит от возраста, сопутствующей патологии и некоторых других факторов, которые недостаточно изучены у пожилых пациентов с ишемической болезнью сердца. Неизвестным также остается содержание цитокинов в плазме крови больных 60-74 лет, перенесших COVID-19, в ранние сроки выздоровления. Цель исследования – определение содержания системных цитокинов у пожилых пациентов с ишемической болезнью сердца после COVID-19 в ранние сроки выздоровления. Пациенты 60-74 лет с ишемической болезнью сердца, переболевшие COVID-19 средней тяжести, в количестве 40 человек составили основную группу, у которых изучение цитокинов в плазме крови проведено через 3-4 недели после выздоровления. Контрольной группой служили 38 пациентов пожилого возраста с ишемической болезнью сердца и отрицательным тестом на COVID-19. Определение цитокинов в обеих группах проведено на аппарате Becton Dickinson FACS Sauto 2 (США) методом проточной цитометрии с соответствующим набором реагентов. Установлено, что у пожилых пациентов с ишемической болезнью сердца через 3-4 недели выздоровления после перенесенного COVID-19 по сравнению с пожилыми пациентами с ишемической болезнью сердца без COVID-19 в анамнезе в плазме крови наиболее существенно и со статистически значимым различием было повышено содержание IL-6, составившее $32,9 \pm 2,3$ пг/мл, против $6,5 \pm 0,7$ пг/мл в контрольной группе ($p < 0,001$). Превышение содержания в плазме крови больных основной группы выявлено и для IL-17, концентрация которого составляла в раннем периоде выздоровления $25,4 \pm 1,9$ пг/мл, тогда как у больных того же возраста только с ишемической болезнью сердца – $7,8 \pm 0,7$ пг/мл ($p < 0,001$). Повышенными среди пациентов 60-74 лет с ишемической болезнью сердца и перенесенным COVID-19 через 3-4 недели после выздоровления оказались уровни TNF α и IFN γ , составлявшие соответственно $128,6 \pm 2,7$ пг/мл и $57,6 \pm 2,8$ пг/мл. В контрольной группе концентрация данных цитокинов была значительно ниже – $56,3 \pm 2,2$ пг/мл и $25,9 \pm 1,7$ пг/мл соответственно ($p < 0,001$). Изменения в содержании других изученных цитокинов оказались менее выраженными, а уровень IL-4 не имел суще-

Адрес для переписки:

Агарков Николай Михайлович
ФГБОУ ВО «Юго-Западный государственный
университет»
305040, Россия, г. Курск, ул. 50 лет Октября, 94.
Тел.: 8 (910) 740-96-13.
E-mail: vitalaxen@mail.ru

Address for correspondence:

Agarkov Nikolai M.
South-West State University
50 let Oktyabrya St
Kursk
305040 Russian Federation
Phone: +7 (910) 740-96-13.
E-mail: vitalaxen@mail.ru

Образец цитирования:

Н.М. Агарков, Н.И. Жернакова, В.А. Негребецкий
«Системные цитокины у пожилых пациентов
с ишемической болезнью сердца после COVID-19
в ранние сроки выздоровления» // Медицинская
иммунология, 2023. Т. 25, № 6. С. 1417-1422.
doi: 10.15789/1563-0625-SCI-2669

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

For citation:

N.M. Agarkov, N.I. Zhernakova, V.A. Negrebetsky “Systemic
cytokines in elderly patients with coronary heart disease
at early recovery from COVID-19”, *Medical Immunology
(Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2023, Vol. 25, no. 6,
pp. 1417-1422. doi: 10.15789/1563-0625-SCI-2669

© Agarkov N.M. et al., 2023
The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License

DOI: 10.15789/1563-0625-SCI-2669

ственных различий в обеих группах. Следовательно, у пожилых пациентов с ишемической болезнью сердца и перенесенным COVID-19 через 3–4 недели выздоровления наиболее повышенными на системном уровне являются IL-6, IL-17, TNF α и IFN γ .

Ключевые слова: цитокины крови, COVID-19, пожилой возраст, ишемическая болезнь сердца, ранний период выздоровления, иммуноферментный анализ

SYSTEMIC CYTOKINES IN ELDERLY PATIENTS WITH CORONARY HEART DISEASE AT EARLY RECOVERY FROM COVID-19

Agarkov N.M.^{a, b}, Zhernakova N.I.^b, Negrebetsky V.A.^c

^a South-West State University, Kursk, Russian Federation

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

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

Abstract. The development of COVID-19 is accompanied by involvement of various cytokines in pathological process. Their change depends on age, concomitant pathology and some other factors that have not been sufficiently studied in elderly patients with coronary heart disease (CHD). The content of cytokines in blood plasma of patients aged 60–74 in the early period of recovery from COVID-19 also remains unknown. The aim of our study was to determine the content of systemic cytokines in elderly patients with coronary heart disease at the early stages of recovery after COVID-19. The patients aged 60–74 with CHD who had COVID-19 of moderate severity grade (n = 40) made up the main group. In which the study of The cytokine levels were studied in blood plasma 3 to 4 weeks after recovery. The control group consisted of 38 elderly patients with coronary heart disease and negative tests for COVID-19. of cytokines in both groups were determined by means of flow cytometry with “Becton Dickinson FACS Canto 2 (USA)” machine using appropriate reagent sets. We have found that, in elderly patients with CHD at 3–4 weeks after recovery from COVID-19, if compared with elderly patients with CHD without COVID-19, the content of IL-6 in blood plasma was increased to higher degree and at statistically significant difference, up to 32.9 ± 2.3 pg/mL versus 6.5 ± 0.7 pg/mL in the control group ($p < 0.001$). Excessive content in the main group was also detected for IL-17 in blood plasma which was 25.4 ± 1.9 pg/mL at the early post-COVID-19 period, whereas it was 7.8 ± 0.7 pg/mL ($p < 0.001$) in the age-matched patients with CHD only. TNF α and IFN γ levels were elevated among 60–74-year-old patients with CHD and COVID-19 at 3–4 weeks after recovery, being 128.6 ± 2.7 pg/mL and 57.6 ± 2.8 pg/mL, respectively. In control group, the concentration of these cytokines was significantly lower, i.e., 56.3 ± 2.2 pg/mL and 25.9 ± 1.7 pg/mL, respectively ($p < 0.001$). The changes in contents of other cytokines studied seemed less pronounced, and the level of IL-4 was not significantly different between the both groups. Hence, in elderly patients with CHD and COVID-19 at 3–4 weeks after recovery, IL-6, IL-17, TNF α and IFN γ are the most elevated cytokines at the systemic level.

Keywords: blood cytokines, COVID-19, old age, coronary heart disease, early recovery period, enzyme immunoassay

Введение

Пандемия новой коронавирусной инфекции, ассоциируемая с COVID-19 и официально признанная Всемирной организацией здравоохранения в марте 2020 г., сохраняет свою актуальность и в настоящее время, поскольку в различных странах, в том числе в Российской Федерации, несмотря на существенное снижение заболеваемости COVID-19, данное заболевание продолжает регистрироваться и вызывает серьезные ос-

ложнения, особенно в группах высокого риска, к которым относятся пациенты с ишемической болезнью сердца (ИБС) [2, 10]. Это связано с тем, что, хотя возбудитель SARS-CoV-2, представляющий одноцепочный РНК-вирус [5] и являющийся в первую очередь респираторным вирусом, способен вызывать повреждение миокарда [8]. Коронавирус, связываясь с рецепторами ангиотензинпревращающего фермента-2 на поверхности клеток, вызывает вирусную пневмонию с дополнительными внелегочными про-

явлениями и серьезными осложнениями, включая острое повреждение миокарда, аритмию кардиогенный шок, преимущественно у пациентов пожилого возраста [6]. Кроме того, пациенты с сопутствующими сердечно-сосудистыми заболеваниями, такими как артериальная гипертензия и ИБС, имеют худший клинический исход после заражения COVID-19 [11]. Среди причин неблагоприятных исходов и тяжелого течения короновирусной инфекции называется цитокиновый шторм [1, 4, 12].

В настоящее время показаны ассоциация между выраженностью экспрессии цитокинов и тяжестью COVID-19 [8], а также особенности восстановления содержания 46 цитокинов у пациентов в возрасте от 19 до 61 лет в зависимости от степени тяжести заболевания [1]. Однако у людей более старшего возраста – 60-74 лет и страдающих ИБС, содержание системных цитокинов после перенесенного COVID-19 в раннем периоде выздоровления остается неизвестным. Поэтому **целью данного исследования** является определение содержания системных цитокинов у пожилых пациентов с ИБС после COVID-19 в ранние сроки выздоровления.

Материалы и методы

В рамках данного исследования сформированы две клинические группы, рандомизированных по возрасту, полу и сопутствующей патологии: основная группа – пациенты 60-74 лет с ИБС и перенесенным COVID-19 средней тяжести в количестве 40 человек и контрольная группа – пациенты 60-74 лет с ИБС в количестве 38 человек с отсутствием COVID-19 в анамнезе и отрицательным тестом ПЦР.

Информация о перенесенном COVID-19 получена из официальной медицинской документации, выданной пациентам после обследования и лечения в стационарных условиях. В исследование включались только те пациенты, у которых диагноз COVID-19 верифицирован на основе клинической симптоматики и положительного теста ПЦР с выделением РНК SARS-CoV-2 в крови обследованных. Изучение цитокинового профиля у них проводилось через 3-4 недели после выздоровления.

Диагностика ИБС выполнялась по совокупности результатов электрокардиографического, эхокардиографического и лабораторных исследований с наличием патогномичных нарушений в содержании сердечного тропонина, энзимных показателей. В анамнезе пациентов 60-74 лет наблюдались ранее перенесенные случаи острого инфаркта миокарда, стенокардии покоя и напряжения, острого коронарного синдрома.

В исследование не включались пациенты с перенесенными в течение последнего полугода острыми респираторными инфекциями, герпесной инфекцией, вирусным гепатитом, вирусом иммунодефицита человека.

Определение содержания цитокинов проводили в плазме крови на аппарате Becton Dickinson FACS Canto 2 (США) методом проточной цитометрии с применением специальных наборов СВА (BD Biosciences, США).

Пациенты в основную и контрольную группы включались после получения письменного информированного согласия. Исследование осуществлялось с соблюдением общепринятых этических норм.

Полученные результаты обработаны в программе Statistica 10.0, а для оценки достоверности различий между сравниваемыми группами использовался критерий χ^2 . Различия считались статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты

В ранние сроки выздоровления после перенесенного COVID-19 у пациентов пожилого возраста с ИБС концентрация многих изученных цитокинов в плазме крови оставалась повышенной (табл. 1). Крайне высоким в этот период оставался в плазме крови уровень провоспалительного ИЛ-6, когда его содержание в 5,1 раза превышало аналогичный параметр пациентов такого же возраста с ИБС без COVID-19 в анамнезе со статистически значимым различием между группами. Среди пожилых пациентов с ИБС и перенесенным COVID-19 средней степени тяжести в раннем периоде выздоровления выявлено высокое содержание ИЛ-17 по сравнению с группой пациентов 60-74 лет с ИБС без COVID-19.

Однако высокий уровень ИЛ-17 в плазме крови в ранние сроки выздоровления после COVID-19 статистически значимо отличался не только относительно возрастного контроля, но и к уровню ИЛ-6 на вышеуказанный период наблюдения ($p < 0,05$).

Следует указать также на значительно повышенные уровни TNF α и IFN γ в плазме крови пациентов пожилого возраста с ИБС и COVID-19 в ранние сроки выздоровления по сравнению с пациентами аналогичного возраста, страдающих ИБС, и не имевших COVID-19 в анамнезе. При этом достоверно повышенные концентрации TNF α и IFN γ в раннем периоде выздоровления пациентов 60-74 лет с ИБС после перенесенного COVID-19 были практически в равной степени относительно группы сравнения.

На момент обследования пациентов пожилого возраста с ИБС и перенесенным COVID-19 высоким оставалось и содержание противовоспа-

ТАБЛИЦА 1. УРОВЕНЬ ЦИТОКИНОВ В ПЛАЗМЕ КРОВИ ПОЖИЛЫХ ПАЦИЕНТОВ С ИБС ПОСЛЕ COVID-19 В РАННИЕ СРОКИ ВЫЗДОРОВЛЕНИЯ (M±m, пг/мл)

TABLE 1. PLASMA LEVELS OF CYTOKINES IN ELDERLY PATIENTS WITH CORONARY ARTERY DISEASE AFTER COVID-19 IN THE EARLY RECOVERY PERIOD (M±m, pg/mL)

Название цитокинов Name of cytokines	Пациенты 60-74 лет с ИБС Patients 60-74 years old with CHD	Пациенты 60-74 лет с ИБС и COVID-19 Patients aged 60-74 with CHD and COVID-19	p
IL-2	3,4±0,3	5,9±0,5	< 0,01
IL-3	4,2±0,2	6,7±0,3	< 0,01
IL-4	4,7±0,4	5,1±0,4	> 0,05
IL-6	6,5±0,7	32,9±2,3	< 0,001
IL-7	16,4±0,8	21,5±1,2	< 0,001
IL-10	12,1±0,9	21,4±1,2	< 0,001
IL-15	20,2±0,9	29,8±1,1	< 0,01
IL-17	7,8±0,7	25,4±1,9	< 0,001
IL-18	83,4±2,3	72,5±1,8	< 0,01
TNFα	56,3±2,2	128,6±2,7	< 0,001
IFNα	68,5±2,1	97,4±3,2	< 0,001
IFNγ	25,9±1,7	57,6±2,8	< 0,001

лительного цитокина – IL-10 – в плазме крови со статистически значимым различием к группе сравнения в 1,7 раза. Вместе с тем концентрация IL-4 в плазме крови не имела достоверных различий среди пожилых пациентов с ИБС, переболевших COVID-19, и пожилых пациентов с ИБС ($p > 0,05$).

Достоверно повышенными через 3-4 недели после COVID-19 у пожилых пациентов с ИБС оказались в плазме крови уровни IL-2, IL-3, причем с практически эквивалентным превышением против возрастного контроля. Подобный вывод можно сделать и для IL-15, IL-7, IFNα, концентрация которых в плазме крови пожилых пациентов, перенесших COVID-19, в ранние сроки оставалась достоверно повышенной. Однако концентрация одного цитокина – IL-18 – у пациентов 60-74 лет с ИБС и COVID-19 в анамнезе спустя 3-4 недели после заболевания была статистически значимо ниже, чем у пациентов 60-74 лет с ИБС с отсутствием COVID-19 ($p < 0,01$).

Таким образом, через 3-4 недели после перенесенного COVID-19 у пожилых пациентов с ИБС в плазме крови сохранялись повышенные уровни большинства исследованных цитокинов, за исключением IL-4 и IL-18. При этом наиболее повышенными в названной группе пациентов оставались уровни IL-6, IL-17, TNFα и IFNγ, которые на наш взгляд, можно использовать в качестве ведущих маркеров восстановления пожилых пациентов с ИБС в раннем периоде выздоровления.

Обсуждение

Восстановление системного цитокинового профиля пожилых пациентов с ИБС после перенесенного COVID-19 до уровней возрастного контроля с ИБС и отсутствием COVID-19 происходит медленно и через рассматриваемые нами 3-4 недели имеет существенные различия, как и в более ранние сроки после выздоровления – 2 недели, когда Zhang Н.Х. и соавт. [13] выявили в плазме пациентов, переболевших COVID-19 и имевших полиморбидную соматическую патологию, в том числе ИБС, более высокие уровни IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17, TNFα, IFNγ, по сравнению с контролем из здоровых лиц. В связи с этим авторы считают, что повышенные уровни указанных цитокинов являются независимыми предикторами эффективности реабилитации. Эти результаты также показывают постепенное восстановление иммунной системы после перенесенного COVID-19, а устойчивый гипервоспалительный ответ, обусловленный цитокинами, более 14 дней предполагает необходимость продолжения медицинского наблюдения после выписки из стационара, но для полного понимания последствий COVID-19 в аспекте цитокиновых нарушений, по мнению авторов, необходимы лонгитюдные исследования выздоровевших пациентов [14].

В одном из фундаментальных российских исследований, выполненных в ведущем научном медицинском учреждении – ФБУН «Санкт-

Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера», показано достоверное снижение в плазме крови уровней 8 цитокинов из 46 исследованных у пациентов от 19 до 61 года после 30-100 дней выздоровления, обозначенных авторами фазой полного выздоровления, по сравнению с значениями контрольной группы [1]. При этом снижение присуще провоспалительным цитокинам: IL-1 α – в 2-4 раза ($p = 0,0063$), IL-2 – в 3,9 раза ($p < 0,0001$), IL-9 – в 2 раза ($p = 0,0079$), IL-12(p40) – в 1,8 раза ($p < 0,0001$). В зависимости от тяжести заболевания в группе реконвалесцентов, по сравнению с больными COVID-19, у которых заболевание протекало со средней и тяжелой/крайне тяжелой формами течения, характерно достоверное снижение содержания интерлейкинов IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-9, IL-12(p40), IL-12(p70), IL-13, IL-15, IL-17A/CTLA8, IL-17-E/IL-25, IL-18, IL-22, IL-27, IFN α , IFN γ и TNF α . Кроме того, достоверных различий в концентрациях цитокинов плазмы крови реконвалесцентов через 30-100 дней в группах со средней и тяжелой/крайне тяжелой формами COVID-19 не выявлено.

Другие данные о содержании цитокинов в плазме крови выздоровевших пациентов общей популяции и с ИБС после COVID-19 являются крайне скудными [1, 13]. Так, среди 7032 пациентов с лабораторно подтвержденным COVID-19 и с сопутствующей в 592 случаях ИБС у выздоровевших пациентов в острой фазе заболевания (COVID-19) по сравнению с умершими пациентами содержание в плазме крови IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF α было ниже с достоверным различием во всех случаях ($p < 0,0001$) [7]. В частности, максимально отличались уровни IL-6, составлявшие у выздоровевших $47,3 \pm 41,3$ пг/мл, против $183,9 \pm 165,9$ пг/мл – у умерших. Практически аналогичное соотношение установлено и для IL-8 – $43,6 \pm 30,9$ пг/мл и $134,8 \pm 115,3$ пг/мл. Менее существенными, хотя и достоверными, оказались различия в содержании в плазме

крови выздоровевших и умерших пациентов с COVID-19 IL-1 β и TNF α . На основании этого авторы полагают, что они определили сопутствующие заболевания, в частности ИБС, цитокины крови, связанные с повышенной клинической тяжестью и исходами у пациентов с COVID-19.

Показано, что увеличение сердечно-сосудистых заболеваний у пожилых с COVID-19 снижает частоту выздоровления и одновременно способствует высокой частоте летальных исходов, одной из причин которых выступает цитокиновый шторм [11]. Провоспалительные цитокины – IL-1, IL-6 и TNF α оказывают у пациентов с COVID-19 отрицательное инотропное действие на сократительную способность миокарда и индуцируют массивный апоптоз кардиомиоцитов, способствуя у больных ИБС возникновению острой сердечной недостаточности [9, 13]. Однако в исследовании Kaufmann С.С. и соавт. [10] у пациентов с ИБС как выживших, так и умерших не выявлено каких-либо ассоциаций с IL-32, IL-34, содержание которых в плазме крови было сопоставимо с больными без ИБС.

В целом же недостаточное количество исследований, выполненных на сегодняшний день, по изменению системного цитокинового статуса у выздоровевших пациентов, в том числе с ИБС, не дает однозначного представления о динамике цитокинов крови в разные сроки выздоровления и требует проведения новых исследований.

Заключение

В ранние сроки выздоровления пожилых пациентов с ИБС после перенесенного COVID-19 по сравнению с пожилыми пациентами с ИБС в плазме крови наблюдались повышенные уровни значительного количества цитокинов, но наибольшие достоверные различия установлены по содержанию IL-6, IL-17, TNF α и IFN γ , которые предлагается применять в качестве ведущих маркеров выздоровления пациентов 60-74 лет с ИБС и COVID-19.

Список литературы / References

1. Арсентьева Н.А., Любимова Н.Е., Бацунов О.К., Коробова З.Р., Станевич О.В., Лебедева А.А., Воробьев Е.А., Воробьева С.В., Куликов А.Н., Лиознов Д.А., Шарапова М.А., Певцов Д.Э., Тотолян А.А. Цитокины в плазме крови больных COVID-19 в острой фазе заболевания и фазе полного выздоровления // Медицинская иммунология, 2021. Т. 23, № 2. С. 311-326. [Arsentieva N.A., Lyubimova N.E., Batsunov O.K., Korobova Z.R., Stanevich O.V., Lebedeva A.A., Vorobyev E.A., Vorobyeva S.V., Kulikov A.N., Lioznov D.A., Sharapova M.A., Pevtsov D.E., Totolian A.A. Cytokines in blood plasma of COVID-19 patients in the acute phase of the disease and the phase of full recovery. *Meditsinskaya Immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2021, Vol. 23, no. 2, pp. 311-326. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-PCI-2312.
2. Беляева В.А. Патогенетические механизмы повреждения миокарда при COVID-19 // Современные проблемы науки и образования, 2021. № 6. С. 192. [Belyaeva V.A. Pathogenetic mechanisms of myocardial damage in COVID-19. *Sovremennye problemy nauki i obrazovaniya = Modern Problems of Science and Education*, 2021, no. 6, p. 192. (In Russ.)]

3. Клесова Е.Ю., Азарова Ю.Э., Суняйкина О.А., Полоников А.В. Валидация краткого опросника для оценки вклада средовых факторов риска в развитие возраст-зависимых заболеваний на примере сахарного диабета 2 типа и ишемической болезни сердца // Научные результаты биомедицинских исследований, 2022. Т. 8, № 1. С. 130-137. [Klyosova E.Yu., Azarova I.E., Sunyaykina O.A., Polonikov A.V. Validity of a brief screener for environmental risk factors of age-related diseases using type 2 diabetes and coronary artery disease as examples. *Nauchnye rezultaty biomeditsinskikh issledovaniy = Research Results in Biomedicine*, 2022, Vol. 8, no. 1, pp. 130-137. (In Russ.)]
4. Плешко А.А., Колядко М.Г., Русских И.И., Григоренко Е.А., Митьковская Н.П. Некоторые аспекты воспаления и эндотелиальной дисфункции у лиц с подтвержденной новой короновирусной инфекцией SARS-CoV-2 и острым тромбозом коронарных артерий // Кардиология в Беларуси, 2022. Т. 14, № 4. С. 388-395. [Pleshko A.A., Kolyadko M.G., Russian I.I., Grigorenko E.A., Mitkovskaya N.P. Some aspects of inflammation and endothelial dysfunction in individuals with confirmed new coronavirus infection SARS-CoV-2 and acute coronary artery thrombosis. *Kardiologiya v Belarusi = Cardiology in Belarus*, 2022, Vol. 14, no. 4, pp. 388-395. (In Russ.)]
5. Beeching N.J., Fletcher T.E., Beadsworth M.B. Covid-19: testing times. *BMC*, 2020, Vol. 369, m1403. doi: 10.1136/bmj.m1403.
6. Bonow R.O., Fonarow G.C., O'Gara P.T., Yancy C.W. Association of Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) With Myocardial Injury and Mortality. *JAMA Cardiol.*, 2020, Vol. 5, no. 7, pp. 751-753.
7. Brojakowska A., Eskandari A., Bissierier M., Bander J, Garikipati V.N., Hadri L., Goukassian D.A., Fish K.M. Comorbidities, sequelae, blood biomarkers and their associated clinical outcomes in the Mount Sinai Health System COVID-19 patients. *PLoS One*, 2021, Vol. 16, no. 7, e0253660. doi: 10.1371/journal.pone.0253660.
8. Gordon J.S., Drazner M.H. Biomarkers of cardiac stress and cytokine release syndrome in COVID-19: A Review. *Curr. Health Fail. Rep.*, 2021, Vol. 18, no. 3, pp. 163-168.
9. Huang C., Wang Y., Li X., Ren L., Zhao J., Hu Y., Zhang L., Fan G., Xu J., Gu X., Chen Z., Yu T., Xia J., Wei Y., Wu W., Xie X., Yin W., Li H., Liu M., Xiao Y., Gao H., Guo L., Xie J., Wang G., Jiang R., Gao Z., Jin Q., Wang J., Cao B. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet*, 2020, Vol. 395, no. 10223, pp. 497-506.
10. Kaufmann C.C., Ahmed A., Muthspiel M., Rostocki I., Pogran E., Zweiker D., Burger A.L., Jager B., Aicher G., Spiel A.O., Vafai-Tabrizi F., Gschwantler M., Fasching P., Wojta J., Huber K. Association of Interleukin-32 and Interleukin-34 with Cardiovascular Disease and Short-Term Mortality in COVID-19. *J. Clin. Med.*, 2023, Vol. 12, no. 3, 975. doi: 10.3390/jcm12030975.
11. Moccia F., Gerbino A., Lionetti V., Miragoli M., Munaron L.M., Pagliaro P., Pasqua T., Penna C., Rocca C., Samaja M., Angelone T. COVID-19-associated cardiovascular morbidity in older adults: a position paper from the Italian Society of Cardiovascular Researches. *Geroscience*, 2020, Vol. 42, no. 4, pp. 1021-1049. doi: 10.3390/jcm12030975.
12. Wang J.J., Su Y.J., Wang Q., Cao Y., Wang A.B., Ding R., Xie W. Sex differences in clinical characteristics and risk factors for disease severity of hospitalized patients with COVID-19. *MedComm (2020)*, 2021, Vol. 2, no. 2, pp. 247-255.
13. Zhou F., Yu T., Du R., Fan G., Liu Y., Liu Z., Xiang J., Wang Y., Song B., Gu X., Guan L., Wei Y., Li H., Wu X., Xu J., Tu S., Zhang Y., Chen H., Cao B. Clinical course and risk factors for mortality of adult inpatients with COVID-19 in Wuhan, China: a retrospective cohort study. *Lancet*, 2020, Vol. 395, no. 10229, pp. 1054-1062.
14. Zhang H.X., Li X., Li X., Li D. Circulating Cytokines and Lymphocyte Subsets in Patients Who Have Recovered from COVID-19. *Biomed Res. Int.*, 2020, Vol. 2020, 7570981. doi: 10.1155/2020/7570981.

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

Жернакова Н.И. — д.м.н., профессор, заведующая кафедрой семейной медицины ФГАОУ ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет», г. Белгород, Россия

Негребетский В.А. — клинический ординатор ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Authors:

Agarkov N.M., PhD, MD (Medicine), Professor, Department of Biomedical Engineering, South-West State University, Kursk; Senior Research Associate, Laboratory "Problems of Aging", Belgorod State National Research University, Belgorod, Russian Federation

Zhernakova N.I., PhD, MD (Medicine), Professor, Head of the Department of Family Medicine, Belgorod State National Research University, Belgorod, Russian Federation

Negrebetsky V.A., Clinical Resident, Russian N. Pirogov National Research Medical University, Moscow, Russian Federation

Поступила 20.03.2023
Принята к печати 26.03.2023

Received 20.03.2023
Accepted 26.03.2023

ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ В ОЦЕНКЕ ПАРАМЕТРОВ СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТОЙ СИСТЕМЫ СПОРТСМЕНОВ РАЗЛИЧНОЙ КВАЛИФИКАЦИИ

Мягкова М.А., Боброва З.В., Петроченко С.Н.

*ФГБУН «Федеральный исследовательский центр проблем химической физики и медицинской химии»
Российской академии наук, г. Черноголовка, Московская обл., Россия*

Резюме. Своевременная диагностика и профилактика сердечно-сосудистых заболеваний основана на маркерах, выявляющих изменения в организме спортсмена на ранних этапах. Для реализации указанной задачи актуально применение новых лабораторных методов анализа. Проведено сравнительное определение иммунологических маркеров, специфических антител к ангиотензину, брадикинину, гистамину, дофамину, серотонину и функциональных показателей сердечно-сосудистой системы у спортсменов различной квалификации. Объектом исследования были спортсмены сборных команд РФ, проходившие в рамках графика углубленное медицинское обследование (УМО). Участники эксперимента разделены на группы в зависимости от вида спорта и квалификации. Представители группы «Циклических видов спорта» включали спортсменов без разряда 30 человек и 29 спортсменов квалификации (Ивзр., КМС, МС, МСМК). Группу «Единоборства» составляли 32 человека без разряда и 31 спортсмена с квалификацией аналогично указанной выше. Спортсмены «Скоростно-силовых» видов спорта представлены группой из 31 человека без разряда и 29 спортсменов с квалификацией. Функциональные параметры сердечно-сосудистой системы включали анализ частоты сердечных сокращений, систолического артериального давления и диастолического артериального давления, которые сравнивали с контрольными величинами, установленными для спортсменов. Иммунологические показатели в сыворотке крови спортсменов и контрольной группы определяли методом твердофазного ИФА, используя для сорбции на планшет конъюгированные антигены ангиотензина, брадикинина, гистамина, дофамина, серотонина. Для сравнения показателей использовали группу контроля из 30 человек с отсутствием проявлений клиники сердечно-сосудистых заболеваний. Диастолическое артериальное давление для спортсменов циклических видов спорта и единоборств было ниже контрольных величин, а у спортсменов скоростно-силовых видов спорта выше значений контроля. Факт снижения диастолического артериального давления для указанных выше спортсменов свидетельствует о характерном физиологическом изменении миокарда сердца, которое носит адаптивный характер. Уровни иммунологических показателей к серотонину, дофамину для спортсменов всех групп соответствуют значениям контрольной группы. Исключение составили квалифицированные спортсмены циклических видов, достоверно отличающихся от нормы по сравнению со спортсменами без разряда. От квалификации

Адрес для переписки:

*Петроченко Светлана Николаевна
ФГБУН «Федеральный исследовательский центр
проблем химической физики и медицинской химии»
Российской академии наук
111024, Россия, Москва, ул. Авиамоторная, 51а,
ООО «ДИАНАРК».
Тел.: 8 (495) 673-39-42.
E-mail: dianark777@mail.ru*

Address for correspondence:

*Svetlana N. Petrochenko
Federal Research Center for Problems of Chemical Physics
and Medicinal Chemistry, Russian Academy of Sciences
51a Aviamotornaya St, "Dianark"
Moscow
111024 Russian Federation
Phone: +7 (495) 673-39-42.
E-mail: dianark777@mail.ru*

Образец цитирования:

*М.А. Мягкова, З.В. Боброва, С.Н. Петроченко
«Иммунологические показатели в оценке параметров
сердечно-сосудистой системы спортсменов различной
квалификации» // Медицинская иммунология, 2023.
Т. 25, № 6. С. 1423-1430.
doi: 10.15789/1563-0625-PIF-2608
© Мягкова М.А. и соавт., 2023
Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0*

For citation:

*M.A. Myagkova, Z.V. Bobrova, S.N. Petrochenko
"Immunological indexes for assessing parameters
of cardiovascular system in athletes of different qualification",
Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya,
2023, Vol. 25, no. 6, pp. 1423-1430.
doi: 10.15789/1563-0625-PIF-2608
© Myagkova M.A. et al., 2023
The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License
DOI: 10.15789/1563-0625-PIF-2608*

спортсмена не зависели достоверно высокие иммунологические показатели для гистамина и ангиотензина. У спортсменов, занимающихся скоростно-силовыми видами, значение показателей для брадикинина не отличалось от нормы, а для спортсменов циклических видов и единоборства достоверно превышало норму. Показано, что разный уровень и вид спортивной деятельности по-своему действует на показатели сердечно-сосудистой системы. Изменение иммунологических показателей отражает состояние регуляторов сердечно-сосудистой системы. Соответственно, их одномоментное увеличение по отношению к контролю может свидетельствовать об участии в развитии сердечно-сосудистых заболеваний. А различия в повышении их уровня для спортсменов, занимающихся единоборствами циклическими и скоростно-силовыми видами, показывает более глубокие изменения регуляторных систем, связанные с длительностью и уровнем физической нагрузки.

Ключевые слова: артериальная гипертензия, спортивная деятельность, серотонин, дофамин, брадикинин, ангиотензин, гистамин, естественные антитела, иммуноферментный анализ

IMMUNOLOGICAL INDEXES FOR ASSESSING PARAMETERS OF CARDIOVASCULAR SYSTEM IN ATHLETES OF DIFFERENT QUALIFICATION

Myagkova M.A., Bobrova Z.V., Petrochenko S.N.

Federal Research Center for Problems of Chemical Physics and Medicinal Chemistry, Russian Academy of Sciences, Chernogolovka, Moscow Region, Russian Federation

Abstract. Timely diagnosis and prevention of cardiovascular diseases is based on markers that detect changes in the athlete's body at an early stage of disease. To implement this task, it is important to use novel laboratory techniques. We have carried out a comparative determination of immunological markers, specific antibodies to angiotensin, bradykinin, histamine, dopamine, serotonin and functional indicators of the cardiovascular system in athletes of various qualifications. The object of study included athletes of the Russian national teams who underwent an in-depth examination (IME) as part of medical survey. The participants were divided into groups depending on the sport arts and qualifications. Representatives of the group "Cyclic sports" included athletes without a category of 30 people and 29 qualified athletes (1st step, Candidate Master, Master of Sports, etc.). The "Combat sports" group consisted of 32 people without a category and 31 athletes with qualifications similar to those indicated above. Athletes of "Speed-strength" sports are represented by a group of 31 people without a category and 29 athletes with qualifications. The functional parameters of the cardiovascular system included analysis of heart rate, systolic blood pressure and diastolic blood pressure, which were compared with control values established for the athletes. The immunological indexes were determined in blood serum of the athletes and in subjects from control group by means of the solid-phase ELISA method using conjugated antigens of angiotensin, bradykinin, histamine, dopamine, serotonin for absorption on the plates. To compare the indexes, a control group of 30 people without cardiovascular symptoms was examined. Diastolic blood pressure for athletes of cyclic sports and combat sports was below the control values, and, for athletes of speed-strength sports, it was higher than in control group. A decrease in diastolic blood pressure for the above subgroup of athletes may indicate characteristic adaptive physiological changes in myocardium. The levels of immune-related indexes for serotonin, dopamine for the athletes of all groups corresponded to the control values. The only exception concerned qualified athletes of cyclic sports, which significantly differed from the normal values, compared to athletes without a sports category. Significantly high immunological parameters for histamine and angiotensin did not depend on the athlete's qualification. In athletes involved in speed-strength sports, the levels of indexes for bradykinin did not differ from the normal values, and, for athletes in cyclic sports and combat sports, they significantly exceeded the norm.

We have shown that different levels and types of sports activities affect the performance of cardiovascular system in their own way. The changes in immunological parameters reflect regulatory state of cardiovascular system. Accordingly, their simultaneous increase against the control may indicate participation in the development of cardiovascular diseases. The differences in their levels for athletes involved in combat sports, cyclic and speed-strength sporting activities show deeper changes in regulatory systems associated with duration and level of physical activities.

Keywords: arterial hypertension, sports activity, serotonin, dopamine, bradykinin, angiotensin, histamine, natural antibodies, enzyme immunoassay

Введение

Оценка функционального состояния и потенциальных возможностей организма человека является актуальной задачей как для спорта высших достижений, так и для организации процесса регулярных занятий физкультурой населением. Современными исследователями установлено, что гиподинамия и стресс относятся к важнейшим факторам риска развития сердечно-сосудистых заболеваний [7, 9]. Известно, что многие виды спортивных упражнений приводят к снижению артериального давления и уменьшению риска развития сердечно-сосудистых заболеваний, являясь профилактическим мероприятием в отношении артериальной гипертензии [10]. В свою очередь, физические нагрузки оказывают влияние на морфологию и работу сердечно-сосудистой системы спортсменов. С одной стороны, происходит развитие адаптационной реакции миокарда [8, 12]. Но, с другой, чрезмерные физические и психоэмоциональные нагрузки сказываются на состоянии функциональной согласованности регуляторных систем, приводя к перенапряжению, сбою сердечного ритма и срыву адаптации у спортсменов [2, 11]. Развитие данной патологии сопровождается нарушением гомеостатического равновесия, в поддержании которого включено множество систем разного уровня. В конечном итоге в клинике заболевания это проявляется в виде изменения иммунологических, биохимических и других параметров [5]. Рост реальных возможностей и мастерства у квалифицированных спортсменов в немалой степени зависит от эффективности адаптационных свойств организма, определяющих риск развития сердечно-сосудистых заболеваний [1, 3]. Адаптационный ресурс организма на молекулярном уровне характеризуется состоянием системы эндогенных биорегуляторов (ЭБ), обеспечивающих биохимическое гомеостатическое равновесие [3, 5]. Предрасположенность человека к различным заболеваниям, а также его физический и психоэмоциональный потенциал зависят от регуляторных характеристик системы ЭБ [5, 14]. Для своевременной диагностики и профилактики сердечно-сосудистых заболеваний необходимо располагать маркерами, позволяющими выявлять на самых ранних этапах изменения в организме спортсмена. Решение такой задачи может обеспечиваться применением лабораторных методов анализа. В настоящее время разработаны аналитические методы измерения уровня естественных антител (e-Ат), характеризующих состояние системы эндогенных биорегуляторов, участвующих в молекулярных механизмах процесса адаптации [5, 6]. Совокупность e-Ат отражает и регулирует индивидуальный моле-

кулярно-клеточный состав организма [5, 8]. Их содержание находится в прямой зависимости от уровня эндогенных мишеней. Установлено, что свойства указанных иммунологических маркеров претерпевают изменения в качественном и количественном отношении, на самых ранних стадиях возникновения заболевания [3, 5]. Использование такого подхода в клинико-лабораторной практике позволяет создать прогностические тесты определения факторов рисков развития сердечно-сосудистой патологии.

Цель настоящего исследования заключалась в сравнительном определении иммунологических маркеров, специфических антител к ангиотензину, брадикинину, гистамину, дофамину, серотонину и функциональных показателей сердечно-сосудистой системы у спортсменов различной квалификации.

Материалы и методы

Работа выполнена на базе клинико-диагностической лаборатории «Дианарк» г. Москвы (Лицензия № ЛО-77-01-000844 от 10.12.2008 г.). Материалы для исследования предоставлены Клиникой спортивной медицины «Лужники» г. Москва, проводящей в рамках углубленного медицинского обследования (УМО) осмотр спортсменов сборных команд РФ. Все участники эксперимента разделены на группы в зависимости от вида спорта и квалификации. Представители группы «Циклических видов спорта» включали спортсменов без разряда 30 человек и 29 спортсменов квалификации I взр. КМС, МС, МСМК. Группу «Единоборства» составляли 32 человека без разряда и 31 спортсмен квалификации I взр. КМС, МС, МСМК. Спортсмены «Скоростно-силовых» видов спорта составили группу из 31 человека без разряда и 29 спортсменов квалификации I взр. КМС, МС, МСМК. Параметры сердечно-сосудистой системы сравнивали с контрольными референсными величинами, установленными для спортсменов [8]. Анализировали такие параметры, как частота сердечных сокращений (ЧСС), систолическое артериальное давление (АДС) и диастолическое артериальное давление (АДД).

Забор образцов сыворотки крови для исследования у спортсменов указанных выше групп выполняли по согласованию с тренером в периоды, включающие проведение процедуры дополнительного тестирования специалистами. В иммунологических исследованиях для сравнения показателей использовали группу контроля, которая включала здоровых лиц с отсутствием проявлений клиники сердечно-сосудистых заболеваний и состояла из 30 человек одинакового возраста с обследуемыми участниками экспери-

мента. Иммунохимический анализ проводили по разработанным ранее методам [6]. В качестве оборудования использовали спектрофотометр фирмы Thermo (Финляндия). Анализ антител к ангиотензину, брадикинину, гистамину, дофамину, серотонину проводили с использованием планшетов фирмы Nunc (Дания). Статистическую обработку результатов выполняли с применением пакета программ SPSS 19.0 для научных исследований. Для оценки результатов выбрали значение величины средней арифметической (M), стандартной ошибки (m). Использовали при обработке данных критерии Пирсона, Стьюдента–Уэлча (t). Гипотезы принимали с достоверностью 95% (p = 0,05).

Результаты

Данные о функциональном состоянии организма спортсменов были получены в процессе углубленного медицинского обследования (УМО), проводимого в соответствии с графиком

тренировочного процесса. Ранними маркерами изменения сердечно-сосудистой системы у большинства спортсменов высокой квалификации могут служить сдвиги систолического артериального давления. Из полученных данных, представленных в таблице 1, видно, что у всех спортсменов систолическое артериальное давление и частота сердечных сокращений были выше контрольных величин [12]. Диастолическое артериальное давление у спортсменов циклических видов спорта и единоборств было ниже контрольных величин. Спортсмены, входящие в группу скоростно-силовых видов спорта, имели диастолическое артериальное давление выше контрольных величин. Снижение значения диастолического артериального давления у спортсменов циклических видов спорта и единоборств свидетельствует о характерном изменении миокарда сердца, которое носит физиологический характер. Для спортсменов скоростно-силовых видов спорта происходит уплотнение стенки миокарда за счет фиброзных

ТАБЛИЦА 1. ОСНОВНЫЕ ПАРАМЕТРЫ СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТОЙ СИСТЕМЫ СПОРТСМЕНОВ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ УРОВНЯ КВАЛИФИКАЦИИ, M±m (n = 182)

TABLE 1. MAIN CARDIOVASCULAR PARAMETERS IN ATHLETES OF VARIOUS QUALIFICATION, M±m (n = 182)

Виды спорта Types of sports	Квалификация Qualification	АДД (мм рт. ст.) DBP (mmHg)	АДС (мм рт. ст.) SBP (mmHg)	рАДД (мм рт. ст.) dDBP (mmHg)	рАДС (мм рт. ст.) dSBP (mmHg)	ЧСС (уд/мин) HR (bpm)	рЧСС (уд/мин) dHR (bpm)
Циклический Cyclic n = 30	Без разряда Without rank	68,33±0,30 ***	114,00±0,37 **	70,75±0,01	111,30±0,01	72,36±0,22 ***	67,91±0,08
Циклический Cyclic n = 29	I взр., КМС, МС, МСМК 1 st adult, CMS, MS, MSIL	70,69±0,29 ***	118,27±0,39 ***	74,17±0,04	115,41±0,05	76,79±0,16 ***	65,97±0,05
Единоборства Martial arts n = 32	Без разряда Without rank	70,31±0,33 *	113,13±0,38 **	70,86±0,01	111,43±0,02	72,59±0,28 ***	67,83±0,08
Единоборства Martial arts n = 31	I взр., КМС, МС, МСМК 1 st adult, CMS, MS, MSIL	73,54±0,33 **	118,71±0,33 ***	74,10±0,05	115,29±0,06	75,22±0,19 ***	63,35±0,10
Скоростно- силовые Speed-strength n = 31	Без разряда Without rank	73,54±0,35 ***	116,13±0,25 ***	70,90±0,02	111,49±0,02	72,16±0,11 ***	66,98±0,06
Скоростно- силовые Speed-strength n = 29	I взр., КМС, МС, МСМК 1 st adult, CMS, MS, MSIL	81,38±0,34 ***	126,55±0,38 ***	73,96±0,04	115,16±0,05	66,07±0,11 ***	62,5±0,07

Примечание. АДД – артериальное диастолическое давление; АДС – артериальное систолическое давление; ЧСС – частота сердечных сокращений; * – p < 0,05; ** – p < 0,01; *** – p < 0,001 – достоверность различий по сравнению с референтными величинами; n – количество человек в выборке.

Note. DBP, diastolic blood pressure; SBP, systolic blood pressure; HR, heart rate; * p < 0.05; ** p < 0.01; *** p < 0.001, significance of differences compared to reference values; n, number of people in samples.

изменений, что в реальности и приводит к таким показателям давления относительно контрольных величин. Эти факты являются причиной развития артериальной гипертензии [10, 15].

Выполнено определение специфических иммунологических маркеров – естественных антител к молекулам регуляторам работы сердечно-сосудистой системы у спортсменов, занимающихся различными видами спорта и отличающихся уровнем квалификации (табл. 2).

При определении иммунологических показателей в группах обследованных спортсменов установлены отличия их значений, связанные с квалификацией и видом спортивных занятий. Уровни естественных антител к серотонину, дофамину для спортсменов, занимающихся единоборством, скоростно-силовыми и циклическими видами спорта близки к показателям нормы и соответствуют значениям контрольной группы. Однако обнаружены достоверные отличия

от нормы для квалифицированных спортсменов циклических видов по сравнению со спортсменами, не имеющими разряда. Иммунологические показатели для гистамина и ангиотензина достоверно выше нормы в перечисленных выше группах спортсменов. Причем во всех случаях эти различия не зависели от квалификации спортсмена. Уровень иммунологических показателей к брадикинину достоверно превышает норму для спортсменов циклических видов и единоборства. У спортсменов, занимающихся скоростно-силовыми видами, значение показателей для брадикинина не отличалось от нормы.

Обсуждение

Известно, что тренировки спортсменов, включающие силовые упражнения, могут приводить к значительному повышению артериального давления непосредственно в момент выполнения комплекса, являющегося триггером дальнейшего

ТАБЛИЦА 2. ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ (OD450 ИФА) В СЫВОРОТКЕ КРОВИ СПОРТСМЕНОВ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ УРОВНЯ КВАЛИФИКАЦИИ, М±m (n = 212)

TABLE 2. IMMUNOLOGICAL INDICATORS (OD450 ELISA) IN THE BLOOD SERUM OF ATHLETES DEPENDING ON THE LEVEL OF QUALIFICATION, M±m (n = 212)

Обследуемые группы Study groups		Значение иммунологических показателей e-Ат к Value of immunological indicators n-Ab to				
Виды спорта Types of sports	Квалификация Qualification	серотонин serotonin	гистамин histamine	дофамин dopamine	ангиотензин angiotensin	брадикинин bradikinin
Циклический Cyclic n = 30	Без разряда Without rank	0,69±0,09	0,66±0,20*	0,78±0,13	0,92±0,19*	0,87±0,18
Циклический Cyclic n = 29	I взр., КМС, МС, МСМК 1 st adult, CMS, MS, MSIL	0,86±0,08*	0,68±0,18*	1,17±0,12*	0,72±0,17*	1,22±0,10*
Единоборства Martial arts n = 32	Без разряда Without rank	0,75±0,12	0,59±0,21*	0,86±0,14	0,89±0,21*	1,05±0,15*
Единоборства Martial arts n = 31	I взр., КМС, МС, МСМК 1 st adult, CMS, MS, MSIL	0,77±0,15	0,79±0,21*	0,79±0,16	0,85±0,16*	1,19±0,13*
Скоростно-силовые Speed-strength n = 31	Без разряда Without rank	0,79±0,11	0,85±0,27*	0,84±0,17	0,90±0,14*	0,89±0,20
Скоростно-силовые Speed-strength n = 29	I взр., КМС, МС, МСМК 1 st adult, CMS, MS, MSIL	0,69±0,13	0,95±0,21*	0,78±0,14	0,81±0,12*	0,84±0,18
Группа контроля Control group n = 30		0,59±0,08	0,54±0,07	0,77±0,10	0,47±0,09	0,69±0,09

Примечание. * – p < 0,05; ** – p < 0,01; *** – p < 0,001 – достоверность различий по сравнению с контрольными величинами; n – количество человек в выборке.

Note. * p < 0.05; ** p < 0.01; *** p < 0.001, significance of differences compared to reference values; n, number of people in samples.

развития сердечно-сосудистых заболеваний [3, 4]. Понимание молекулярных механизмов функционально-метаболических нарушений, происходящих в организме спортсмена, и выявление прогностических маркеров этого процесса помогает снизить риск осложнений различной этиологии [8, 10]. Регуляторы биохимического гомеостаза, такие как биогенные амины – серотонин, гистамин, дофамин, пептиды – брадикинин, ангиотензин, участвуют в функционировании сердечно-сосудистой системы [1, 4, 12]. Так, ангиотензин входит в ренин-ангиотензин-альдостероновую систему, представляющую собой комплекс гормонов, которые регулируют артериальное давление и объем циркулирующей крови [4, 11, 12]. В патогенезе артериальной гипертензии и сердечной недостаточности происходит ее активация, которая запускает и в дальнейшем поддерживает порочный круг при этих состояниях. Брадикинин является продуктом ферментативных реакций, происходящих в кинин-калекреиновой системе. В противовес ангиотензину брадикинин повышает выработку оксида азота и вазодилатирующих простагландинов, расширяя сосуды и улучшая функцию эндотелия и выделение почками натрия и воды [3, 8]. Моноамины серотонин дофамин и гистамин, одновременно выполняющие функции основных нейромедиаторов и гормонов поддерживают гомеостаз [4, 15]. Разностороннее влияние этих регуляторов на организм объясняется взаимодействием со специфическими рецепторами клеточных органелл, запускающих каскад реакций вторичных мессенджеров. Серотонин отвечает за нормальную свертываемость крови и стабильную работу кровеносной системы. Функции гормона дофамина включают улучшение коронарного кровоснабжения (питание сердца), а также способствует повышению процента кислорода в крови, омывающей мозг. Гистамин увеличивает проницаемость кровеносных сосудов, вызывая образование щелей между эндотелиальными клетками капилляров, стимулируя выход оксида азота из эндотелия, оказывая прямое релаксирующее действие на сосуды [8, 13].

Установлено участие гуморальных факторов иммунитета в течении патологических процессов, которые сопровождаются изменением продукции естественных антител, способных специфически взаимодействовать с указанными выше молекулами – регуляторами [3, 5]. При определении иммунологических показателей в группах обследованных спортсменов, занимающихся единоборством, скоростно-силовыми и циклическими видами спорта, не установлено достоверных отличий от контрольных значений для антител к серотонину, дофамину. Но, обнаружены

достоверные отличия от нормы для спортсменов циклических видов, высокой квалификации и имеющих более длительный опыт спортивной деятельности. Для этой же категории спортсменов наблюдались стабильно высокие показатели артериального давления при нагрузках. Необходим дальнейший строгий контроль со стороны тренера и врача. Вероятность развития артериальной гипертензии велика, т. к. первоначальное проявление организма на физические нагрузки является ответной адаптивной реакцией, которая и становится одним из главных компонентов в синдроме спортивного сердца [10, 12].

Иммунологические показатели гистамина и ангиотензина достоверно выше нормы для всех спортсменов, независимо от их квалификации и вида спортивных занятий. Повышение в организме уровня ангиотензина на протяжении длительного периода приводит к изменению синтеза коллагеновых волокон, в результате гипертрофируются гладкомышечные клетки кровеносных сосудов. Если для спортсменов циклических видов спорта и единоборств эти изменения носят обратимый адаптивный характер, то для спортсменов скоростно-силовых видов спорта, происходит уплотнение стенки миокарда за счет фиброзных изменений, что приводит к артериальной гипертензии [3, 13, 15]. На этом фоне, для указанной группы спортсменов, установлено симбатное изменение значений иммунологических показателей ангиотензина и гистамина. Достоверное повышение уровня е-Ат к гистамину можно рассматривать как компенсаторную реакцию, позволяющую повысить проницаемость сосудистых стенок мелких и крупных артерий, приводя к падению артериального давления после физической нагрузки [12, 15]. Уровень иммунологических показателей для брадикинина достоверно превышает норму для спортсменов циклических видов и единоборства. В этом случае можно отметить благоприятный баланс между иммунологическими показателями для ангиотензина и брадикинина, который способствует фибринолизу, подавляет рост клеток и оказывает выраженное защитное действие на стенки сосудов. Именно для этой категории спортсменов изменение миокарда сердца носит физиологический адаптивный характер. Для спортсменов, занимающихся скоростно-силовыми видами уровень показателей для брадикинина не отличался от нормы.

Заключение

Таким образом, анализ иммунологических показателей – е-Ат к перечисленным выше антигенам имеет диагностическую значимость. Известно, что изменение уровня е-Ат и концентрации самих антигенов, к которым и относятся иссле-

двумя эндогенными регуляторами гомеостаза, являются взаимосвязанными величинами [3, 8]. Соответственно, их одномоментное увеличение по отношению к контролю может свидетельствовать об их участии в развитии сердечно-сосудистых заболеваний. А различия в повышении уровня е-Ат для спортсменов, занимающихся циклическими видами, единоборствами и скоростно-силовыми видами, показывают более глубокие изменения регуляторных систем, связанные с длительностью и уровнем физической нагрузки.

Этические нормы

Все исследования проведены в соответствии с принципами биомедицинской этики, сформулированными в Хельсинкской декларации 1964 г. и ее последующих обновлениях, и одобрены локальным биоэтическим комитетом «Института

физиологически активных веществ РАН» (Черноголовка, Московская область).

Информированное согласие

Каждый участник исследования представил добровольное письменное информированное согласие, подписанное им после разъяснения ему потенциальных рисков и преимуществ, а также характера предстоящего исследования.

Финансирование

Работа выполнена в соответствии с исследованием, согласно Госрегистрации № 01200952666.

Благодарности

Авторы благодарят И.Ю. Ревнивых, к.б.н., главного врача Областного центра медицинской профилактики, лечебной физкультуры и спортивной медицины г. Тюмень, за помощь в работе со спортсменами.

Список литературы / References

1. Бойцов С.А., Зайратьянц О.В., Андреев Е.М., Самородская И.В. Сравнение показателей смертности от ишемической болезни сердца среди мужчин и женщин старше 50 лет в России и США // Российский кардиологический журнал, 2017. № 6. С. 100-107. [Boytsov S.A., Zayratyants O.V., Andreev E.M., Samorodskaya I.V. Comparison of coronary heart disease mortality in men and women age 50 years and older in Russia and USA. *Kardiologiya = Russian Journal of Cardiology*, 2017, no. 6, pp. 100-107. (In Russ.)]
2. Иорданская Ф.А. Нарушения показателей «срочной» адаптации в процессе напряженной тренировочной работы высококвалифицированных спортсменов и средства квалифицированных спортсменов и средства их профилактики // Вестник спортивной науки, 2018. № 3. С. 35-40. [Iordanskaya F.A. Disturbances of "urgent" adaptation indicators in the process of stressed training work in elite athletes and means of their prevention. *Vestnik sportivnoy nauki = Sports Science Bulletin*, 2018, no. 3, pp. 35-40. (In Russ.)]
3. Крыжановский Г.Н., Акмаев И.Г., Магаева С.В., Морозов С.Г. Нейроиммуноэндокринные взаимодействия в норме и патологии. М.: Медицинская книга, 2010. 288 с. [Kryzhanovsky G.N., Akmaev I.G., Magaeva S.V., Morozov S.G. Neuroimmunoendocrine interactions in health and disease]. Moscow: Meditsinskaya kniga, 2010. 288 p.
4. Мягкова М.А., Морозова В.С. Естественные антитела и их физиологические функции // Иммунопатология. Аллергология. Инфектология, 2014. № 3. С. 75. [Myagkova M.A., Morozova V.S. Natural antibodies and their physiological functions. *Immunopatologiya. Allergologiya. Infektologiya = Immunopathology, Allergology, Infectology*, 2014, no. 3, p. 75. (In Russ.)]
5. Мягкова М.А., Петроченко С.Н., Морозова В.С. Определение антител к эндогенным биорегуляторам для диагностики функционального состояния организма // Известия АН. Серия химическая, 2018. № 4. С. 762-767. [Myagkova M.A., Petrochenko S.N., Morozova V.S. Detection of natural antibodies to endogenous bioregulators for the diagnostics of the functional state of the body. *Izvestiya AN. Seriya khimicheskaya = Russian Chemical Bulletin*, 2018, Vol. 67, no. 4, pp. 762-767. (In Russ.)]
6. Никулина Н.Н., Якушин С.С. Современные аспекты формулировки диагноза и статистического учета инфаркта миокарда // Кардиология, 2016. Т. 56, № 9. С. 60-66. [Nikulina N.N., Yakushin S.S. The modern aspects of diagnosis formulation and statistical recording of myocardial infarction. *Kardiologiya = Cardiology*, 2016, Vol. 56, no. 9, pp. 60-66. (In Russ.)]
7. Орлов О.И., Переведенцев О.В., Мамонова Е.Ю., Леванов В.М. Метод автоматизированного комплексного анализа состояния здоровья и медицинского обеспечения в экстремальных условиях производственной деятельности // Авиакосмическая и экологическая медицина, 2017. Т. 51, № 4. С. 39-44. [Orlov O.I., Perevedentsev O.V., Mamonova E.Yu., Levanov V.M. Method of automated complex analysis of health and medical provision in extreme occupational environments. *Aviakosmicheskaya i ekologicheskaya meditsina = Aerospace and Ecological Medicine*, 2017, Vol. 51, no. 4, pp. 39-44. (In Russ.)]
8. Садыкова Д.И., Лутфуллин И.Я. Эссенциальная артериальная гипертензия спортсменов // Казанский медицинский журнал, 2012. Т. 93, № 6. С. 927-931. [Sadykova D.I., Lutfullin I.Ya. Essential arterial hypertension in athletes. *Kazanskiy meditsinskiy zhurnal = Kazan Medical Journal*, 2012, Vol. 93, no. 6, pp. 927-931. (In Russ.)]
9. Сайгитов Р.Т., Чулок А.А. Сердечно-сосудистые заболевания в контексте социально экономических приоритетов долгосрочного развития России // Вестник Российской академии медицинских наук, 2015.

Т. 70, № 3. С. 286-299. [Saygitov R.T., Chulok A.A. Cardiovascular diseases in the context of Russia's long-term socio-economic development priorities. *Vestnik Rossiyskoy akademii meditsinskikh nauk = Bulletin of the Russian Academy of Medical Sciences*, 2015, Vol. 70, no. 3, pp. 286-299. (In Russ.)]

10. Смоленский А.В., Борисова Ю.А. Особенности физиологического ремоделирования спортивного сердца // Лечебная физкультура и спортивная медицина, 2012. № 6. С. 9-14. [Smolenskiy A.V., Borisova Yu.A. The specific features of a physiological remodeling of "an athlete's heart". *Lechebnaya fizkultura i sportivnaya meditsina = Therapeutic Exercise and Sports Medicine*, 2012, no. 6, pp. 9-14. (In Russ.)]

11. Спасский А.А., Мягкова М.А., Левашова А.И., Кукушкин С.К., Куршев В.В., Янова Ю.В. Методология комплексной оценки адаптационного потенциала спортсмена к нагрузке // Спортивная медицина: наука и практика, 2019. № 3. С. 49-61. [Spassky A.A., Myagkova M.A., Levashova A.I., Kukushkin S.K., Kurshev V.V., Yanova Yu.V. Methodology of comprehensive assessment of the athlete's adaptive potential to the load. *Sportivnaya meditsina: nauka i praktika = Sports Medicine: Science and Practice*, 2019, no. 3, pp. 49-61. (In Russ.)]

12. Blume K., Körber N., Hoffmann D., Wolfarth B. Training load, immune status, and clinical outcomes in young athletes: a controlled, prospective, longitudinal study. *Front. Physiol.*, 2018, Vol. 9, 120. doi: 10.3389/fphys.2018.00120.

13. Lee E.C., Fragala M.S., Kavouras S.A., Queen R.M., Pryor J.L., Casa D.J. Biomarkers in sports and exercise: tracking health, performance, and recovery in athletes. *J. Strength Cond. Res.*, 2017, Vol. 31, no. 10, pp. 2920-2937.

14. Nieto-Alamilla G., Márquez-Gómez R., García-Gálvez A.M., Morales-Figueroa G.E., Arias-Montaña J.A. The histamine H3 receptor: structure, pharmacology, and function. *Mol. Pharmacol.*, 2016, Vol. 90, pp. 649-673.

15. Varró A., Baczkó I. Possible mechanisms of sudden cardiac death into pathletes: a basic cardiac electrophysiological point of view. *Cardiovasc. Physiol.*, 2010, Vol. 460, no. 1, pp. 31-40.

Авторы:

Мягкова М.А. — д.б.н., профессор, заведующая лабораторией иммунохимии ФГБУН «Федеральный исследовательский центр проблем химической физики и медицинской химии» Российской академии наук, г. Черноголовка, Московская обл., Россия

Петроченко С.Н. — к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории иммунохимии ФГБУН «Федеральный исследовательский центр проблем химической физики и медицинской химии» Российской академии наук, г. Черноголовка, Московская обл., Россия

Боброва З.В. — младший научный сотрудник лаборатории иммунохимии ФГБУН «Федеральный исследовательский центр проблем химической физики и медицинской химии» Российской академии наук, г. Черноголовка, Московская обл., Россия

Authors:

Myagkova M.A., PhD, MD (Biology), Professor, Head, Laboratory of Immunochemistry, Federal Research Center for Problems of Chemical Physics and Medicinal Chemistry, Russian Academy of Sciences, Chernogolovka, Moscow Region, Russian Federation

Petrochenko S.N., PhD (Biology), Senior Research Associate, Laboratory of Immunochemistry, Federal Research Center for Problems of Chemical Physics and Medicinal Chemistry, Russian Academy of Sciences, Chernogolovka, Moscow Region, Russian Federation

Bobrova Z.V., Junior Research Associate, Laboratory of Immunochemistry, Federal Research Center for Problems of Chemical Physics and Medicinal Chemistry, Russian Academy of Sciences, Chernogolovka, Moscow Region, Russian Federation

Поступила 08.11.2022

Отправлена на доработку 10.11.2022

Принята к печати 24.02.2023

Received 08.11.2022

Revision received 10.11.2022

Accepted 24.02.2023

СОПОСТАВЛЕНИЕ РАЗНЫХ МЕТОДОВ ОЦЕНКИ КЛЕТОЧНОГО ИММУНИТЕТА К ВИРУСУ SARS-CoV-2

Афридонова З.Э.¹, Топтыгина А.П.^{1,2}, Боголюбова А.В.³,
Семикина Е.Л.^{4,5}

¹ ФБУН «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Г.Н. Габричевского» Роспотребнадзора, Москва, Россия

² ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», Москва, Россия

³ ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

⁴ ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

⁵ ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Резюме. Большинство методов оценки Т-клеточного иммунитета трудоемки и непригодны для рутинной лабораторной диагностики. Это стимулирует исследователей к созданию доступных и воспроизводимых тестов. Цель исследования – сопоставление трех методов оценки уровня клеточного иммунного ответа на антигены вируса SARS-CoV-2 у переболевших и привитых от новой коронавирусной инфекции. Обследованы: 26 человек, перенесших COVID-19 в легкой или среднетяжелой форме (группа 1), 19 человек, дважды привитых «Спутником V», не болевших COVID-19 (группа 2), 21 человек, перенесший COVID-19 и дважды вакцинированных «Спутником V» (группа 3) и 14 человек, дважды перенесших COVID-19 (группа 4). Мононуклеары периферической крови выделяли градиентным центрифугированием. При оценке первым методом мононуклеары инкубированы с S-белком вируса SARS-CoV-2, окрашивали флуоресцентно мечеными антителами, затем на проточном цитометре BD FACS Canto II подсчитывали процент CD8^{high}CD107a⁺. При оценке методом ELISpot на наборе Human IFN- γ ELISpot продукцию IFN γ стимулировали S-белком SARS-CoV-2, или смесью пептидов белков SARS-CoV-2 на наборе Corona-T-test. По уровню экспрессии CD107a на CD8^{high} в группах 1, 2, 3 и 4 и количеству продуцентов IFN γ на S-белок вируса SARS-CoV-2 на наборе Human IFN- γ ELISpot значимых различий не обнаружено. Продукция IFN γ группы 3 (гибридный иммунитет) значимо ниже (317,29 \pm 19,04 пг/мл) групп 1 и 2 (постинфекционный и поствакцинальный иммунитет) 454,95 \pm 20,32 и 470,77 \pm 26,24 пг/мл. Относительный уровень IFN γ -продуцирующих клеток в группе 2 был выше (22,34 \pm 3,77) против 16,83 \pm 2,35 в группе 1 и 15,46 \pm 1,83 в группе 3, относительный уровень продукции IFN γ в этих группах не различался. Стимуляция полноразмерным S-белком обновила значимое снижение количества пятен в группе 4 (прорывной иммунитет) 30,59 \pm 2,29 про-

Адрес для переписки:

Топтыгина Анна Павловна
ФБУН «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Г.Н. Габричевского» Роспотребнадзора
125212, Россия, Москва, ул. Адмирала Макарова, 10.
Тел.: 8 (495) 452-18-01.
Факс: 8 (495) 452-18-30.
E-mail: toptyginaanna@rambler.ru

Address for correspondence:

Anna P. Toptygina
G. Gabrichevsky Research Institute for Epidemiology and Microbiology
10 Adm. Makarov St
Moscow
125212 Russian Federation
Phone: +7 (495) 452-18-01.
Fax: +7 (495) 452-18-30.
E-mail: toptyginaanna@rambler.ru

Образец цитирования:

З.Э. Афридонова, А.П. Топтыгина, А.В. Боголюбова, Е.Л. Семикина «Сопоставление разных методов оценки клеточного иммунитета к вирусу SARS-CoV-2» // Медицинская иммунология, 2023. Т. 25, № 6. С. 1431-1440. doi: 10.15789/1563-0625-COD-2640
© Афридонова З.Э. и соавт., 2023
Эта статья распространяется по лицензии Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

Z.E. Afridonova, A.P. Toptygina, A.V. Bogolyubova, E.L. Semikina "Comparison of different techniques for evaluation of cellular immunity to SARS-CoV-2 virus", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2023, Vol. 25, no. 6, pp. 1431-1440.
doi: 10.15789/1563-0625-COD-2640
© Afridonova Z.E. et al., 2023
The article can be used under the Creative Commons Attribution 4.0 License
DOI: 10.15789/1563-0625-COD-2640

тив $58,97 \pm 4,47$ в группе 3, а стимуляция смесью пептидов SARS-CoV-2 в группе 4 по сравнению с группой 3 выявила значимое повышение количества IFN γ -продуцирующих клеток $86,72 \pm 7,20$ против $69,38 \pm 5,53$ и продукции IFN γ $991,25 \pm 65,18$ пг/мл против $760,76 \pm 50,70$ пг/мл и в относительном выражении, $10,30 \pm 2,77$ против $8,61 \pm 2,66$ и $68,10 \pm 9,41$ против $48,35 \pm 8,15$ соответственно. Результаты трех методов оценки клеточного иммунного ответа положительно, но с разной силой коррелируют между собой.

Ключевые слова: клеточный иммунитет, SARS-CoV-2, гибридный иммунитет, прорывной иммунитет, ELISpot, цитотоксические лимфоциты, CD8⁺

COMPARISON OF DIFFERENT TECHNIQUES FOR EVALUATION OF CELLULAR IMMUNITY TO SARS-CoV-2 VIRUS

Afridonova Z.E.^a, Toptygina A.P.^{a, b}, Bogolyubova A.V.^c, Semikina E.L.^{d, e}

^a G. Gabrichevsky Research Institute for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation

^b Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation

^c National Research Center for Hematology, Moscow, Russian Federation

^d National Medical Research Center of Children's Health, Moscow, Russian Federation

^e I. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russian Federation

Abstract. Most techniques for evaluation of T-cell immunity are laborious and unsuitable for routine laboratory diagnostics, thus encouraging researchers to look for accessible and reproducible tests. The purpose of our study is to compare three methods aimed for evaluation of cellular immune response levels to the SARS-CoV-2 viral antigens in patients who have been ill and vaccinated against a new coronavirus infection. We have examined 26 persons who experienced mild or moderate COVID-19 (group 1); 19 people vaccinated twice with Sputnik V, who did not have clinical COVID-19 (group 2); 21 subjects who had COVID-19 and were twice vaccinated with Sputnik V (group 3), and 14 persons who had COVID-19 twice (group 4). Peripheral blood mononuclear cells were isolated by gradient centrifugation. The first tested technique was performed as follows: the mononuclear cells were incubated with the S-protein of the SARS-CoV-2 virus, and stained with fluorescently labeled antibodies. The percentage of CD8^{high}CD107a was counted by means of BD FACS Canto II flow cytometer. When assessed by the ELISpot method with "Human IFN- γ ELISpot" kit, IFN γ production was stimulated by SARS-CoV-2 S-protein, or a mixture of SARS-CoV-2 protein peptides in the "Corona-T-test" kit. There were no significant differences in the levels of CD107a expression on CD8^{high} cells between the groups 1, 2, 3, and 4, as well as in amounts of IFN γ producers against SARS-CoV-2 S-protein when using "Human IFN- γ ELISpot" kit. Production of IFN was significantly lower in group 3 (hybrid immunity), i.e., 317.29 ± 19.04 pg/ml compared to groups 1 and 2 (post-infection and post-vaccination immunity), i.e., 454.95 ± 20.32 and 470.77 ± 26.24 pg/ml, respectively. The relative level of IFN γ -producing cells in group 2 was higher (22.34 ± 3.77) versus 16.83 ± 2.35 in group 1, and 15.46 ± 1.83 in group 3, whereas the relative levels of IFN γ did not differ in these groups. Stimulation with full-length S-protein showed a significant reduction in the number of spots in group 4 (breakthrough immunity), i.e., 30.59 ± 2.29 vs 58.97 ± 4.47 in group 3. Stimulation with a mixture of SARS-CoV-2 peptides in group 4 vs group 3 revealed a significantly increased number of IFN γ -producing cells (86.72 ± 7.20 versus 69.38 ± 5.53) and higher IFN γ production (991.25 ± 65.18 pg/ml versus 760.76 ± 50.70 pg/ml). Appropriate relative values were as follows: 10.30 ± 2.77 versus 8.61 ± 2.66 , and 68.10 ± 9.41 versus 48.35 ± 8.15 , respectively. The results of three methods for evaluation of cellular immune response correlate positively with each other, but at different significance levels.

Keywords: cellular immunity, SARS-CoV-2, hybrid immunity, breakthrough immunity, ELISpot, cytotoxic lymphocytes, CD8⁺ cells

Введение

Характерными признаками адаптивного иммунитета являются антигенная специфичность и иммунологическая память. Способность создавать долговременную иммунологическую память обеспечивает уникальный механизм защиты хозяина при последующих контактах с вирусом [28]. В зависимости от особенностей функционирования гуморального и клеточного адаптивного им-

мунитета у конкретного больного формируются клинические варианты и исходы заболевания, включая и COVID-19 [10].

Ключевая роль в элиминации вируса принадлежит цитотоксическим CD8⁺ лимфоцитам. При COVID-19 CD8⁺ клетки препятствуют репликации вируса в дыхательных путях. Именно CD8⁺ лимфоцит распознает зараженные вирусом клетки и либо контактным путем через взаимодействие FAS-FASL, либо за счет выброса со-

держимого цитотоксических гранул индуцирует апоптоз таких клеток, уничтожая также реплицирующийся вирус. CD4⁺T-хелперы координируют противовирусный иммунный ответ. Медиатором противовирусного ответа считают IFN γ , который усиливает фагоцитоз макрофагами апоптотических клеток и вирусов, нейтрализованных антителами. Ответ CD4⁺T-хелперов отличается в зависимости от вида вируса, в некоторых случаях реакция является защитной, в других случаях она может быть даже опасной для макроорганизма [6]. Функциональная активность иммунных клеток определяется скоординированной активностью сигнальных путей [8]. Измерение функционального состояния клеточного иммунного ответа в образце крови пациента способно улучшить прогнозирование клинического исхода заболевания или сохранения симптомов (длительный COVID), поддержать разработку вакцин и безопасных иммуномодулирующих методов лечения [13]. Продемонстрированы формирование иммунологической памяти Т-клеток и эффекторные реакции против широкого спектра эпитопов вируса SARS-CoV-2 [9, 14, 22, 24, 29].

Оценка противовирусного Т-клеточного ответа является крайне важным аспектом изучения адаптивного иммунитета в дополнение к серологическим тестам. Большинство анализов на Т-клетки трудоемки и непригодны для рутинной лабораторной диагностики. Ввиду отсутствия единой системы тестирования характеристик клеточного иммунного ответа против SARS-CoV-2 многими исследовательскими группами предприняты усилия по созданию доступных и воспроизводимых тестов [15, 17]. Количество и функции лимфоцитов исследуют в анализе с предельным разведением (Limiting dilution assay), внутриклеточным окрашиванием цитокинов (Intracellular Cytokine Staining), методом тетрамеров [11] и ELISpot [27]. По чувствительности анализ ELISpot превосходит другие методы определения антигенспецифических лимфоцитов [19]. Чувствительность ELISpot позволяет обнаружить антигенспецифичные Т-клетки, которые секретируют цитокины и эффекторные молекулы, такие как гранзим В и перфорин [19]. Мониторинг цитотоксических клеток с помощью ELISpot — золотой стандарт для оценки антигенспецифического Т-клеточного иммунитета в клинических испытаниях вакцинных препаратов. Наиболее часто используемым анализом ELISpot является тест на IFN γ [19, 20, 25]. ELISpot может быть применен для определения разных субпопуляций активированных Т-клеток с использованием цитокинов, таких как Th1 (цитокины IFN γ , IL-2, IL-12, и TNF α), Th2 (IL-4, IL-5, IL-10 и IL-13) и Th17 (IL-17). Однако IFN γ синтезируют Th1, CD8⁺ цитотоксические лимфоциты, NK- и NKT-клетки [21], а выделение CD8⁺ субпопуляции приводит к большим потерям клеток, как и

пермеабиллизация для внутриклеточного окрашивания, а использование тетрамеров рестрицировано по HLA, что делает этот тест непригодным для популяционных исследований.

Мы также попытались внести свой вклад, используя хорошо известную способность CD8⁺ клеток при распознавании вирусных пептидов в составе МНС-I на поверхности зараженной клетки формировать синапс и выбрасывать перфорин и гранзимы в синаптическую щель. В этот момент на поверхности такой CD8⁺ клетки оказывается молекула CD107a [5]. Экспрессия молекул CD107a может выступать в качестве маркера дегрануляции CD8⁺ клеток после антигенспецифической стимуляции [12]. Мы апробировали такой подход к исследованию Т-клеточного иммунитета при исследовании ответа на антигены вирусов кори, краснухи и эпидемического паротита [2, 3].

Целью нашего исследования было сопоставление трех методов оценки уровня клеточного иммунного ответа на антигены вируса SARS-CoV-2 у переболевших и привитых от новой коронавирусной инфекции.

Материалы и методы

С сентября 2021 г. по май 2022 г. было проведено простое открытое сравнительное обследование 80 взрослых добровольцев. Из них 26 человек перенесли COVID-19 в легкой или среднетяжелой форме, имели ПЦР-подтвержденный клинический диагноз заболевания давностью от 2 до 12 мес. (постинфекционный иммунитет, группа 1); 19 человек были дважды привиты «Спутником V» и не болели COVID-19, срок от первой прививки от 3 до 9 мес. (поствакцинальный иммунитет, группа 2); 21 человек перенесли COVID-19 и были дважды вакцинированы «Спутником V» (гибридный иммунитет, группа 3); 14 человек перенесли COVID-19 дважды: первый раз в 2020-2021 гг. и повторно — в январе-феврале 2022 г. (штамм «Омикрон»), они составили группу 4 (прорывной иммунитет). Кровь из локтевой вены брали утром натощак в вакуумную пробирку с гепарином 4 мл. Исследование одобрено локальным этическим комитетом ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского (протокол № 58), обследованные подписывали информированное согласие.

Мононуклеары периферической крови выделяли с помощью центрифугирования на градиенте плотности фиколл-верографин, $\rho = 1,077$ (ООО «ПанЭко», РФ), отмывали центрифугированием и добавляли 1 мл среды RPMI-1640 с добавлением 2 мМ L-глутамин, гентамицин и 10% эмбриональной телячьей сыворотки. Суспензию мононуклеаров делили на 3 порции. Клеточный иммунитет на антигены вируса SARS-CoV-2 определяли тремя разными способами.

Первый способ: мононуклеары вносили по $2,5 \times 10^5$ на лунку, в лунки 96-луночной стериль-

ной панели (отрицательный контроль), добавляли раствор моненсина в конечной концентрации 10 мкМ и моноклональные антитела к антигену CD107a-PE-Cy5 в конечном разведении 1:100, конечный объем в лунке составил 200 мкл. Для стимуляции мононуклеаров S-антигеном вируса SARS-CoV-2 использовали лунки панели от набора для определения антител к S-белку вируса SARS-CoV-2 методом ИФА, в которых на дно лунок сорбирован полноразмерный S-белок, согласно инструкции производителя. Использован набор «SARS-CoV-2-IgG-ИФА-БЕСТ» (АО «Вектор-Бест», г. Новосибирск). Перед началом эксперимента лунки были простерилизованы с помощью ультрафиолетового облучения в стерильных условиях в течение 30 минут. Пробы инкубировали при 37 °С во влажной атмосфере и 5% CO₂ 20 часов. По окончании инкубации клетки ресуспендировали, переносили в пробирки для проточной цитометрии и отмывали центрифугированием (300g 5 мин) в растворе CellWash.

Затем клетки окрашивали антителами к антигену CD8-FITC 20 минут в темноте при 4 °С, повторно отмывали при тех же условиях, и фенотипировали с помощью проточного цитометра BD FACS Canto II (технологии и программное обеспечение Becton Dickinson, США). Для анализа выделяли лимфоидный гейт, в нем в режиме FITC-SSS выделяли гейт лимфоцитов, высоко экспрессирующего антиген CD8 (CD8^{high}) – это субпопуляция цитотоксических Т-лимфоцитов. Далее на графике CD107a-PE-Cy5 против CD8-FITC подсчитывали процент дважды положительных клеток (рис. 1). Полученное число отражает процент цитотоксических лимфоцитов, распознавших антигены S-белка коронавируса и ответивших цитотоксической реакцией, заключающейся в выделении содержимого цитотоксических гранул относительно общего количества CD8⁺ цитотоксических Т-лимфоцитов [4].

Второй способ: оценка клеточного иммунитета методом ELISpot. Мононуклеары для кон-

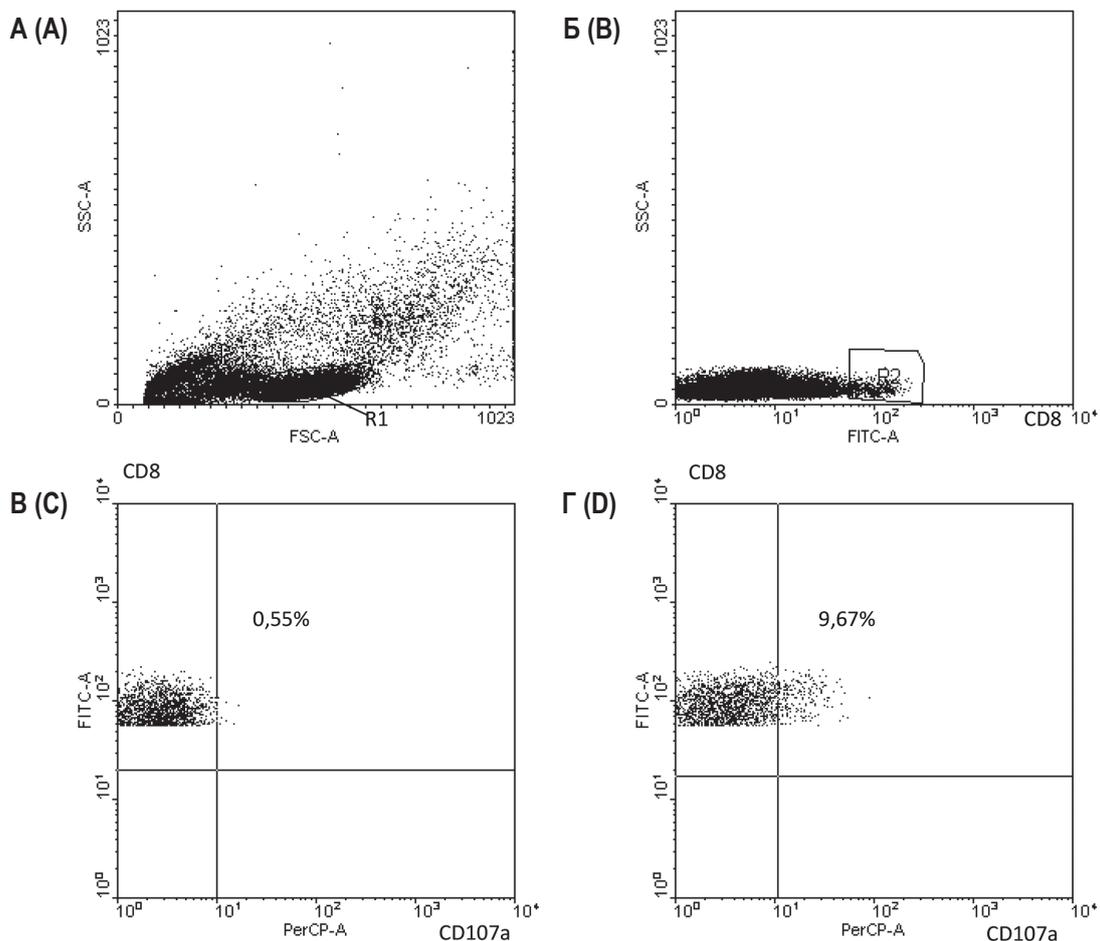


Рисунок 1. Пример оценки клеточного иммунитета по экспрессии CD107a на CD8^{hi} лимфоцитах

Примечание. А – выделение лимфоидного гейта R1. Б – выделение гейта CD8^{hi} R2. В – спонтанная экспрессия CD107a на CD8^{hi} лимфоцитах. Г – индуцированная S-белком экспрессия CD107a на CD8^{hi} лимфоцитах.

Figure 1. Example of cellular immunity study by CD107a expression on CD8^{hi} lymphocytes

Note. A, Determination of the lymphoid gate R1. B, Selection of the gate CD8^{hi} R2. C, Spontaneous expression of CD107a on CD8^{hi} lymphocytes. D, S-protein-induced expression of CD107a on CD8^{hi} lymphocytes.

трольной пробы ($2,5 \times 10^5$ на лунку) вносили в лунку стрипа от 96-луночной панели стандартного набора для определения продукции $IFN\gamma$ методом ELISpot (Human $IFN\gamma$ ELISpot, Mabtech, Швеция). Мононуклеары опытной пробы стимулировали S-антигеном, как описано выше (для первого способа определения клеточного иммунитета). Клетки инкубировали 4 часа при 37°C во влажной атмосфере и 5% CO_2 . В предварительных опытах было показано, что этого времени достаточно для того, чтобы моноциты собрали антиген. Далее мононуклеары тщательно ресуспендировали и перенесли в лунки стрипа от набора для ELISpot и продолжали инкубировать при тех же условиях еще 16 часов. По окончании инкубации содержимое лунок удаляли и промывали 5 раз забуференным фосфатами физиологическим раствором (ЗФР) по 20 мкл на лунку. Конъюгат разводили 1:200 в бессывороточной среде RPMI-1640, добавляли по 100 мкл на лунку и инкубировали 2 часа при комнатной температуре, снова промывали 5 раз ЗФР. Готовый ТМБ-субстрат добавляли по 100 мкл на лунку и инкубировали при комнатной температуре до появления видимых пятен, согласно инструкции производителя. После этого жидкость из лунок удаляли, промывали 2 раза деионизированной водой, затем проточной водой. После этого снимали поддон и промывали мембрану с обратной стороны. Сушили стрипы на фильтровальной бумаге в темноте при комнатной температуре.

Третий способ: оценка клеточного иммунитета также методом ELISpot, с использованием набора реагентов для определения Т-клеточного ответа на SARS-CoV-2 Corona-T-test (ФГБУ «НМИЦ гематологии», Россия) [25], специально разработанном для оценки клеточного иммунитета к пептидам белка вируса SARS-CoV-2. Для стимуляции Т-лимфоцитов в этом наборе используют смесь пептидов из белков коронавируса. Постановка теста осуществлялась в нашей модификации. Для проведения теста мононуклеары вносили в лунки стрипа 96-луночной панели, входящей в набор ($2,5 \times 10^5$ на лунку) в контрольной лунке клетки инкубировали в культуральной среде, а в опытную лунку добавляли смесь пептидов белков вируса SARS-CoV-2 в конечной концентрации $1 \mu\text{M}/\text{мл}$ и инкубировали при 37°C во влажной атмосфере и 5% CO_2 20 часов. По окончании инкубации содержимое лунок удаляли и промывали 5 раз 200 мкл ЗФР, добавляли по 50 мкл на лунку раствор А, содержащий антитела к $IFN\gamma$, конъюгированные с биотином, и инкубировали 2 часа при комнатной температуре в темноте, снова промывали 5 раз ЗФР. Затем раствор В, содержащий концентрированный раствор стрептавидина, конъюгированного с щелочной фосфатазой, разводили 1:100 буфером В, добавляли по 50 мкл в каждую лунку, инкубировали 30 мин при комнатной температуре в темноте и

промывали 5 раз ЗФР, а затем 2 раз дистиллированной водой. Добавляли раствор С, содержащий субстрат для щелочной фосфатазы BCIP/NBT+, по 50 мкл, инкубировали 15 мин в темноте и промывали дистиллированной, а затем проточной водой. После этого снимали поддон и промывали мембрану с обратной стороны. Сушили стрипы на фильтровальной бумаге в темноте при комнатной температуре.

Подсчет сформировавшихся пятен для метода 2 и 3 осуществляли с помощью автоматизированного ELISpot-ридера AID (AID GmbH, Германия) (рис. 2, см. 2-ю стр. обложки). Программное обеспечение позволяет посчитать не только количество пятен на дне лунки, но также подсчитать их суммарную площадь и интенсивность окраски и рассчитать с помощью встроенных алгоритмов концентрацию $IFN\gamma$ в каждой лунке.

Результаты исследования были подвергнуты статистической обработке. Для всех параметров было проведено исследование на нормальность распределения методом Колмогорова–Смирнова. Данные представлены в виде средней арифметической и ее ошибки ($M \pm SE$). Для сравнения групп использовали t-критерий. Уровень $p < 0,05$ считали значимым. Корреляции рассчитывали по методу Пирсона.

Результаты

Ранее было показано, что спонтанный уровень экспрессии молекулы CD107a на $CD8^{\text{high}}$ лимфоцитах при определении клеточного иммунитета к S-белку вируса SARS-CoV-2 не превышает уровень cut off = 1% [4]. Аналогичные результаты были получены для контрольной пробы, и в настоящем исследовании уровень клеточного иммунитета, оцененного с помощью способа 1, представлен в процентах. Для методов 2 и 3, основанных на ELISpot, спонтанный уровень составил $7,65 \pm 0,87$ пятен на лунку. Результаты, полученные для разных обследованных лиц, различались. В связи с этим результаты, полученные методом ELISpot, были представлены двумя способами: за вычетом спонтанного уровня для каждого обследованного и как отношение опытного к контрольному уровню для каждого испытуемого (относительный показатель). Следует также отметить, что результаты, полученные методом ELISpot на двух разных тест-системах, несколько различались по методике проявления пятен. Объективно сложилось так, что оценка клеточного иммунитета в группах 1, 2 и половины группы 3 была осуществлена на тест-наборе Human $IFN\gamma$ ELISpot только вторым способом, а вторая половина группы 3 и группа 4 – на тест-наборе Corona-T-test вторым и третьим способом. Уровень ответа на этих наборах различался, поэтому мы провели анализ результатов, полученных на разных тест-наборах отдельно.

В таблице 1 представлены результаты для тех обследованных, которые были получены на наборе Human IFN- γ ELISpot. Из таблицы видно, что результаты, полученные при оценке экспрессии CD107a на CD8^{high} лимфоцитах (первый способ оценки), который характеризует субпопуляцию цитотоксических CD8⁺ лимфоцитов, способных распознать антигенные детерминанты S-белка вируса SARS-CoV-2 и ответить атакой с выбросом содержимого цитотоксических гранул, в группах 1, 2 и 3 значимо не различаются. По количеству пятен, т. е. клеток, ответивших синтезом IFN γ на S-белок вируса SARS-CoV-2, различий также нет. Однако по продукции IFN γ группа 3 (гибридный иммунитет) значимо отличается (317,29 \pm 19,04 пг/мл) от групп 1 и 2 (постинфекционный и поствакцинальный иммунитет) 454,95 \pm 20,32 и 470,77 \pm 26,24 пг/мл соответственно (p = 0,048). При анализе результатов ELISpot в относительном выражении выявлено значимое превышение уровня IFN γ -продуцирующих клеток в группе 2 (поствакцинальный иммунитет) 22,34 \pm 3,77 против 16,83 \pm 2,35 в группе 1 и 15,46 \pm 1,83 в группе 3 (p = 0,033). В то же время по уровню продукции IFN γ различия не были выявлены.

В таблице 2 представлены результаты, полученные на наборе Corona-T-test и всеми тремя способами. Из таблицы видно, что при оценке клеточного иммунитета по экспрессии CD107a на CD8^{high} лимфоцитах имеется тенденция на повышение уровня ответа в группе 4 (прорывной иммунитет), однако эти различия не значимы. При оценке клеточного иммунитета вторым способом (стимуляция полноразмерным S-белком) обнаружено значимое снижение количества пятен в

группе 4 30,59 \pm 2,29 против 58,97 \pm 4,47 в группе 3 (p = 0,0034), по концентрации IFN γ это снижение также проявляется (p < 0,05). Интересно, что при относительном расчете различий между группами не выявлено. При использовании для стимуляции клеточного ответа смеси пептидов (третий способ) выявлено значимое повышение количества пятен в группе 4 по сравнению с группой 3 (p < 0,05), и также по продукции IFN γ (p = 0,043). При относительном выражении результатов обнаружена тенденция на увеличение количества пятен в группе 4 по сравнению с группой 3: 10,30 \pm 2,77 и 8,61 \pm 2,66 и значимое повышение продукции IFN γ 68,10 \pm 9,41 и 48,35 \pm 8,15 (p = 0,047).

Из-за различий в использованных тест-системах для ELISpot, невозможно корректно сравнить группу 4 (прорывной иммунитет) с группой 1 (постинфекционный иммунитет), хотя это было бы очень интересно. Однако поскольку группа 3 была представлена для анализа на обеих тест-системах, хотя это разные люди, с большой степенью натяжки можно отметить, что группа 3 на тест-системе Corona-T-test имеет при стимуляции полноразмерным S-белком несколько меньшее количество пятен (58,97 \pm 4,47), чем на тест-системе Human IFN- γ ELISpot (80,04 \pm 5,87). Если принять такую тенденцию, то в группе 4 мы выявили бы значимо меньшее количество пятен, чем в группе 1 (p = 0,012). При этом по продукции IFN γ в группе 3, определенной двумя разными методами, различий нет. При таком допущении продукция IFN γ в ответ на стимуляцию S-белком в группе с прорывным иммунитетом была бы значимо ниже, чем в группе с постинфекционным (p = 0,047). При относительной оценке количе-

ТАБЛИЦА 1. ОПРЕДЕЛЕНИЕ КЛЕТОЧНОГО ИММУНИТЕТА ПО ЭКСПРЕССИИ CD107a НА CD8^{high} ЛИМФОЦИТАХ И МЕТОДОМ ELISPOT ПРИ ИНДУКЦИИ S-БЕЛКОМ SARS-CoV-2

TABLE 1. DETERMINATION OF CELLULAR IMMUNITY BY EXPRESSION OF CD107a ON CD8^{high} LYMPHOCYTES AND BY THE ELISPOT METHOD UPON INDUCTION BY SARS-CoV-2 S-PROTEIN

Группа Group	CD8 ⁺ CD107a ⁺ , %	ELISpot, абсолютное количество ELISpot, absolute value	IFN γ , пг/мл IFN γ , pg/mL	ELISpot, относительное количество ELISpot, relative value	IFN γ , относительное количество IFN γ , relative value
Группа 1 Group 1	10,09 \pm 1,35	83,23 \pm 6,63	454,95 \pm 20,32	16,83 \pm 2,35	42,79 \pm 8,09
Группа 2 Group 2	9,45 \pm 1,48	86,25 \pm 7,12	470,77 \pm 26,24	22,34 \pm 3,77*	42,98 \pm 10,43
Группа 3 Group 3	9,31 \pm 1,32	80,04 \pm 5,87	317,29 \pm 19,04*	15,46 \pm 1,83	45,64 \pm 8,84

Примечание. * p < 0,05.

Note. * p < 0.05.

ТАБЛИЦА 2. СОПОСТАВЛЕНИЕ ТРЕХ СПОСОБОВ ОПРЕДЕЛЕНИЯ КЛЕТОЧНОГО ИММУНИТЕТА К ВИРУСУ SARS-CoV-2
TABLE 2. COMPARISON OF THREE METHODS FOR DETERMINING CELLULAR IMMUNITY TO THE SARS-CoV-2 VIRUS

Группа Group	Способ 1 Method 1 S-белок S-protein	Способ 2 Method 2 S-белок S-protein			Способ 3 Method 3 Пептиды Peptides				
	CD8 ⁺ CD107a ⁺ , %	ELISpot, абсолютное количество ELISpot, absolute value	IFN γ , пг/мл IFN γ , pg/mL	ELISpot, относительное количество ELISpot, relative value	IFN γ , относительное количество IFN γ , relative value	ELISpot, абсолютное количество ELISpot, absolute value	IFN γ , пг/мл IFN γ , pg/mL	ELISpot, относительное количество ELISpot, relative value	IFN γ , относительное количество IFN γ , relative value
Группа 3 Group 3	10,04 \pm 1,37	58,97 \pm 4,47	361,68 \pm 18,84	7,48 \pm 1,13	46,63 \pm 9,37	69,38 \pm 5,53	760,76 \pm 50,70	8,61 \pm 2,66	48,35 \pm 8,15
Группа 4 Group 4	12,27 \pm 2,51	30,59 \pm 2,29*	267,52 \pm 17,38*	5,79 \pm 0,81	34,06 \pm 8,69	86,72 \pm 7,20*	991,25 \pm 65,18*	10,89 \pm 2,77	68,10 \pm 9,41*

Примечание. * p < 0,05.

Note. * p < 0.05.

ство пятен в группе 3 на тест-системе Corona-T-test ниже в 2 раза, и при таком допущении в группе 4 было бы обнаружено значимое снижение по сравнению с группой 1 ($p = 0,048$), а по отношению уровней IFN γ различия были бы не значимы. Однако следует подчеркнуть, что сопоставление групп 1 и 4 чисто расчетные, поскольку результаты были получены на разных тест-системах.

Расчет корреляций Пирсона не выявил значимых корреляций между уровнями клеточного иммунного ответа, измеренного тремя исследованными нами способами, за исключением умеренной положительной корреляции ($r = 0,341$) между относительным количеством пятен, индуцированных пептидным комплексом и полноразмерным S-белком. В то же время выявлена сильная положительная корреляционная связь между количеством пятен и уровнем продукции IFN γ при стимуляции полноразмерным S-белком ($r = 0,79$) и очень сильная положительная корреляция при стимуляции пептидным комплексом ($r = 0,95$).

Обсуждение

В нашем исследовании мы сопоставили три разных способа оценки клеточного иммунитета на антигенные детерминанты вируса SARS-CoV-2 у 4 групп обследованных с разной историей контакта с новой коронавирусной инфекцией. Следует подчеркнуть, что первый из использованных нами способов позволяет подсчитать процент цитотоксических CD8⁺ лимфоцитов, способных

распознать антигенные детерминанты S-белка коронавируса и ответить атакой с выбросом содержимого цитотоксических гранул [7]. Эта реакция является основной защитной реакцией клеточного иммунитета, позволяющей выявить и уничтожить зараженные коронавирусом клетки организма. В результате уничтожается размножающийся в клетках вирус и его компоненты, и организм очищается от вируса. При оценке результатов, полученных этим методом, можно видеть, что уровень поствакцинального клеточного иммунитета не отличается от постинфекционного, а повторная стимуляция (гибридный и прорывной иммунитет) не приводит к серьезному изменению уровня клеточной защиты.

При оценке клеточного иммунитета методом ELISpot по продукции IFN γ выявляется суммарный эффект, поскольку IFN γ могут синтезировать Th1-хелперы, цитотоксические CD8⁺ лимфоциты, NK-клетки, NKT-клетки и $\gamma\delta$ T-клетки. При этом NK, NKT-клетки и $\gamma\delta$ T-клетки, по видимому, проявляют себя в тесте как спонтанные продуценты IFN γ , тогда как Th1-хелперы и цитотоксические CD8⁺ лимфоциты способны распознать антигенные детерминанты S-белка коронавируса и являются индуцированными продуцентами IFN γ [16]. Следует отметить, что хелперов в крови в принципе больше, чем цитотоксических клеток, Th1 являются более мощными продуцентами IFN γ , чем CD8⁺ лимфоциты и далеко не все цитотоксические лимфоциты, распознавшие антиген, продуцируют IFN γ [21]. Более того, IFN γ не оказывает прямого противо-

вирусного действия. Он является своеобразным дирижером, организатором противовирусного ответа, активируя клетки адаптивного и врожденного иммунитета на борьбу с вирусом. Поэтому продукция $IFN\gamma$ является лишь косвенным свидетелем активации клеточного ответа и не коррелирует прямо с эффективностью клеточной защиты от вируса. Тем не менее метод ELISpot для оценки клеточного иммунитета весьма популярен в западных публикациях, предлагаются различные его модификации [8, 18, 26]. Мы сопоставили 2 варианта этого метода, где индукторами клеточного иммунного ответа были смесь пептидов белков вируса SARS-CoV-2 или полноразмерный S-белок коронавируса. Оказалось, что при индукции полноразмерным S-белком в группах с гибридным и прорывным иммунитетом продукция $IFN\gamma$ ниже, чем в группах с постинфекционным и поствакцинальным иммунитетом. Возможно, эти различия связаны с интенсивным процессом мутации коронавируса. Привитые и болевшие в начале пандемии отвечали на уханьский вариант S-белка, и именно этот вариант использовался для стимуляции клеточного иммунитета, тогда как у людей с гибридным и прорывным иммунитетом штаммы при первичной и повторной встрече с коронавирусом могли сильно различаться. При этом доминантные клоны, сформированные на первый контакт, могут оказаться минорными при повторной встрече с антигеном. Стимуляция S-белком уханьского штамма может оказаться не столь эффективной. В то же время при стимуляции комплексом пептидов, специально подобранными наиболее иммуногенными и консервативными последовательностями из разных белков вируса SARS-CoV-2, выявлено значимое превышение количества пятен и продукции $IFN\gamma$ в группе с прорывным иммунитетом. Такая дихотомия результатов может свидетельствовать о сужении спектра антигенспецифических клонов T-лимфоцитов при повторных встречах с измененными мутациями штаммами вируса. С другой стороны, клеточные ответы на антигенные пептиды более консервативных белков коронавируса, например, N-белка, могут оказываться более значимыми при повторных контактах с вирусом, чем ответы на подверженный частым мутациям S-белок.

Не было выявлено корреляции уровня клеточного иммунитета, определенного по экспрессии CD107a на $CD8^{high}$ лимфоцитах с результатами, полученными методом ELISpot, что, по-видимому, связано с различиями в клеточных субпопуляциях, ответ которых определяется этими методами. Корреляция между индукцией иммунного ответа комплексом пептидов и полноразмерным S-белком была положительная, но умеренной силы, что объясняется разным составом пептидов, который презентуют моноциты при этих двух разных способах стимуляции. Сильная положительная корреляция между количеством пятен и уровнем $IFN\gamma$ вполне понятна. Однако она менее 1, поскольку есть образцы, в которых сформировано много очень мелких пятен, а есть другой вариант, когда пятен не так много, но они крупные и интенсивно окрашены (рис. 2Б, Г; см. 2-ю стр. обложки).

Заключение

Таким образом, можно заключить, что клеточный иммунный ответ имеет индивидуальные черты у разных людей. Отсутствие общепризнанного метода оценки T-клеточного иммунитета, такого, как иммуноферментный анализ для оценки гуморального иммунитета, и трудоемкость известных методов стимулирует многих авторов к сопоставлению этих методов [18, 20, 24, 26]. Также предпринимаются попытки разработки тестов более подходящих для оценки клеточного иммунитета к антигенам вируса SARS-CoV-2 [1, 23]. Результаты, полученные разными методами, коррелируют между собой в той или иной степени, однако все еще не удается прийти к консенсусу относительно метода оценки T-клеточного иммунитета на антигены. Тем не менее исследование T-клеточного иммунитета крайне важно для оценки противовирусного иммунного ответа.

Благодарности

Разработка используемого в исследовании набора реагентов для определения T-клеточного ответа на SARS-CoV-2 Corona-T-test была осуществлена при финансовой поддержке гранта Российского Научного Фонда № 20-15-00395.

Список литературы / References

1. Потеряев Д.А., Аббасова С.Г., Игнатьева П.Е., Стрижакова О.М., Колесник С.В., Хамитов Р.А. Оценка T-клеточного иммунитета к SARS-CoV-2 у переболевших и вакцинированных против COVID-19 лиц с помощью ELISPOT набора TigratTest[®] SARS-CoV-2 // *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*, 2021. Т. 21, № 3. С. 178-192. [Poteryaev D.A., Abbasova S.G., Ignatieva P.E., Strizhakova O.M., Kolesnik S.V., Khamitov R.A. Evaluation of T-cell immunity to SARS-CoV-2 in recovered patients and vaccinated against COVID-19 using the TigratTest[®] SARS-CoV-2 ELISPOT kit. *BIOpreparaty. Profilaktika, Diagnostika, Lecheniye = BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment*, 2021, Vol. 21, no. 3, pp. 178-192. (In Russ.)]
2. Смердова М.А., Топтыгина А.П., Андреев Ю.Ю., Сенникова С.В., Зеткин А.Ю., Клыкова Т.Г., Беляков С.И. Гуморальный и клеточный иммунитет к антигенам вирусов кори и краснухи у здоровых людей // *Инфекция и иммунитет*, 2019. Т. 9, № 3-4. С. 607-611. [Smerdova M.A., Toptygina A.P., Andreev Yu.Yu.,

Sennikova S.V., Zetkin A.Yu., Klykova T.G., Belyakov S.I. Humoral and cellular immunity to measles and rubella virus antigens in healthy subjects. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2019, Vol. 9, no. 3-4, pp. 607-611. (In Russ.) doi: 10.15789/2220-7619-2019-3-4-607-611.

3. Топтыгина А.П., Семикина Е.Л., Алешкин В.А. Формирование и поддержание специфического клеточного ответа на вакцинацию «Приорикс» // Иммунология, 2013. Т. 34, № 5. С. 257-261. [Toptygina A.P., Semikina E.L., Alioshkin V.A. The shaping and the maintenance of T-cell specific immune response to vaccination Priorix. *Immunologiya = Immunology*, 2013, Vol. 34, no. 5, pp. 257-261. (In Russ.)

4. Топтыгина А.П., Семикина Е.Л., Закиров Р.Ш., Афридонова З.Э. Сопоставление гуморального и клеточного иммунитета у переболевших COVID-19 // Инфекция и иммунитет, 2022. Т. 12, № 3. С.495-504. [Toptygina A.P., Semikina E.L., Zakirov R.Sh., Afridonova Z.E. Comparison of the humoral and cellular immunity in COVID-19 convalescents. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2022, Vol. 12, no. 3, pp. 495-504. (In Russ.)] doi: 10.15789/2220-7619-COT-1809.

5. Aktas E., Kucuksezzer U.C., Bilgic S., Erten G., Deniz G. Relationship between CD107a expression and cytotoxic activity. *Cell Immunol.*, 2009, Vol. 254, no. 2, pp. 149-154.

6. Beňová K., Hancková M., Koči K., Kúdelová M., Betáková T. T cells and their function in the immune response to viruses. *Acta Virol.*, 2020, Vol. 64, no. 2, pp. 131-143.

7. Betts M.R., Brenchley J.M., Price D.A., de Rosa S.C., Douek D.C., Roederer M., Koup R.A. Sensitive and viable identification of antigen-specific CD8⁺ T cells by a flow cytometric assay for degranulation. *J. Immunol. Methods*, 2003, Vol. 281, no. 1-2, pp. 65-78.

8. Bouwman W., Verhaegh W., Holtzer L., van de Stolpe A. Measurement of cellular immune response to viral infection and vaccination. *Front. Immunol.*, 2020, Vol. 11, 575074. doi: 10.3389/fimmu.2020.575074.

9. Braun J., Loyal L., Frentsch M., Wendisch D., Georg P., Kurth F., Hippenstiel S., Dingeldey M., Kruse B., Fauchere F., Baysal E., Mangold M., Henze L., Lauster R., Mall M.A., Beyer K., Röhmel J., Voigt S., Schmitz J., Miltenyi S., Demuth I., Müller M.A., Hocke A., Witzenrath M., Suttrop N., Kern F., Reimer U., Wenschuh H., Drosten C., Corman V.M., Giesecke-Thiel C., Sander L.E., Thiel A. SARS-CoV-2-reactive T cells in healthy donors and patients with COVID-19. *Nature*, 2020, Vol. 587, no. 7833, pp. 270-274.

10. García L.F. Immune Response, Inflammation, and the Clinical Spectrum of COVID-19. *Front. Immunol.*, 2020, Vol. 11, 1441. doi: 10.3389/fimmu.2020.01441.

11. Gupta S., Agrawal S., Sandoval A., Su H., Tran M., Demirdag Y. SARS-CoV-2-specific and functional cytotoxic CD8 cells in primary antibody deficiency: Natural infection and response to vaccine. *J. Clin. Immunol.*, 2022, Vol. 42, no. 5, pp. 914-922.

12. Keshavarz M., Shafiee A., Nicknam M.H., Khosravani P., Yousefi A., Izad M. Immune response to the mumps virus in iranian unvaccinated young adults. *Japan J. Infect. Dis.*, 2017, Vol. 70, no. 2, pp. 127-131.

13. Kundura L., Cezar R., André S., Campos-Mora M., Lozano C., Vincent T., Muller L., Lefrant J.Y., Roger C., Claret P.G., Duvnjak S., Loubet P., Sotto A., Tran T.A., Estaquier J., Corbeau P. Low perforin expression in CD8⁺ T lymphocytes during the acute phase of severe SARS-CoV-2 infection predicts long COVID. *Front. Immunol.*, 2022, Vol. 13, 1029006. doi: 10.3389/fimmu.2022.1029006.

14. Le Bert N., Clapham H.E., Tan A.T., Chia W.N., Tham C.Y.L., Lim J.M., Kunasegaran K., Tan L.W.L., Dutertre C.A., Shankar N., Lim J.M.E., Sun L.J., Zahari M., Tun Z.M., Kumar V., Lim B.L., Lim S.H., Chia A., Tan Y.J., Tambyah P.A., Kalimuddin S., Lye D., Low J.G.H., Wang L.F., Wan W.Y., Hsu L.Y., Bertoletti A., Tam C.C. Highly functional virus-specific cellular immune response in asymptomatic SARS-CoV-2 infection. *J. Exp. Med.*, 2021, Vol. 218, no. 5, e20202617. doi: 10.1084/jem.20202617.

15. Lind Enoksson S., Bergman P., Klingström J., Boström F., da Silva Rodrigues R., Winerdal M.E., Marits P. A flow cytometry-based proliferation assay for clinical evaluation of T-cell memory against SARS-CoV-2. *J. Immunol. Methods*, 2021, Vol. 499, 113159. doi: 10.1016/j.jim.2021.113159.

16. Moss P. The T cell immune response against SARS-CoV-2. *Nat. Immunol.*, 2022, Vol. 23, no. 2, pp. 186-193.

17. Paolini A., Borella R., Neroni A., Lo Tartaro D., Mattioli M., Fidanza L., di Nella A., Santacroce E., Gozzi L., Busani S., Trenti T., Meschiari M., Guaraldi G., Girardis M., Mussini C., Gibellini L., de Biasi S., Cossarizza A. Patients recovering from severe COVID-19 develop a polyfunctional antigen-specific CD4⁺ T cell response. *Int. J. Mol. Sci.*, 2022, Vol. 23, no. 14, 8004. doi: 10.3390/ijms23148004.

18. Phillips E., Adele S., Malone T., Deeks A., Stafford L., Dobson S.L., Amini A., Skelly D., Eyre D., Jeffery K., Conlon C.P., Dold C., Otter A., d'Arcangelo S., Turtle L.; PITCH Consortium, Klenerman P., Barnes E., Dunachie S.J. Comparison of two T-cell assays to evaluate T-cell responses to SARS-CoV-2 following vaccination in naïve and convalescent healthcare workers. *Clin. Exp. Immunol.*, 2022, Vol. 209, no. 1, pp. 90-98.

19. Ranieri E., Netti G.S., Gigante M. CTL ELISPOT Assay and T Cell Detection. *Methods Mol. Biol.*, 2021, Vol. 2325, pp. 65-67.

20. Ruan Y., Guo W., Liang S., Xu Z., Niu T. Diagnostic performance of cytomegalovirus (CMV) immune monitoring with ELISPOT and QuantiFERON-CMV assay in kidney transplantation: A PRISMA-compliant article. *Medicine (Baltimore)*, 2019, Vol. 98, no. 16, e15228. doi: 10.1097/MD.00000000000015228.

21. Schoenborn J.R., Wilson C.B. Regulation of interferon-gamma during innate and adaptive immune responses. *Adv. Immunol.*, 2007, Vol. 96, pp. 41-101.

22. Sekine T., Perez-Potti A., Rivera-Ballesteros O., Strålin K., Gorin J.B., Olsson A., Llewellyn-Lacey S., Kamal H., Bogdanovic G., Muschiol S., Wullimann D.J., Kammann T., Emgård J., Parrot T., Folkesson E.; Karolinska COVID-19 Study Group, Rooyackers O., Eriksson L.L., Henter J.L., Sönnernborg A., Allander T., Albert J., Nielsen M., Klingström J., Gredmark-Russ S., Björkström N.K., Sandberg J.K., Price D.A., Ljunggren H.G., Aleman S., Bugger M.

Robust T Cell Immunity in Convalescent Individuals with Asymptomatic or Mild COVID-19. *Cell*, 2020, Vol. 183, no. 1, pp.158-168.

23. Shomuradova A.S., Vagida M.S., Sheetikov S.A., Zornikova K.V., Kiryukhin D., Titov A., Peshkova Iu.O., Khmelevskaya A., Dianov D.V., Malasheva M., Shmelev A., Serdyuk Ya., Bagaev D.V., Pivnyuk A., Shcherbinin D.S., Maleeva A.V., Shakirova N.T., Pilunov A., Malko D.B., Khamaganova E.G., Biderman B., Ivanov A., Shugay M., Efimov G.A. SARS-CoV-2 Epitopes Are Recognized by a Public and Diverse Repertoire of Human T Cell Receptors. *Immunity*, 2020, Vol. 53, pp. 1245-1257.

24. Tarke A., Sidney J., Kidd C.K., Dan J.M., Ramirez S.I., Yu E.D., Mateus J., da Silva Antunes R., Moore E., Rubiro P., Methot N., Phillips E., Mallal S., Frazier A., Rawlings S.A., Greenbaum J.A., Peters B., Smith D.M., Crotty S., Weiskopf D., Grifoni A., Sette A. Comprehensive analysis of T cell immunodominance and immunoprevalence of SARS-CoV-2 epitopes in COVID-19 cases. *Cell Rep. Med.*, 2021, Vol. 2, no. 2, 100204. doi: 10.1016/j.xcrm.2021.100204.

25. Titov A., Shaykhtudinova R., Shcherbakova O.V., Serdyuk Y.V., Sheetikov S.A., Zornikova K.V., Maleeva A.V., Khmelevskaya A., Dianov D.V., Shakirova N.T., Malko D.B., Shkurnikov M., Nersisyan S., Tonevitsky A., Khamaganova E., Ershov A.V., Osipova E.Y., Nikolaev R.V., Pershin D.E., Vedmedskia V.A., Maschan M., Ginanova V.R., Efimov G.A. Immunogenic epitope panel for accurate detection of non-cross-reactive T cell response to SARS-CoV-2. *JCI Insight*, 2022, Vol. 7, no. 9, e157699. doi: 10.1172/jci.insight.157699.

26. Villemonteix J., Cohen L., Guihot A., Guérin V., Moulin C., Caseris M., Carol A., Bonacorsi S., Carcelain G. Comparison between enzyme-linked immunospot assay and intracellular cytokine flow cytometry assays for the evaluation of T cell response to SARS-CoV-2 after symptomatic COVID-19. *Immun. Inflamm. Dis.*, 2022, Vol. 10, no. 10, e617. doi: 10.1002/iid3.617.

27. Wherry E.J., Masopust D. Adaptive immunity: neutralizing, eliminating, and remembering for the next time. *Viral pathogenesis (Third Edition), From Basics to Systems Biology*, 2016, pp. 57-69.

28. Zajac A.J., Harrington L.E., Immune Response to Viruses: Cell-Mediated Immunity. *Encyclopedia of Virology*, Elsevier eBooks, 2008, pp. 70-77.

29. Zornikova K.V., Khmelevskaya A., Sheetikov S.A., Kiryukhin D.O., Shcherbakova O.V., Titov A., Zvyagin I.V., Efimov G.A. Clonal diversity predicts persistence of SARS-CoV-2 epitope-specific T-cell response. *Commun. Biol.*, 2022, Vol. 5, no. 1, 1351. doi: 10.1038/s42003-022-04250-7.

Авторы:

Афридонова З.Э. — аспирант лаборатории цитокинов ФБУН «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Г.Н. Габричевского» Роспотребнадзора, Москва, Россия

Топтыгина А.П. — д.м.н., главный научный сотрудник, руководитель лаборатории цитокинов ФБУН «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Г.Н. Габричевского» Роспотребнадзора; профессор кафедры иммунологии ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», Москва, Россия

Боголюбова А.В. — к.б.н., заведующая лабораторией трансплантационной иммунологии ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Семикина Е.Л. — д.м.н., главный научный сотрудник, заведующая лабораторным отделом ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей» Министерства здравоохранения РФ; профессор кафедры педиатрии и детской ревматологии ФГАУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Authors:

Afridonova Z.E., Postgraduate Student, Laboratory of Cytokines, G. Gabrichevsky Research Institute for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation

Toptygina A.P., PhD, MD (Medicine), Chief Research Associate, Head, Laboratory of Cytokines, G. Gabrichevsky Research Institute for Epidemiology and Microbiology; Professor, Department of Immunology, Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation

Bogolyubova A.V., PhD (Biology), Head, Laboratory of Transplantation Immunology, National Research Center for Hematology, Moscow, Russian Federation

Semikina E.L., PhD, MD (Medicine), Chief Research Associate, Head of Laboratory Department, National Medical Research Center of Children's Health; Professor, Department of Pediatrics and Pediatric Rheumatology, I. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russian Federation

ОСОБЕННОСТИ ПРЕАНАЛИТИЧЕСКОГО ЭТАПА ПРИ КОЛИЧЕСТВЕННОМ ОПРЕДЕЛЕНИИ TREC/KREC В ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ

Сайтгалина М.А.¹, Останкова Ю.В.¹, Седых А.В.¹, Тотолян Арег А.^{1,2}

¹ ФБУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера», Санкт-Петербург, Россия

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

Резюме. Использование сухих пятен крови (dried blood spots – DBS), полученных из пяток младенцев, имеет много преимуществ по сравнению со сбором образцов цельной крови. Экстрагированная из DBS ДНК может быть использована для выявления генетических заболеваний методом ПЦР, что способствовало развитию популяционного скрининга новорожденных во всем мире. С января 2023 г. в список выявляемых заболеваний входит группа первичных иммунодефицитов (ПИД), связанных с отсутствием или снижением уровней Т- и/или В-лимфоцитов, определяемых в рамках скрининга по уровням молекул TREC и KREC в периферической крови соответственно. Количественный анализ требует особого внимания к биологическому материалу. Цель – оценить влияние преаналитического этапа на количественный анализ уровней TREC/KREC в периферической крови.

Материалом служили 5219 образцов DBS, полученных от младенцев на 3–4-й день жизни, а также DBS, приготовленные из цельной крови 100 условно здоровых лиц в возрасте от 18 до 29 лет. Методом ПЦР-РВ, применяя тест-системы для оценки уровней TREC и KREC в периферической крови, проводили сравнительный анализ количества молекул TREC/KREC в корректно и не корректно взятых DBS от новорожденных и взрослых лиц, а также в зависимости от объема наносимого материала; качество DBS оценивали визуально.

В первые месяцы проекта выявлено значительное количество неправильно взятых образцов – свыше трети всех полученных за каждый соответствующий месяц ДНК-карт. В результате дополнительного обучения медперсонала количество некорректно взятого материала снизилось до уровня, не превышающего 1% от всех ежемесячно собираемых образцов. При использовании ДНК, выделенной из DBS с ошибками нанесения, у большей части образцов (для новорожденных 64%, для взрослых лиц 78%) не удавалось получить результат. В остальных случаях полученные результаты были значительно ниже нормальных уровней содержания TREC/KREC, определяемых в этих же образцах при корректном взятии DBS (во всех случаях $p < 0,0001$, 95% ДИ). Объем крови, используемый при корректном нанесении на карты Гатри, не влиял на получаемые результаты, уровни TREC и KREC были

Адрес для переписки:

Сайтгалина Мария Александровна
ФБУН «Санкт-Петербургский
научно-исследовательский институт эпидемиологии
и микробиологии имени Пастера»
197101, Россия, Санкт-Петербург, ул. Мира, 14.
Тел.: 8 (981) 834-66-32.
E-mail: sajgalinam@mail.ru

Address for correspondence:

Maria A. Saitgalina
Saint Petersburg Pasteur Institute
14 Mira St
St. Petersburg
197101 Russian Federation
Phone: +7 (981) 834-66-32.
E-mail: sajgalinam@mail.ru

Образец цитирования:

М.А. Сайтгалина, Ю.В. Останкова, А.В. Седых,
Арег А. Тотолян «Особенности преаналитического
этапа при количественном определении TREC/KREC
в периферической крови» // Медицинская иммунология,
2023. Т. 25, № 6. С. 1441-1452.
doi: 10.15789/1563-0625-FOT-2909

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

For citation:

M.A. Saitgalina, Yu.V. Ostankova, A.V. Sedykh,
Areg A. Totolian “Features of the pre-analytical stage
in quantitative determination of TREC/KREC in peripheral
blood”, *Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya
Immunologiya*, 2023, Vol. 25, no. 6, pp. 1441-1452.
doi: 10.15789/1563-0625-FOT-2909

© Saitgalina M.A. et al., 2023
The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License

DOI: 10.15789/1563-0625-FOT-2909

сопоставимы, при сравнении медиан, рассчитанных для каждой группы образцов, значимых различий не выявлено ($p > 0,05$).

При количественном анализе уровней TREC/KREC в периферической крови корректно взятый материал имеет принципиальное значение для получения достоверных показателей, в первую очередь для исключения ложноположительных результатов. Чтобы свести к минимуму погрешности преаналитического этапа, для контроля и/или корректировки ошибок, необходимо дополнительное обучение медицинского персонала.

Ключевые слова: неонатальный скрининг, сухие пятна крови, преаналитический этап, ошибки взятия материала, TREC/KREC

FEATURES OF THE PRE-ANALYTICAL STAGE IN QUANTITATIVE DETERMINATION OF TREC/KREC IN PERIPHERAL BLOOD

Saitgalina M.A.^a, Ostankova Yu.V.^a, Sedykh A.V.^a, Totolian Areg A.^{a, b}

^a Saint Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation

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

Abstract. The use of dried blood spots (DBS) obtained from the heels of infants has many advantages over the collection of whole blood samples. DNA extracted from DBS can be used to detect genetic diseases by PCR, which has contributed to the development of population-based newborn screening worldwide. Since January 2023, the list of identified diseases includes a group of primary immunodeficiencies (PIDs), associated with the absence or decrease in the levels of T and/or B lymphocytes, determined as part of screening by the levels of TREC and KREC molecules in peripheral blood, respectively. Quantitative analysis requires special attention to biological material. The aim is to evaluate the impact of the preanalytical step on the quantitative analysis of TREC/KREC levels in peripheral blood.

The material included 5219 DBS obtained from infants on days 3-4 of life, as well as DBS prepared from the whole blood of 100 apparently healthy individuals aged 18 to 29 years. A comparative analysis of the TREC/KREC molecules number in correctly and incorrectly collected DBS from newborns and adults, as well as depending on the volume of applied blood, was carried out by RT-PCR using test systems to assess the levels of TREC and KREC in peripheral blood. DBS quality was assessed visually.

In the first months of the project, a significant number of incorrectly taken samples were identified – over a third of all DNA maps received for each corresponding month. As a result of additional training of medical staff, the amount of incorrectly collected material decreased to a level not exceeding 1% of all monthly samples collected. When using DNA extracted from DBS with application errors, the majority of samples (64% for newborns, 78% for adults) failed to obtain a result. In the remaining cases, the results obtained were significantly lower than the normal levels of TREC/KREC determined in the same samples with correct DBS collection (all $p < 0.0001$, 95% CI). The volume of blood used when correctly applied to Guthrie cards did not affect the results obtained, TREC and KREC levels were comparable; when comparing the medians calculated for each group of samples, no significant differences were identified ($p > 0.05$).

When quantitatively analyzing TREC/KREC levels in peripheral blood, correctly taken material is fundamental importance to obtain reliable indicators, primarily to exclude false-positive results. To minimize errors in the preanalytical stage, additional training of medical personnel is necessary to control and/or correct errors.

Keywords: neonatal screening, dried blood spots, preanalytical stage, material collection errors, TREC/KREC

Введение

Первое применение сухих пятен крови (dried blood spots – DBS), полученных из пяток младенцев и нанесенных на фильтровальную бумагу, для сбора и анализа крови, относится к началу 1960-х годов, когда доктор Роберт Гатри использовал эти образцы для измерения фенилаланина

у новорожденных с целью выявления фенилкетонурии [8]. Использование DBS дает ряд преимуществ по сравнению с традиционным сбором образцов цельной крови. В том числе стабилизирует многие анализы при высыхании и обеспечивает более простое хранение и транспортировку, поскольку в большинстве случаев нет необходимости в морозильных камерах или сухом льде.

Кроме того, сбор DBS не требует центрифугирования, предполагает малоинвазивный способ взятия крови (прокол пятки вместо венозной канюли) и меньший объем крови, что в совокупности позволило значительно упростить сбор и обработку образцов крови новорожденных. Экстрагированная из сухой капли крови ДНК легко может быть использована для выявления генетических заболеваний у новорожденного методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) [10]. Этот подход способствовал развитию популяционного скрининга новорожденных во всем мире [13].

Основной целью неонатального скрининга является обнаружение новорожденных с серьезными, но поддающимися терапии заболеваниями, чтобы способствовать скорейшему началу адекватного лечения, снижению риска осложнений и неблагоприятного исхода, улучшению качества жизни пациента [1]. Впрочем, существуют аргументы в пользу выявления и неизлечимых заболеваний, главные из которых – психологическая помощь семье, когда смерть ребенка объяснима, а не наступает по неизвестной причине, а также возможность дальнейшего разумного планирования новой беременности. В настоящее время в Российской Федерации в рамках неонатального скрининга определяют 29 нозологий.

Точность диагностики во многом зависит не только от постановки ПЦР-анализа, но также от условий взятия, транспортирования и хранения клинического материала, экстракции ДНК. Так, например, несмотря на существующие критерии абсорбции крови на фильтровальной бумаге, ее различия от партии к партии карт Гатри может способствовать аналитической неточности результатов [9]. Большинство исследований, выполняемых молекулярно-генетическими методами, подразумевают качественную диагностику, т. е. выявление той или иной мутации. Однако с января 2023 года в список выявляемых заболеваний входит группа первичных иммунодефицитов (ПИД), связанных с отсутствием или снижением уровней Т- и/или В-лимфоцитов в периферической крови. Для определения ПИД осуществляют количественный мультиплексный ПЦР-анализ молекул Т-рецепторных эксцизионных колец (англ. T cell receptor excision circles – TREC) и Каппа-делеционных рекомбинационных эксцизионных колец (англ. kappa-deleting recombination excision circles – KREC), представляющих собой небольшие кольцевые фрагменты эписомальной ДНК, образующиеся при перестройке Т-клеточного и В-клеточного рецепторов соответственно [4]. Количественный анализ требует особого внимания к биологическому материалу.

Подробности сбора образцов крови, переноса крови на карту, а также требования хранения и транспортировки полученных DBS описаны в ряде международных рекомендаций, статьях, а также регламентируются внутренними документами каждой страны. В Российской Федерации это приказ министерства здравоохранения № 185 «О массовом обследовании новорожденных детей на наследственные заболевания» [2].

Несмотря на достаточно четко прописанные в приказе и многочисленных инструкциях правила взятия, нанесения и высушивания крови для получения DBS, младший медицинский персонал не всегда с надлежащим тщанием соблюдает рекомендации. Ошибки пробоподготовки сухой капли крови могут приводить к неверному результату анализа или невозможности осуществить исследование. Повторный сбор биологического материала подразумевает увеличение финансовых затрат, а также нередко затруднен физически, так как матери с новорожденными уже выписаны из род.домов.

Целью нашей работы было оценить влияние преаналитического этапа на количественный анализ уровней TREC/KREC в периферической крови.

Материалы и методы

В работе использовали 5219 образцов сухой капли крови на картах Гатри, полученных от младенцев на 3-4-й день жизни в рамках программы скрининга новорожденных из родильных домов Санкт-Петербурга в период с 7 февраля 2020 г. по 30 июня 2021 г., а также цельную кровь от 100 условно здоровых человек в возрасте от 18 до 29 лет. Все процедуры соответствовали этическим стандартам институционального и/или национального комитета по исследовательской этике и Хельсинкской декларации 1964 года и ее последующим изменениям или сопоставимым нормам этики. Дизайн исследования был одобрен локальным этическим комитетом ФБУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера». Исследования проводили при письменном согласии пациентов или родителей пациентов.

Для оценки частоты ошибочного взятия материала осуществляли визуальный мониторинг карт Гатри. Для сравнительной оценки результатов анализа корректно и не корректно взятых образцов случайным образом были выбраны 100 карт Гатри с сухими каплями крови, полученными от здоровых доношенных новорожденных, где одно пятно крови нанесено правильно, в то время как другое пятно имеет недостаточную пропитку, признаки неправильного высушивания или иные

ошибки взятия материала. С использованием цельной крови, полученной от взрослых условно здоровых лиц, были подготовлены парные сухие пятна крови, одно из которых наносили правильно, а другое с намеренными ошибками. Для оценки влияния объема крови были подготовлены сухие пятна крови из цельной крови взрослых лиц с различным объемом наносимого материала (50 мкл, 100 мкл, 150 мкл, 200 мкл, 250 мкл, 300 мкл).

Пробоподготовку осуществляли следующим способом: в реакцию выделения ДНК брали 6 выбитых из DBS дисков диаметром 3 мм, полученных с использованием панчера DBS Puncher (PerkinElmer, Финляндия). Для каждого образца пул дисков готовили в трех повторах. Экстрагировали ДНК с применением набора реагентов для выделения нуклеиновых кислот из сухой капли крови «Экстра-ДНК-Био» («Алкор-био», Россия).

Анализ проводили методом ПЦР в режиме реального времени с гибридизационно-флуоресцентной детекцией с использованием набора реагентов TREC/KREC-AMP PS (ФБУН НИИ Пастера, Россия) [4]. ПЦР проводили на амплификаторе планшетного типа с функцией детекции флуоресценции в режиме реального времени по каналам FAM/Green, HEX/Yellow, Cy5/Red, ROX/Orange (CFX96, США), согласно инструкции производителя. Для образцов, полученных от новорожденных, дополнительно проводили анализ с использованием наборов реагентов EnLite™ TREC-KREC kit (PerkinElmer, Финляндия) и «ИММУНО-БИТ» («АБВ-Тест», Россия).

Статистическую обработку данных проводили с помощью программного обеспечения GraphPad Prism 5 и Microsoft Excel 2010. При множественном сравнении значений исследуемых аналитов в независимых выборках применяли критерий Краскела–Уоллиса и тест Данна. При попарном сравнении выборок применяли критерий Манна–Уитни.

Результаты и обсуждение

Сбор образцов DBS обычно проводили путем прокалывания пятки новорожденного ланцетом, а затем капли крови наносили на предварительно напечатанные круги на специально изготовленной карте Гатри, в идеале одной каплей, нанесенной в центр, равномерно пропитывали обозначенную окружность. Предопределенный круг должен быть однородно и симметрично заполнен, а обе стороны карты должны иметь один и тот же красный цвет. При этом необходимо избегать свертывания и расслоения препарата крови. Младшему медицинскому персоналу, осуществляющему взятие образца, следовало избе-

гать прикосновений к области круга, особенно до того, как кровь будет нанесена и полностью высохнет. В некоторых случаях допускалось нанесение крови на карту Гатри с помощью пипетки/дозатора: наконечник пипетки при этом должен был находиться на несколько миллиметров выше поверхности нанесения, а непосредственно нанесение осуществлялось прикосновением капли крови к центру обозначенной окружности. Очень важно полностью высушить пятна крови перед хранением или транспортировкой. В целом рекомендовалась сушка в течение минимум 2-3 часов на открытом пространстве при комнатной температуре (15-22 °С), однако время высыхания зависит от типа бумаги и нанесенного объема крови [6]. Образцы нельзя нагревать, складывать друг на друга, допускать прикосновение к другим поверхностям, хранить в доступе прямых солнечных лучей. Избыточная влага в помещении может повлиять на качество образцов крови на бумаге, вызывая рост бактерий, изменяя эффективность экстракции нуклеиновых кислот во время анализа или способствуя разложению нестабильных аналитов. Таким образом, после высыхания образцы DBS следовало защитить от сырости, накрыв их бумажной накладкой и упаковав во влагонепроницаемые пакеты с zip-застежкой и пакетами с влагопоглотителем. На рисунке 1 (см. 2-ю стр. обложки) представлен результат правильного сбора DBS.

Наиболее частые ошибки пробоподготовки (нанесения крови и высушивания) представлены на рисунке 2 (см. 2-ю стр. обложки).

В мировой практике отмечают сходные ошибки пробоподготовки сухой капли крови: к пятнам крови низкого качества относят многоточечные образцы (несколько маленьких пятен крови используются для получения одного более крупного пятна крови), недостаточное количество крови на карте, кровь, нанесенная на обе стороны карты, слоистые пятна крови (последовательное наслаивание нескольких доз крови) и, так называемые, сдавленные пятна крови (compressed blood spots), когда небольшой объем крови за счет внешнего воздействия визуально занимает всю площадь отмеченной окружности [7]. Качество DBS может быть оценено субъективно путем визуального осмотра в скрининговой лаборатории, и для тех образцов, которые непригодны для анализа, должны быть запрошены повторные образцы. Однако отбраковка образцов не стандартизирована, поскольку не существует конкретных указаний по определению минимальных критериев приемлемости качества DBS. Отсутствие консенсуса приводит к большим различиям в практике: разные лаборатории принимают или отклоняют образцы разного качества, что приводит к путанице сре-

ди сборщиков проб относительно того, что представляет собой приемлемая проба, и затрудняет сравнение частот повторного забора материала, которого можно избежать.

При визуальной оценке качества материала на полученных в рамках настоящего исследования картах Гатри было выявлено значительное количество неправильно взятых образцов или образцов, для которых одно пятно крови нанесено правильно, в то время как другое пятно имеет недостаточную пропитку, признаки неправильного высушивания или иные ошибки взятия материала. Наибольшее количество некорректно взятых образцов приходилось на первые четыре месяца проекта (рис. 3).

Следует отметить, что количество некорректно взятых образцов в первые месяцы настоящей работы, фактически превышающее треть всех полученных за каждый соответствующий месяц ДНК-карт, было для нас неожиданностью. В связи с чем для медицинского персонала было проведено обучение по грамотному взятию, высушиванию и хранению материала, а затем на протяжении пяти месяцев еженедельно осуществляли контроль взятия сухой капли крови и при необходимости повторно демонстрировали последовательность верных манипуляций. В результате обучения количество некорректно взятого материала снизилось до уровня, не превышающего 1% от всех полученных образцов.

При параллельном анализе образцов, представленных двумя пятнами крови, одно из которых нанесено некорректно, было показано очевидное различие получаемых результатов. При использовании корректно взятого пятна крови младенцев уровни TREC и KREC превышали пороговые уровни и соответствовали нормам содержания эксцизионных колец у новорожденных, указанных для каждой используемой тест-системы. У взрослых обследованных при использовании ДНК, экстрагированной из корректно собранных образцов сухой капли крови, уровни TREC и KREC превышали 44,9 копий/ 10^5 клеток и 49,9 копий/ 10^5 клеток, соответственно, что согласуется с установленными граничными нормами для лиц 18-29 лет [3]. При использовании ДНК, выделенной из сухих пятен крови с ошибками нанесения материала на карту Гатри, у большей части образцов (для новорожденных $n = 64$, 64%, 95% ДИ: 53,79-73,36%; для взрослых лиц $n = 78$, 78%, 95% ДИ: 68,61-85,67%) не удавалось получить каких-либо результатов, так как выход продуктов амплификации отсутствовал: флуоресцентные сигналы целевых и/или нормировочных генов не нарастали в ходе реакции. Это может свидетельствовать о деградации

ДНК в таких образцах и, соответственно, ее недостаточном количестве для анализа.

В остальных случаях удавалось провести анализ ДНК, экстрагированной из таких образцов крови, и рассчитать уровень TREC/KREC в пробе, однако полученные результаты были значительно ниже нормальных уровней содержания TREC и KREC в периферической крови. На рисунке 4 представлена сравнительная оценка уровней TREC, рассчитанных для одних и тех же образцов крови новорожденных, нанесенных на карты Гатри с соблюдением протокола взятия биоматериала (корректно) и с допущением ошибок.

Во всех случаях уровень молекул TREC, определенный в образцах крови, взятых с нарушениями рекомендаций, значительно отличался от рассчитанного в корректно взятых образцах крови (во всех случаях $p < 0,0001$, 95% ДИ) и был близок к нулевому значению.

Уровни молекул TREC, определенных с использованием разных наборов реагентов для одного и того же образца крови, отличались по значению, поскольку разные тест-системы используют разные протоколы анализа, способы нормировки данных, единицы измерений. Однако была показана корреляция между значениями TREC, рассчитанными на разных тест-системах, для одного и того же набора образцов крови в том случае, если соблюдались условия нанесения капель крови на карту Гатри и их хранения. Корреляционная зависимость между данными отсутствовала, если при пробоподготовке были допущены грубые ошибки (рис. 5). На рисунке 5 отображены значения коэффициентов корреляции для уровней TREC в тех образцах крови, которые собирали с учетом рекомендаций (А и В). При сравнении значений, полученных с использованием тест-системы TREC/KREC-Amp PS с тест-системами «ИММУНО-БИТ» и EnLite™, значения коэффициентов корреляции в обоих случаях стремились к 0,9, что говорит о высокой силе связи между сравниваемыми выборками. В случае нарушений в процессе пробоподготовки корреляция между полученными значениями TREC отсутствовала (рис. 5Б, Г).

Аналогичные данные получены при оценке уровней KREC в описанных выше образцах крови новорожденных: при нарушении рекомендаций по сбору и хранению крови на картах Гатри уровни KREC оказывались значительно ниже ($p < 0,0001$, 95% ДИ) при сравнении с теми же образцами в условиях соблюдения всех рекомендаций пробоподготовки (рис. 6).

На рисунке 7 отображена корреляция уровней KREC, рассчитанных с использованием разных тест-систем, для одного и того же набора образ-

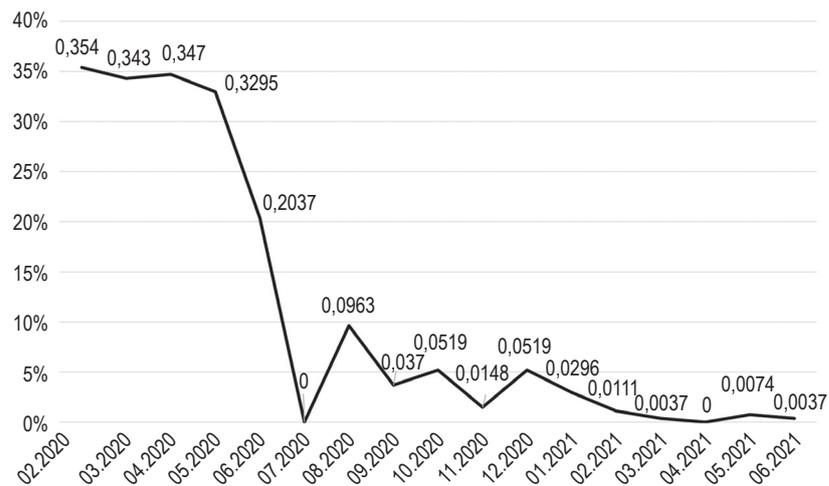


Рисунок 3. Динамика количества некорректно взятых образцов по месяцам

Figure 3. Dynamics of the incorrectly collected samples number by month

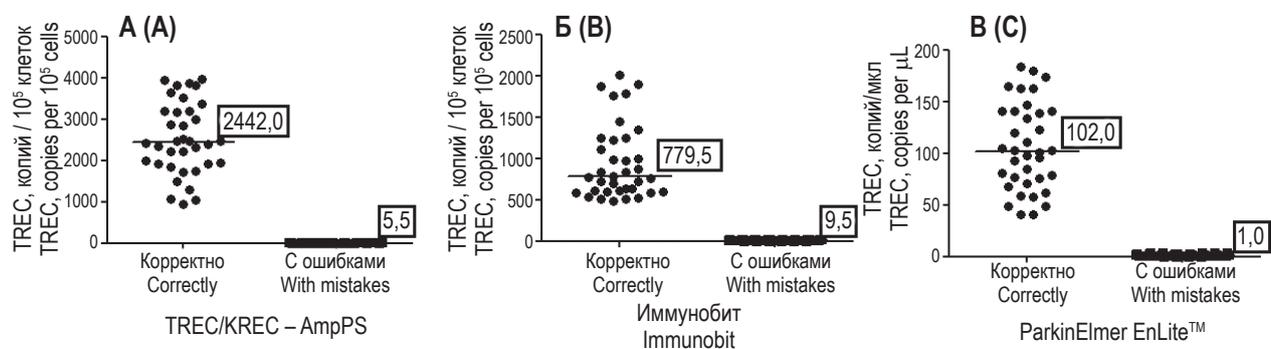


Рисунок 4. Сравнение уровней TREC, определенных с использованием разных тест-систем, в образцах крови новорожденных, нанесенных на карты Гатри с соблюдением рекомендаций (корректно) и с допущением ошибок
Примечание. А – TREC/KREC-Amp PS (копий/10⁵ клеток), НИИ им. Пастера. Б – «ИММУНО-БИТ» (копий/10⁵ клеток), «АБВ-Тест». В – EnLite™ TREC-KREC kit (копий/мкл), PerkinElmer. Числами на диаграммах обозначены медианные значения аналита.

Figure 4. Comparison of TREC levels determined using different test systems in newborn blood samples plotted on Guthrie charts following recommendations (correctly) and with mistakes

Note. (A) "TREC/KREC-Amp PS" (copies per 10⁵ cells), Saint Petersburg Pasteur Institute. (B) "IMMUNO-BIT" (copies per 10⁵ cells), ABV-test. (C) "EnLite™ TREC-KREC kit" (copies per μ L), PerkinElmer. The numbers in the diagrams indicate the median values of the analyte.

цов крови в случаях, когда соблюдались условия нанесения капель крови на карту Гатри и когда образцы были взяты некорректно.

При работе с образцами крови, полученными от лиц 18-29 лет, также наблюдали значительное снижение уровней и TREC ($p < 0,0001$), и KREC ($p < 0,0001$) в тех случаях, когда были допущены ошибки при нанесении крови на бумажный фильтр или при его высушивании (рис. 8).

Образцы низкого качества могут создать дополнительные проблемы в процессе проверки. В том числе повторное взятие крови у младенца, запоздалое сообщение результатов анализа из-за необходимости получения повторного образца и, соответственно, задержка направления пациентов с положительным результатом скрининга на диагностическое обследование и последующую терапию. Кроме того, с повторным взятием проб

увеличивается объем рабочей нагрузки и финансовых затрат как лабораторий, так и лиц, осуществляющих взятие материала. Отмечают также, что запрос повторного взятия материала может вызвать стресс у ребенка, беспокойство родителей и сопровождаться отказом родителей от предоставления дополнительного образца [5]. Некоторые исследователи считают, что для многих некорректно взятых образцов можно найти участок пятна с достаточной насыщенностью кровью, отсутствием царапин или иных повреждений поверхности бумаги. В этих случаях рекомендуют использовать для анализа доступный материал и не запрашивать образец повторно [12]. Однако это недопустимо, если образцы крови должны использоваться для целей диагностики или скрининговых тестов, где положительный результат определяется уровнем аналита ниже, а не выше,

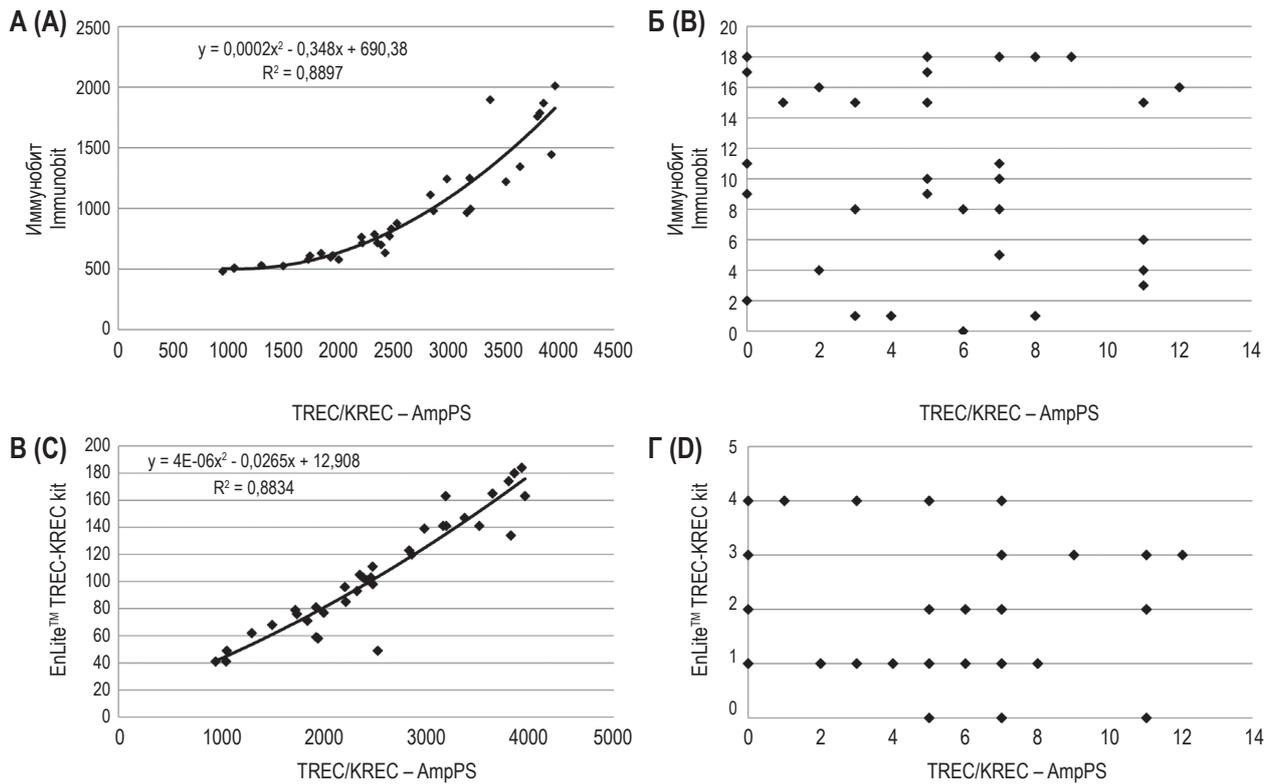


Рисунок 5. Корреляция уровней TREC, определенных с использованием разных тест-систем и разных условий подготовки проб

Примечание. А – TREC/KREC-Amp PS и «ИММУНО-БИТ», соблюдение рекомендаций пробоподготовки. Б – TREC/KREC-Amp PS и «ИММУНО-БИТ», некорректная пробоподготовка. В – TREC/KREC-Amp PS и EnLite™ TREC-KREC kit PerkinElmer, соблюдение рекомендаций пробоподготовки. Г – TREC/KREC-Amp PS и EnLite™ TREC-KREC kit PerkinElmer, некорректная пробоподготовка.

Figure 5. Correlation of TREC levels determined using different test systems and different sample preparation conditions
Note. A, “TREC/KREC-Amp PS” and “IMMUNO-BIT”, compliance with sample preparation recommendations. B, “TREC/KREC-Amp PS” and «IMMUNO-BIT”, incorrect sample preparation. C, “TREC/KREC-Amp PS” and “EnLite™ TREC-KREC kit” PerkinElmer, compliance with sample preparation recommendations. D, “TREC/KREC-Amp PS” and “EnLite™ TREC-KREC kit” PerkinElmer, incorrect sample preparation.

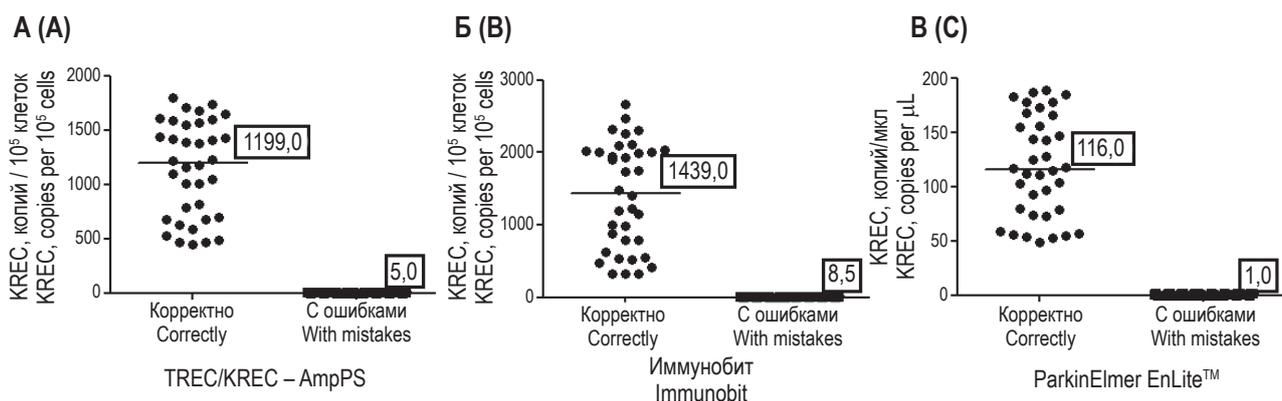


Рисунок 6. Сравнение уровней KREC, определенных с использованием разных тест-систем, в образцах крови новорожденных, нанесенных на карты Гатри с соблюдением рекомендаций (корректно) и с допущением ошибок

Примечание. А – TREC/KREC-Amp PS (копий/10⁵ клеток), НИИ им. Пастера. Б – «ИММУНО-БИТ» (копий/10⁵ клеток), «АБВ-Тест». В – EnLite™ TREC-KREC kit (копий/мкл), PerkinElmer. Числами на диаграммах обозначены медианные значения анализа.

Figure 6. Comparison of KREC levels determined using different test systems in newborn blood samples plotted on Guthrie charts following recommendations (correctly) and with mistakes

Note. A, “TREC/KREC-Amp PS” (copies per 10⁵ cells), Saint Petersburg Pasteur Institute. B, “IMMUNO-BIT” (copies per 10⁵ cells), ABV-test. C, “EnLite™ TREC-KREC kit” (copies per μL), PerkinElmer. The numbers in the diagrams indicate the median values of the analyte.

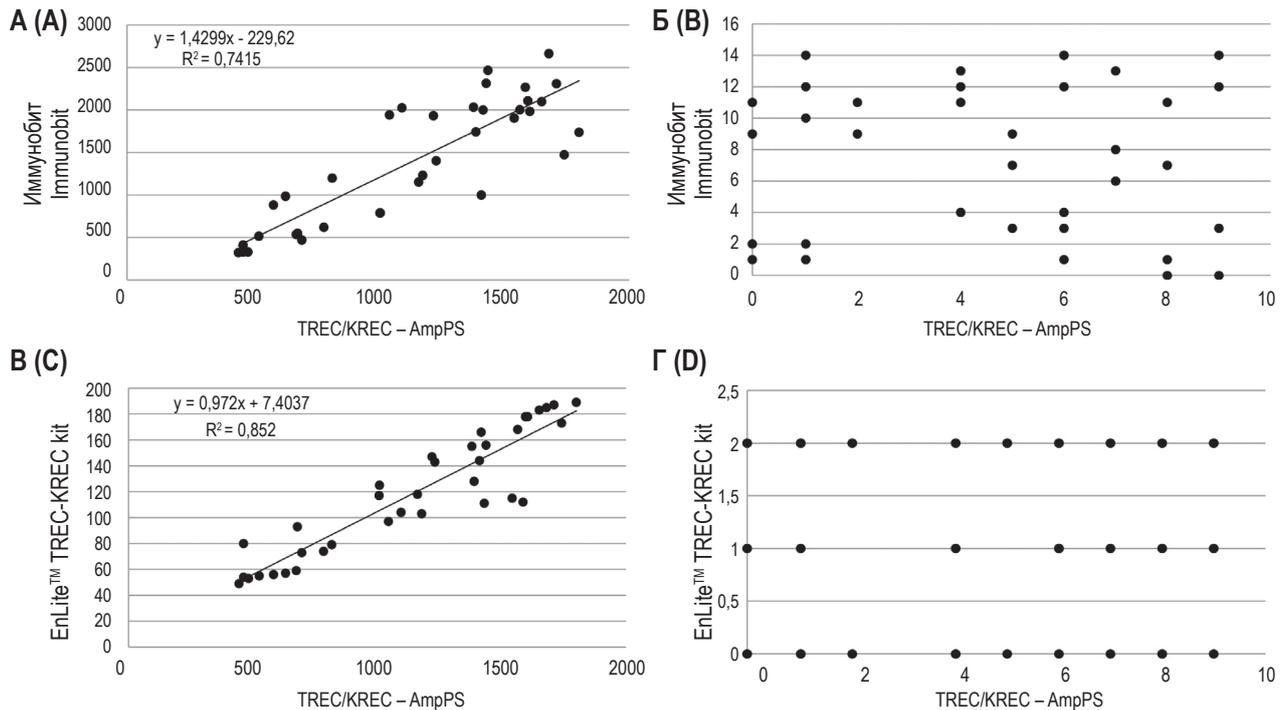


Рисунок 7. Корреляция уровней KREC, определенных с использованием разных тест-систем и разных условий подготовки проб

Примечание. А – TREC/KREC-Amp PS и «ИММУНО-БИТ», соблюдение рекомендаций пробоподготовки. Б – TREC/KREC-Amp PS и «ИММУНО-БИТ», некорректная пробоподготовка. В – TREC/KREC-Amp PS и EnLite™ PerkinElmer, соблюдение рекомендаций пробоподготовки. Г – TREC/KREC-Amp PS и EnLite™ PerkinElmer, некорректная пробоподготовка.

Figure 7. Correlation of KREC levels determined using different test systems and different sample preparation conditions

Note. A, “TREC/KREC-Amp PS” and “IMMUNO-BIT”, compliance with sample preparation recommendations. B, “TREC/KREC-Amp PS” and “IMMUNO-BIT”, incorrect sample preparation. C, “TREC/KREC-Amp PS” and “EnLite™ TREC-KREC kit” PerkinElmer, compliance with sample preparation recommendations. D, “TREC/KREC-Amp PS” and “EnLite™ TREC-KREC kit” PerkinElmer, incorrect sample preparation.

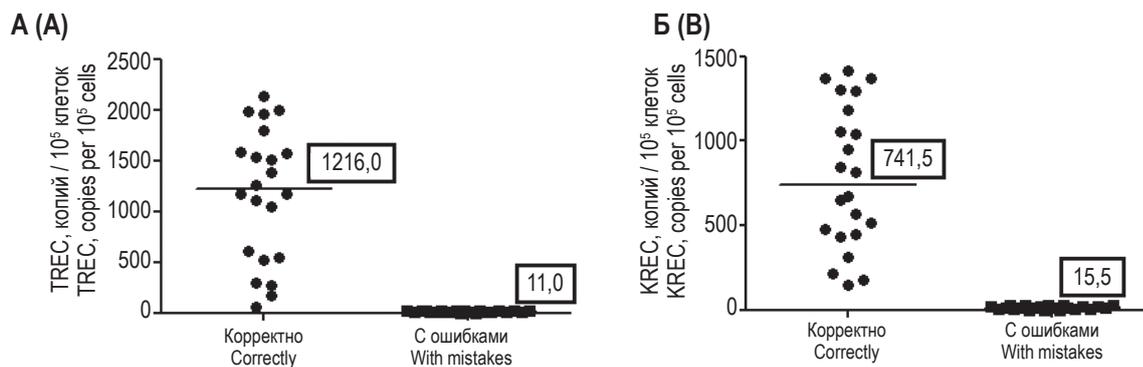


Рисунок 8. Сравнение уровней TREC (А) и KREC (Б), определяемых в образцах крови людей старше 18 лет, собранных на карты Гатри с соблюдением всех рекомендаций и с ошибками при пробоподготовке

Примечание. Анализ проведен с использованием тест-системы TREC/KREC-Amp PS, НИИ им. Пастера. Числами на диаграммах обозначены медианные значения аналитов.

Figure 8. Comparison of TREC (A) and KREC (B) levels determined in blood samples from people over 18 years old collected on Guthrie cards in compliance with all recommendations and with mistakes during sample preparation

Note. The analysis was carried out using the test system “TREC/KREC-Amp PS”, Saint Petersburg Pasteur Institute. The numbers in the diagrams indicate the median values of the analytes.

установленного порогового значения, например, при скрининге на дефицит биотинидазы, дефицит глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы и ПИД [7].

Несмотря на то, что DBS дает много преимуществ перед венепункцией, измерение биомаркеров в образцах DBS осложняется рядом проблем, в том числе малыми и переменными объемами крови. Для многих количественных показателей имеет значение объем пятна крови: исследователи наблюдали снижение уровней некоторых аналитов в сухой капле крови недостаточного объема, что может быть связано с большей миграцией образца после нанесения на фильтровальную бумагу и, следовательно, с меньшим количеством крови при взятии панча [11].

В настоящей работе были подготовлены сухие пятна крови из цельной крови взрослых лиц с различным объемом наносимого материала (рис. 9, см. 3-ю стр. обложки) и проведена оценка влияния объема цельной крови при подготовке

сухого пятна на определяемые уровни TREC и KREC.

На рисунке 10 представлено сравнение уровней молекул TREC в образцах крови взрослых людей, корректно нанесенной на карты Гатри в разных объемах с последующей экстракцией суммарной ДНК из сухих пятен крови. Вне зависимости от объема крови (одного и того же образца), наносимого на бумажный фильтр, получали сопоставимые результаты. При сравнении медиан, рассчитанных для каждой группы образцов, значимых различий не выявлено ($p > 0,05$).

Показана достоверная корреляция между значениями TREC, определенными в пробах ДНК, экстрагированных из карт Гатри, пропитанных разными объемами крови, полученной от одного и того же индивидуума. Коэффициент корреляции $R^2 = 0,99$ свидетельствует об очень высокой силе связи полученных данных (рис. 11, см. 3-ю стр. обложки).

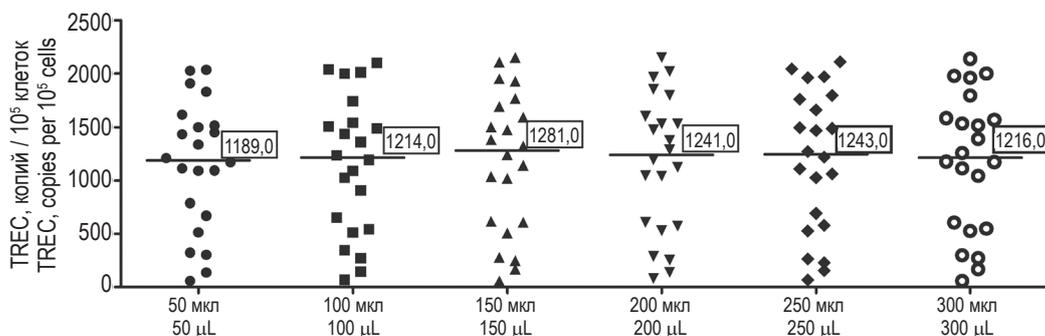


Рисунок 10. Сравнение уровней TREC в пробах крови, полученной от людей старше 18 лет, при ее корректном нанесении на карты Гатри в разных объемах и последующей экстракции суммарной ДНК из сухих капель крови

Примечание. Числами обозначены медианные значения для каждой группы образцов.

Figure 10. Comparison of TREC levels in blood samples obtained from people over 18 years old when correctly applied to Guthrie cards in different volumes and subsequent extraction of total DNA from dried blood spots

Note. The numbers indicate the median values for each group of samples.

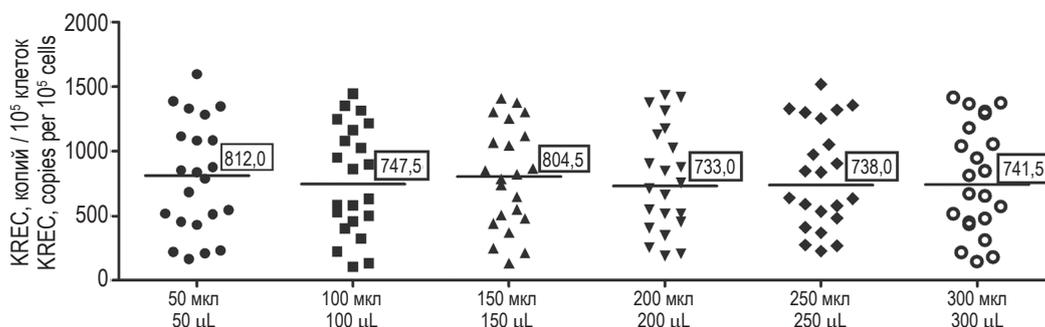


Рисунок 12. Сравнение уровней KREC в пробах крови, полученной от людей старше 18 лет, при ее корректном нанесении на карты Гатри в разных объемах и последующей экстракции суммарной ДНК из сухих капель крови

Примечание. Числами обозначены медианные значения для каждой группы образцов.

Figure 12. Comparison of KREC levels in blood samples obtained from people over 18 years old when correctly applied to Guthrie cards in different volumes and subsequent extraction of total DNA from dried blood drops

Note. Numbers indicate median values for each group of samples.

Аналогичные результаты получены для уровней KREC: объем крови, нанесенный на карту Гатри с соблюдением рекомендаций, не влияет на определяемую концентрацию анализата при использовании тест-системы TREC/KREC-Amp PS. Между сухими каплями крови, полученными с использованием разных объемов одного и того же образца крови, установлена достоверная корреляция по уровням KREC (отображено на рисунках 12 и 13 (см. 3-ю стр. обложки) соответственно).

Вне зависимости от объема крови (для одного и того же образца), наносимого на бумажный фильтр, получали сопоставимые результаты уровня KREC. При сравнении медиан, рассчитанных для каждой группы образцов, значимых различий не выявлено ($p > 0,05$). Коэффициент корреляции $R^2 = 0,98$ свидетельствует об очень высокой силе связи полученных данных (рис. 13, см. 3-ю стр. обложки).

Таким образом, при корректном взятии и высушивании образца крови объем использованного материала не оказывает влияния на результаты анализа уровней TREC и KREC в периферической крови. По всей видимости, связано это с тем, что нормировка данных осуществляется с учетом количества клеток крови в исследуемом образце. Однако следует иметь в виду, что сухая капля крови, взятая у младенца в рамках скрининга, предназначена для выполнения большого

количества исследований, а значит, ограничение объема наносимой на карту Гатри крови нежелательно. Трудно точно контролировать размер пятен крови при сборе образцов крови из пятки у новорожденных, скрининговая лаборатория может применять согласованные критерии приемлемости пятен крови и предпочтительно отбирать для перфорации пятна крови соответствующего размера и качества.

Заключение

Различия пробоподготовки сухих пятен крови, пропитки бумаги существенно влияют на измеряемые концентрации TREC и KREC, анализируемые в рамках программы скрининга новорожденных. При количественном анализе уровней TREC/KREC в периферической крови корректно взятый материал имеет принципиальное значение для получения достоверных показателей, в первую очередь для исключения ложноположительных результатов. Медицинский персонал должен внимательно следить за тем, чтобы все отмеченные окружности на фильтровальной бумаге карты Гатри были заполнены, равномерно пропитаны кровью и корректно высушены. Чтобы свести к минимуму погрешности преаналитического этапа, для контроля и/или корректировки ошибок необходимо дополнительное обучение медицинского персонала.

Список литературы / References

1. Воронин С.В., Куцев С.И. Неонатальный скрининг на наследственные заболевания в России: вчера, сегодня, завтра // Неонатология: Новости. Мнения. Обучение, 2022. Т. 10, № 4. С. 34-39. [Voronin S.V., Kutsev S.I. Neonatal screening for hereditary diseases in Russia: yesterday, today, and tomorrow. *Neonatologiya: novosti, mneniya, obuchenie. Neonatologiya: Novosti. Mneniya. Obuchenie = Neonatology: News, Opinions, Training*, 2022, Vol. 10, no. 4, pp. 34-39 (In Russ.)]
2. Григорьев К.И., Харитонов Л.А., Радзинский В.Е., Папышева О.В., Котайш Г.А. Перинатальная медицина и проблемы неонатального скрининга // Медицинская сестра, 2017. № 4. С. 3-9. [Grigoryev K.I., Kharitonova L.A., Radzinsky V.E., Papyшева O.V., Kotaish G.A. Perinatal medicine and problems of newborn screening. *Meditsinskaya sestra = Nurse*, 2017, Vol. 4, pp. 3-9. (In Russ.)]
3. Сайтгалина М.А., Любимова Н.Е., Останкова Ю.В., Кузнецова Р.Н., Тотолян Арег А. Определение референтных интервалов циркулирующих в крови эксцизионных колец TREC и KREC у лиц старше 18 лет // Медицинская иммунология, 2022. Т. 24, № 6. С. 1227-1236. [Saitgalina M.A., Liubimova N.E., Ostankova Yu.V., Kuznetzova R.N., Totolian Areg A. Determination of reference values for TREC and KREC in circulating blood of the persons over 18 years. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2022, Vol. 24, no. 6, pp. 1227-1236. (In Russ.)] doi:10.15789/1563-0625-DOR-2587.
4. Сайтгалина М.А., Останкова Ю.В., Любимова Н.Е., Семенов А.В., Кузнецова Р.Н., Тотолян А.А. Модифицированный метод количественного определения уровней TREC и KREC в периферической крови у больных с иммунодефицитными состояниями // Инфекция и иммунитет, 2022. Т. 12, № 5. С. 981-996. [Saitgalina M.A., Ostankova Y.V., Liubimova N.E., Semenov A.V., Kuznetzova R.N., Totolian A.A. Modified quantitative approach for assessing peripheral blood TREC and KREC levels in immunodeficient patients. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2022, Vol. 12, no. 5, pp. 981-996. (In Russ.)] doi:10.15789/2220-7619-MMF-2039.
5. Bello S., Ferguson C., Wallis R. Improvements to the newborn bloodspot screening service are required to meet national standards. *J. Med. Screen.*, 2010, Vol. 17, no. 3, pp. 114-120.

6. Edelbroek P.M., van der Heijden J., Stolk L.M. Dried blood spot methods in therapeutic drug monitoring: methods, assays, and pitfalls. *Ther. Drug Monit.*, 2009, Vol. 31, no. 3, pp. 327-336.
7. George R.S., Moat S.J. Effect of dried blood spot quality on newborn screening analyte concentrations and recommendations for minimum acceptance criteria for sample analysis. *Clin. Chem.*, 2016, Vol. 62, no. 3, pp. 466-475.
8. Guthrie R., Susi A. A simple phenylalanine method for detecting phenylketonuria in large populations of newborn infants. *Pediatrics*, 1963, Vol. 32, pp. 338-343.
9. Lawson A.J., Bernstone L., Hall S.K. Newborn screening blood spot analysis in the UK: influence of spot size, punch location and haematocrit. *J. Med. Screen.*, 2016, Vol. 23, no. 1, pp. 7-16.
10. McCabe E.R., Huang S.Z., Seltzer W.K., Law M.L. DNA microextraction from dried blood spots on filter paper blotters: potential applications to newborn screening. *Hum. Genet.*, 1987, Vol. 75, pp. 213-216.
11. Mei J.V., Alexander J.R., Adam B.W., Hannon W.H. Use of filter paper for the collection and analysis of human whole blood specimens. *J. Nutr.*, 2001, Vol. 131, no. 5, pp. 1631S-1636S.
12. Shepherd A.J., Glenesk A., Niven C.A., Mackenzie J. A Scottish study of heel-prick blood sampling in newborn babies. *Midwifery*, 2006, Vol. 22, no. 2, pp. 158-168.
13. Wilcken B., Wiley V. Newborn screening. *Pathology*, 2008, Vol. 40, no. 2, pp. 104-115.

Авторы:

Сайтгалина М.А. — младший научный сотрудник лаборатории молекулярной иммунологии 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

Authors:

Saitgalina M.A., Junior Research Associate, Laboratory of Molecular Immunology, 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

Седых А.В. – младший научный сотрудник лаборатории молекулярной иммунологии ФБУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера», Санкт-Петербург, Россия

Sedykh A.V., Junior Research Associate, Laboratory of Molecular Immunology Saint Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation

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

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 14.09.2023
Принята к печати 15.09.2023

Received 14.09.2023
Accepted 15.09.2023

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ НАБОРОВ РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ВЫДЕЛЕНИЯ ДНК ИЗ СУХИХ ПЯТЕН КРОВИ

Седых А.В.¹, Сайтгалина М.А.¹, Останкова Ю.В.¹, Тотолян Арег А.^{1,2}

¹ФБУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера», Санкт-Петербург, Россия

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

Резюме. Неонатальный скрининг – обязательная процедура обследования новорожденных, которая позволяет выявить наличие генетических заболеваний. Для массового обследования детей используют сухие пятна крови. Эта технология является наиболее доступной и удобной для транспортировки и хранения биологического материала. Выделение ДНК – один из важных этапов в молекулярной диагностике, точность которого особенно важна при генетическом анализе. Различные наборы для экстракции ДНК предлагают различные протоколы и реагенты, которые могут отличаться по эффективности и качеству выделения.

Целью нашей работы было проведение сравнительного анализа наборов реагентов для экстракции ДНК из сухих пятен крови.

Материалом служили образцы сухой капли крови на картах Гатри, полученные от здоровых доношенных младенцев на 3-4 день жизни в рамках программы скрининга новорожденных.

Методы исследования включали спектрофотометрический анализ для определения концентрации и чистоты ДНК, оценивали также простоту протоколов, продолжительность выделения, возможность автоматизации процесса. Контроль эффективности экстракции ДНК разными наборами реагентов дополнительно осуществляли по результатам ПЦР в режиме реального времени с применением тест-системы для оценки уровней TREC и KREC в периферической крови, так как количественный анализ требует большей внимательности к исследуемому материалу.

При оценке чистоты НК, экстрагированных с использованием всех четырех анализируемых наборов, можно было наблюдать успешную депротеинизацию образцов ДНК и относительную чистоту. Средняя чистота ДНК для набора «Экстра-ДНК-Био» составила $2,2 \pm 0,23$, для «ЭКСТРА-преп PS» – $1,89 \pm 0,23$, для «МагноПрайм ЮНИ» при ручном и автоматическом выделении – $2,31 \pm 0,21$ и $2,85 \pm 0,09$ соответственно. Средняя концентрация ДНК для набора «Экстра-ДНК-Био» составила 15,28 мкг/мл, для «ЭКСТРА-преп PS» – 16,26 мкг/мл, для «МагноПрайм ЮНИ» при ручном и автоматическом выделении – 62,5 мкг/мл и 102,28 мкг/мл, соответственно. Согласно примененному критерию Краскела–Уоллиса и тесту Данна, значимые различия и по параметру TREC, и по параметру

Адрес для переписки:

Седых Анна Васильевна
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: ann_sedykh@mail.ru

Address for correspondence:

Anna V. Sedykh
Saint Petersburg Pasteur Institute
14 Mira St
St. Petersburg
197101 Russian Federation
Phone: +7 (812) 233-20-92.
E-mail: ann_sedykh@mail.ru

Образец цитирования:

А.В. Седых, М.А. Сайтгалина, Ю.В. Останкова,
Арег А. Тотолян «Сравнительный анализ наборов
реагентов для выделения ДНК из сухих пятен крови»
// Медицинская иммунология, 2023. Т. 25, № 6.
С. 1453-1462. doi: 10.15789/1563-0625-CAO-2895

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

For citation:

A.V. Sedykh, M.A. Saitgalina, Yu.V. Ostankova,
Areg A. Totolian “Comparative analysis of reagent kits for
DNA extraction from dry blood stains”, *Medical Immunology
(Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2023, Vol. 25, no. 6,
pp. 1453-1462.

doi: 10.15789/1563-0625-CAO-2895

© Sedykh A.V. et al., 2023
The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License

DOI: 10.15789/1563-0625-CAO-2895

тру KREC присутствуют между группой образцов ДНК, экстрагированных с использованием набора реагентов «МагноПрайм ЮНИ» при ручном выделении, с группами образцов, экстрагированных другими способами («МагноПрайм ЮНИ» при автоматическом выделении) или наборами «Экстра-ДНК-Био» и «ЭКСТРА-преп PS».

В ходе настоящего исследования четыре сравниваемых набора реагентов продемонстрировали высокий уровень сходимости полученных данных, удовлетворяя всем необходимым параметрам для проведения дальнейшего молекулярно-генетического анализа, могут быть использованы для неонатального скрининга и в других областях исследований, требующих экстракции ДНК из сухой капли крови.

Ключевые слова: неонатальный скрининг, сухие пятна крови, выделение ДНК, первичные иммунодефициты, TREC, KREC

COMPARATIVE ANALYSIS OF REAGENT KITS FOR DNA EXTRACTION FROM DRY BLOOD STAINS

Sedykh A.V.^a, Saitgalina M.A.^a, Ostankova Yu.V.^a, Totolian Areg A.^{a, b}

^a Saint Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation

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

Abstract. Neonatal screening is a mandatory newborn screening procedure that detects the presence of genetic diseases. Dry blood stains are used for mass screening of children. This technology is the most affordable and convenient for the transportation and storage of biological material. DNA extraction is one of the important steps in molecular diagnostics, the accuracy of which is particularly important in genetic analysis. Different DNA extraction kits offer different protocols and reagents, which may vary in efficiency and quality of extraction.

The aim of our work was to perform a comparative analysis of reagent kits for DNA extraction from dried blood spots.

The materials were dried blood drop samples on Guthrie cards obtained from healthy preterm infants on day 3-4 of life as part of a newborn screening program.

The study methods included spectrophotometric analysis to determine the concentration and purity of DNA, the simplicity of protocols, the duration of isolation, and the possibility of automating the process were also evaluated. The efficiency of DNA isolation using different reagent kits was additionally monitored by real-time PCR results using a test system to assess the level of TREC and KREC in peripheral blood, since quantitative analysis requires more attention to the material under study.

In assessing the purity of the nucleic acid extracted using four kits analyzed, successful deproteinization of DNA samples and relative purity could be observed. The average DNA purity for the “Extra-DNA-Bio” set was 2.2 ± 0.23 , for “EXTRA-prep PS” – 1.89 ± 0.23 , for “MagnoPrime UNI” with manual and automatic isolation – 2.31 ± 0.21 and 2.85 ± 0.09 , respectively. The average DNA concentration for the Extra-DNA-Bio kit was $15.28 \mu\text{g/mL}$, for the EXTRA-Prep PS kit it was $16.26 \mu\text{g/mL}$, and for the MagnoPrime UNI for manual and automated isolation it was $62.5 \mu\text{g/mL}$ and $102.28 \mu\text{g/mL}$, respectively. According to the applied Kraskell-Wallis criterion and Dunn’s test, significant differences in both TREC and KREC parameters are present between the group of DNA samples extracted using the “MagnoPrime UNI” reagent kit for manual extraction and the groups of samples extracted by other methods (“MagnoPrime UNI” for automatic extraction) or “Extra-DNA-Bio” and “EXTRA-Prep PS” kits.

In the course of the present study, four comparable reagent sets demonstrated a high level of convergence of the obtained data, satisfying all the necessary parameters for further molecular genetic analysis, can be used for neonatal screening and in other areas of research requiring DNA extraction from a dried blood spots.

Keywords: neonatal screening, dried blood spots, DNA isolation, primary immunodeficiencies, TREC, KREC

Введение

На сегодняшний день в России, как и во многих других странах, неонатальный скрининг является обязательной процедурой для всех ново-

рожденных. Главная цель программ массового обследования – выявить редкие генетически-детерминированные заболевания [3]. С 2023 г. список патологий, на которые проводят неонатальный скрининг в России, расширен на 29 но-

зологий, включая нарушения обмена веществ, спинально мышечную атрофию, а также группу первичных иммунодефицитов (ПИД), связанных с отсутствием или снижением уровней Т- и/или В-лимфоцитов в периферической крови. В настоящее время ведутся работы не только по расширению перечня заболеваний, которые можно выявить при скрининге, но и по улучшению методов диагностики и лечения этих заболеваний [2, 5]. Так, например, мультиплексный анализ определения концентрации молекул Т-рецепторных эксцизионных колец (англ. T cell receptor excision circles – TREC) и Каппа-делеционных рекомбинационных эксцизионных колец (англ. kappa-deleting recombination excision circles – KREC), представляющих собой небольшие кольцевые фрагменты эписомальной ДНК, образующиеся при перестройке Т-клеточного и В-клеточного рецепторов, соответственно, позволяет идентифицировать детей с ПИД, проявляющимися Т- (или) В-клеточными лимфопениями [10, 13].

Основным подходом при скрининге новорожденных является прямая диагностика, которая заключается в непосредственном обнаружении мутаций в определенных генах. На данный момент проводят определение ряда мутаций в генах *CYP21OHВ*, *CFTR*, *GALT*, *SMN1*, *PAH*, *TSH* α - и β -субъединиц, а также количественную оценку уровней молекул TREC и KREC в периферической крови [7, 8, 9, 11, 13, 14, 18]. Выбор метода молекулярной диагностики определяется спецификой исследуемой мутации и включает как метод ПЦР, так и более сложные ДНК-методы.

В соответствии с приказом МЗРФ от 22.03.2006 г. № 185 «О массовом обследовании новорожденных детей на наследственные заболевания», образцы крови новорожденных получают в виде сухих пятен крови на картах Гатри (DBS – dry blood spot) [4]. Для младенцев данная технология считается безопасной и менее травматичной, чем взятие цельной венозной крови. Биологический материал в виде сухой капли крови имеет преимущества в транспортировке и хранении. Так, доставляются карты Гатри в герметичной упаковке при температуре от минус 20 до плюс 37 °С, а хранятся многие годы при температуре от плюс 18 до плюс 25 °С. ДНК, выделенная из таких образцов, остается пригодной по своим качественным и количественным характеристикам для генетического анализа, что является необходимым критерием для быстрого и информативного скрининга [6]. Таким образом, неонатальный скрининг проводят, используя методику экстракции ДНК из сухих пятен крови с последующим молекулярно-генетическим анализом.

Точность диагностики во многом зависит не только от постановки ПЦР-анализа, но также от

условий взятия, транспортирования и хранения клинического материала. Еще одним значимым для качества и результата анализа этапом является выделение нуклеиновых кислот. Экстракция ДНК – это важная стадия генетического анализа, поскольку качество и количество выделенной ДНК напрямую влияют на точность и достоверность результатов [6]. Различные наборы для выделения ДНК могут варьировать по составу реагентов, условиям экстракции, методам очистки. Было показано что, при комнатной температуре эффективность выделения ДНК из цельной крови на 68% выше, чем из сухих пятен крови [15]. Со временем стабильность экстрагированной ДНК из образцов цельной крови значительно падает, в то время как качество ДНК, выделенной из DBS, остается прежним [17]. Тем не менее следует отметить, что ДНК, экстрагированная из DBS, выходит менее чистой из-за примесей в бумаге, чем ДНК, полученная из замороженной цельной крови [15]. В РФ представлено относительно небольшое количество наборов реагентов, предназначенных для выделения ДНК из сухих пятен крови, по сравнению с количеством наборов для получения ДНК из цельной крови. Возникает необходимость подбора наиболее доступного, качественного и наименее затратного по времени способа экстракции ДНК.

Целью нашей работы было проведение сравнительного анализа наборов реагентов для экстракции ДНК из сухих пятен крови.

Материалы и методы

В работе использовали 30 образцов сухой капли крови на картах Гатри, полученных от здоровых доношенных младенцев на 3-4 день жизни в рамках программы скрининга новорожденных. Все процедуры соответствовали этическим стандартам институционального и/или национального комитета по исследовательской этике и Хельсинкской декларации 1964 года и её последующим изменениям или сопоставимым нормам этики. Дизайн исследования был одобрен локальным этическим комитетом ФБУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера». Исследования проводили при письменном согласии родителей пациентов.

Для сравнительного анализа использовали ряд коммерческих наборов реагентов для выделения нуклеиновых кислот: «Экстра-ДНК-Био» («Алкор-био», Россия), «МагноПрайм ЮНИ» (ФБУН ЦНИИЭ, Россия), «ЭКСТРА-преп PS» (ФБУН НИИ им. Пастера, Россия). В каждом случае экстракцию ДНК осуществляли согласно инструкциям производителя без изменений или с некоторыми модификациями. Процесс экс-

тракции ДНК с использованием набора «Магно-Прайм ЮНИ» (ООО «НекстБио», Россия) был разделен на автоматическое и ручное выделение. При машинном выделении использовали прибор KingFisher Flex 24 (Thermo Scientific, США).

Пробоподготовку осуществляли следующим способом: в реакцию выделения ДНК брали 6 выбитых из DBS дисков диаметром 3 мм, полученных с использованием панчера DBS Puncher (PerkinElmer, Финляндия). Для каждого образца обойму/пул дисков готовили в четырех повторах, исходя из числа анализируемых наборов для экстракции ДНК.

Определение концентрации и чистоты ДНК

Концентрацию и чистоту ДНК измеряли на приборе NanoDrop One (Thermo Scientific, США). Соотношение A260/A280 показывало значение чистоты выделенной ДНК. Значения концентрации определяли при длине волны 280 нм. В качестве контроля использовали буфер для элюции ДНК, соответствующий каждому набору. Каждый образец измеряли трижды. Измерения проводили при комнатной температуре после достаточного перемешивания образцов.

Оценка эффективности выделения ДНК

Оценку эффективности выделения ДНК определяли методом ПЦР в режиме реального времени с гибридизационно-флуоресцентной детекцией с использованием набора реагентов TREC/KREC-AMP PS (ФБУН НИИ Пастера, Россия) [13]. ПЦР проводили на амплификаторе планшетного типа с функцией детекции флуоресценции в режиме реального времени по каналам FAM/Green, HEX/Yellow, Cy5/Red, ROX/Orange (CFX96, США). Эффективность экстракции оценивали по уровню молекул TREC и KREC на 10^5 клеток в параллелях выделения с использованием разных наборов.

Статистический анализ

Статистическую обработку данных проводили с помощью программного обеспечения GraphPad Prism 5 и Microsoft Excel 2010. Для оценки статистически значимых межгрупповых различий в уровнях анализируемых молекул (TREC и KREC) применяли критерий Краскела–Уоллиса и тест Данна.

Результаты и обсуждение

При сравнительном анализе наборов учитывали несколько критериев: эффективность экстракции ДНК, концентрацию и чистоту ДНК, простоту методики, продолжительность выделения, а также возможность автоматизации процесса. В качестве эталонного набора/набора сравнения использовали коммерческий набор реагентов «Экстра-ДНК-Био» («Алкор-био», Россия), получивший медицинское РУ в России,

предназначенный для экстракции ДНК из сложных образцов, включая сухие пятна крови, и обеспечивающий эффективный выход ДНК. В двух исследованных наборах для выделения ДНК – референсном «Экстра-ДНК-Био» («Алкор-био», Россия) и «ЭКСТРА-преп PS» (ФБУН НИИ им. Пастера, Россия) – агрегация нуклеиновых кислот (НК) основана на их спиртовом осаждении после этапа лизиса клеточных мембран. В протоколе работы набора реагентов «Магно-Прайм ЮНИ» (ООО «НекстБио», Россия) на биологический образец воздействуют лизирующим раствором в присутствии частиц магнитного сорбента. После деструкции клеточных мембран, растворенные НК связываются с частицами магнетизированной силики, и, после отмывки других компонентов лизата, элюируются в буферный раствор. Оба подхода зарекомендовали себя как достаточно простые методы выделения ДНК, удобные для рутинной лабораторной практики, поскольку не требуют больших затрат времени для получения чистого препарата ДНК, в том числе при работе с цельной кровью. Однако, при необходимости использования карт Гатри, как в случае неонатального скрининга, важно учитывать эффективность очистки препарата ДНК от волокон, попадающих с бумажных фильтров, и возможное влияние этих волокон на результат анализа. Полученные данные представлены в таблице 1.

Эффективность выделения показывает, насколько качественно и точно была проведена экстракция ДНК. Данный критерий зависит от многих факторов, таких как пробоподготовка, метод выделения, полученная концентрация и чистота ДНК. Эффективность выделения набора «ЭКСТРА-преп PS» (ФБУН НИИ им. Пастера, Россия) была близка к значениям выбранного нами эталонного набора «Экстра-ДНК-Био» («Алкор-био», Россия). Набор «МагноПрайм ЮНИ» (ФБУН ЦНИИЭ, Россия) показал значительную разницу выхода ПЦР-продукта и отличался от эталонного в 2–3 раза. Такое различие в данных можно объяснить разными принципами экстракции, применяемыми в наборах, основанных на сорбции НК магнитных частицах, и наборах, использующих щелочную экстракцию с поэтапным удалением примесей. Известно, что магнитные частицы обладают большой связывающей способностью к нуклеиновым кислотам, что позволяет минимизировать потери выхода ДНК [1]. Получение высокой концентрации при выделении набором «МагноПрайм ЮНИ» (ФБУН ЦНИИЭ, Россия) также может влиять на эффективность ПЦР. Несмотря на разный выход НК, продукты ПЦР образуются во всех случаях

ТАБЛИЦА 1. СРАВНЕНИЕ НАБОРОВ РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ЭКСТРАКЦИИ ДНК ИЗ СУХИХ ПЯТЕН КРОВИ

TABLE 1. COMPARISON OF REAGENT KITS FOR DNA EXTRACTION FROM DRIED BLOOD SPOTS

Параметры сравнения Comparison parameters	Экстра-ДНК-Био («Алкор-био», Россия) Extra-DNA-Bio, (Alcor-bio, Russia)	ЭКСТРА-преп PS (ФБУН НИИ им. Пастера, Россия) EXTRA-prep PS (Saint Petersburg Pasteur Institute)	МагноПрайм ЮНИ (ручное выделение) (ФБУН ЦНИИЭ, Россия) MagnoPrime UNI (manual extraction) (CRIE, Russia)	МагноПрайм ЮНИ (автомат) (ФБУН ЦНИИЭ, Россия) MagnoPrime UNI (automatic) (CRIE, Russia)
Эффективность анализа уровней TREC/KREC Efficiency of TREC/KREC level analysis	1 / 1	0,95 / 1,01	3,86 / 7,16	2,10 / 3,08
Чистота ДНК* DNA purity	2,2±0,23	1,89±0,23	2,31±0,21	2,85±0,09
Концентрация ДНК* DNA concentration*	15,28 мкг/мл 15.28 µg/mL	16,26 мкг/мл 16.26 µg/mL	62,5 мкг/мл 62.5 µg/mL	102,28 мкг/мл 102.28 µg/mL
Количество этапов Number of steps	4	4	5	5
Продолжительность выделения Duration of extraction	39 минут 39 minutes	39 минут 39 minutes	20 минут + 31 минуту про- бободготовка 20 minutes + 31 minutes sample preparation	40 минут + пробоподготовка 31 минуту 40 minutes + 31 minutes sample preparation
Продолжительность выделения из расчета на 30 образцов Duration of extraction per 30 samples	65 минут 65 minutes	65 минут 65 minutes	75 минут 75 minutes	40 минут + пробоподготовка 31 минуту 40 minutes + 31 minutes sample preparation
Автоматизация Automation	–	–	+	

Примечание. * – средняя чистота/концентрация ДНК, полученной при экстракции.

Note. *, average purity/concentration of DNA obtained by extraction.

выделения в достаточном количестве, необходи-
мом для анализа полученных данных.

Нуклеиновые кислоты имеют максимум по-
глощения при длине волны 260 нм, большинство
белков – при 280 нм. Отношение 260 нм к 280 нм
является показателем соотношения ДНК и бел-
ков в образце. Для чистых образцов ДНК соот-
ношение оптических плотностей полученных при
измерении 260 нм и 280 нм должно быть в диа-
пазоне 1,8-2. Значения отношения 260/280 нм
меньше 1,8 означает значительное присутствие
в образце белков или других молекул [16]. Кро-
ме того, остаточные примеси использовавших-
ся в ходе экстракции веществ, таких как фенол
или этанол, также снижают отношение A260 к
A280. В связи с этим остаточное химическое за-
грязнение в результате процедуры выделения
нуклеиновых кислот может привести к ложному
завышению концентрации нуклеиновых кислот
при анализе. Качество ДНК решающим образом

влияет на эффективность амплификации в ходе
последующей ПЦР. На обнаружение и, тем более,
количественный анализ специфических участков
ДНК может отрицательно сказаться фрагмента-
ция нуклеиновых кислот на этапе экстракции и
применение веществ, способных ингибировать
ПЦР. Кроме того, химические реагенты, исполь-
зуемые в процедуре выделения, способны сохра-
няться в виде загрязнителей. При оценке чистоты
НК, экстрагированных с использованием всех
четырех анализируемых наборов, можно было
наблюдать успешную депротеинизацию образ-
цов ДНК и относительную чистоту. Полученное
значение чистоты ДНК, выделенной реагентами
«ЭКСТРА-преп PS» (ФБУН НИИ им. Пасте-
ра, Россия) соответствовало всем требованиям
по этому критерию. Однако в образцах, выде-
ленных набором «МагноПрайм ЮНИ» (ФБУН
ЦНИИЭ, Россия) ручным способом и набором
«Экстра-ДНК-Био» («Алкор-био», Россия) зна-

чения чистоты находились в интервале от 2-2,3, что указывает на незначительные уровни загрязнения. Величина больше 1,9 может означать наличие РНК в пробе. Примеси, присутствующие в образцах, выделенные реагентами «МагноПрайм ЮНИ» (ФБУН ЦНИИЭ, Россия) на автоматической станции, можно объяснить тем, что магнитные частицы хорошо выделяют как ДНК, так и РНК, в то время как другие наборы предназначены для выделения только ДНК. Чистота ДНК, полученной при помощи наборов с ионообменниками, может превышать границу из-за присутствия в пробе как ДНК, так и РНК.

Концентрация выделенной НК может зависеть от времени обработки и состава буферных растворов на этапах лизиса и денатурации. Во всех проанализированных наборах мы получили концентрацию необходимую для проведения ПЦР-анализа. Максимальная концентрация ДНК была показана для автоматического выделения набором «МагноПрайм ЮНИ» (ФБУН ЦНИИЭ, Россия) и в среднем была равна 102,28 нг/мкл. Длительная пробоподготовка при экстракции НК реагентами «МагноПрайм ЮНИ» (ФБУН ЦНИИЭ, Россия) может влиять на больший выход ДНК, чем при выделении другими наборами.

С одной стороны, большое количество ДНК приводит к высокому уровню фоновой флуоресценции и/или неспецифическому образованию продуктов при ПЦР-РВ, что ведет к низкой эффективности ПЦР и получению ложных результатов. С другой стороны, использование малых концентраций ДНК ведет к разному количеству стартовых молекул в пробе, и при количественном анализе сотрудникам будет сложно оценить полученные данные [12]. На начальном этапе исследования важно определить концентрацию ДНК после выделения и оптимизировать ее уровень, исходя из дальнейших целей исследования.

В связи с вышесказанным, контроль эффективности экстракции нуклеиновых кислот разными наборами реагентов дополнительно осуществляли по результатам ПЦР в режиме реального времени, проведенной с каждой полученной ДНК-пробой, с применением тест-системы TREC/KREC-AMP PS (ФБУН НИИ Пастера, Россия). Набор реагентов для ПЦР-диагностики TREC/KREC-AMP PS позволяет амплифицировать в экстрагированной суммарной ДНК-пробе два эндогенных внутренних контроля. Одним из них является ген фермента пуринового обмена эукариот – гипоксантин-гуанин-фосфорибозил-трансферазы человека (HPRT), локализованный на длинном плече X-хромосомы. Вторым внутренним контролем реакции является ген белковой субъединицы р30 рибонуклеазы Р (RPP30), локализованный на хромосоме 10. Два этих гена

относят к так называемым генам домашнего хозяйства, работа которых необходима для жизнеобеспечения клетки, и для которых характерно постоянство представленности и экспрессии в разных клетках организма. Два эндогенных внутренних контроля позволяют оценить качество очистки образца ДНК в ходе его экстракции от интерферирующих веществ и ингибиторов ПЦР.

Тем не менее для оценки влияния способа выделения ДНК на конечный результат анализа нельзя опираться только на пороговый цикл C_q при амплификации контрольных генов, поскольку даже при соблюдении всех рекомендаций по пробоподготовке карт Гатри, количество клеток, попадающих в анализ, разнится от пробы к пробе. Набор реагентов для ПЦР-диагностики TREC/KREC-AMP PS позволяет рассчитывать количество ДНК-молекул TREC и KREC в суммарной экстрагированной ДНК-пробе, приходящихся на 10^5 клеток крови. Такой подход позволяет учитывать количество клеток, попадающих в пробирку при выделении ДНК.

Таким образом, оценка эффективности экстракции ДНК разными наборами реагентов, с применением тест-системы TREC/KREC-AMP PS позволяет оценить качество очистки ДНК-препаратов и сравнить результат ПЦР-анализа с учетом количества исходного материала и ошибок пипетирования на всех этапах анализа. Целесообразность использования набора TREC/KREC-AMP PS для оценки качества выделения ДНК с карт Гатри обусловлена еще и тем, что количественный анализ эксцизионных колец TREC и KREC с 2023 года входит в программу неонатального скрининга на территории России. При этом в ходе скрининга оценку уровней TREC и KREC осуществляют, используя кровь новорожденных, нанесенную на карты Гатри.

В ходе исследования для одного и того же биологического материала (сухого пятна крови на карте Гатри) ПЦР-анализ проводили четыре раза с использованием ДНК-проб, выделенных четырьмя разными способами/наборами. Таким образом, для одного новорожденного получали четыре значения уровня молекул TREC и четыре значения уровня молекул KREC в крови. Количественный результат определялся только системой выделения, поскольку все остальные этапы анализа для всех образцов были идентичными.

В реакциях со всеми образцами, независимо от протокола выделения, наблюдали нарастание флуоресцентных сигналов от двух генов внутреннего контроля, что говорит об эффективности очистки препарата от ингибиторов всеми четырьмя использованными наборами/способами. На рисунках 1 и 2 изображены диаграммы сравнения уровней TREC и KREC, соответственно, в

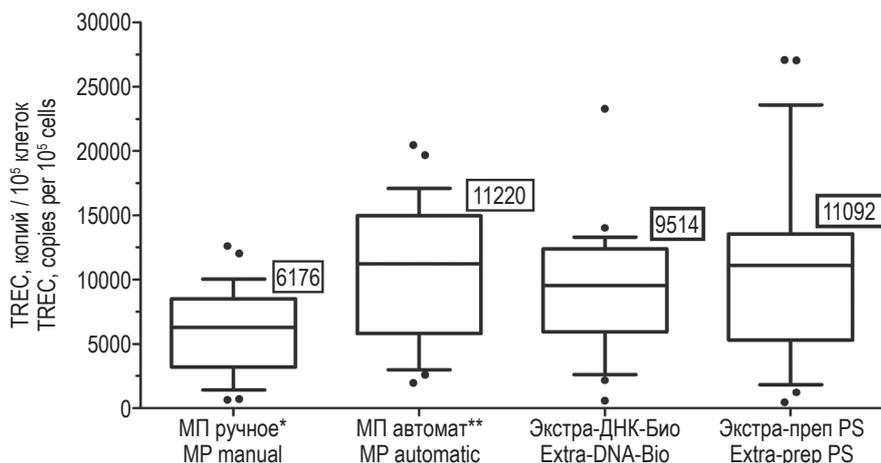


Рисунок 1. Диаграмма сравнения уровней молекул TREC в группах ДНК-образцов, выделенных разными наборами/способами

Примечание. Числами обозначены медианные значения TREC в группе. * – «МагноПрайм ЮНИ» ручное выделение, ** – «МагноПрайм ЮНИ» автоматическое выделение.

Figure 1. Diagram comparing the levels of TREC molecules in groups of DNA samples isolated by different kits/methods

Note. Numbers indicate median TREC values in the group. *, "MagnoPrime UNI" manual extraction, **, "MagnoPrime UNI" automatic extraction.

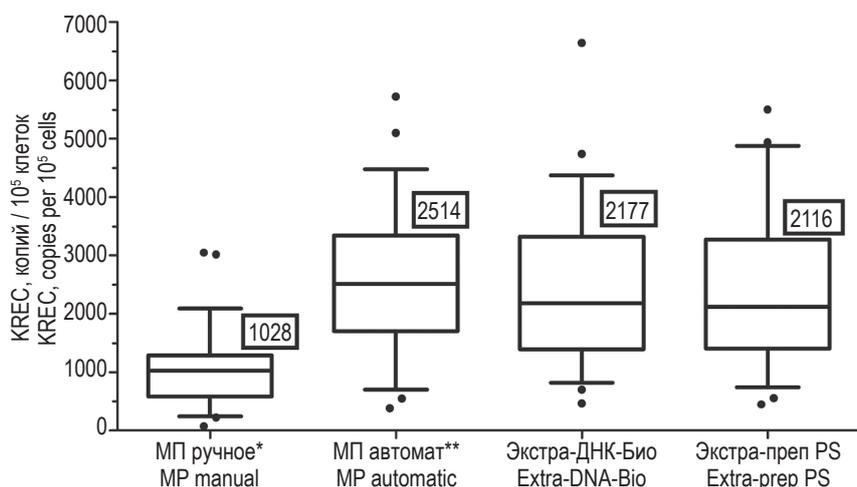


Рисунок 2. Диаграмма сравнения уровней молекул KREC в группах ДНК-образцов, выделенных разными наборами/способами

Примечание. Числами обозначены медианные значения KREC в группе. * – «МагноПрайм ЮНИ» ручное выделение, ** – «МагноПрайм ЮНИ» автоматическое выделение.

Figure 2. Diagram comparing the levels of KREC molecules in groups of DNA samples isolated by different kits/methods

Note. Numbers indicate median KREC values in the group. *, "MagnoPrime UNI" manual extraction, **, "MagnoPrime UNI" automatic extraction.

разных группах образцов ДНК, с указанием медианного значения в группе.

В таблицах 2 и 3 указаны минимальные, медианные и максимальные уровни TREC и KREC, соответственно, в разных группах ДНК-образцов, а также значения p-value при обнаружении статистически значимых различий в уровнях аналитов между группами.

Таким образом, согласно примененному критерию Краскела–Уоллиса и тесту Данна, значимые различия и по параметру TREC, и по параметру KREC присутствуют между группой образцов

ДНК, экстрагированных с использованием набора реагентов «МагноПрайм ЮНИ» при ручном выделении, с группами образцов, экстрагированных другими способами («МагноПрайм ЮНИ» при автоматическом выделении) или наборами «Экстра-ДНК-Био» и «ЭКСТРА-преп PS».

В качестве отдельного критерия следует рассматривать количество образцов, экстракция которых может осуществляться одновременно. В большинстве случаев количество проб определяется количеством ячеек в центрифуге. Как правило, в лабораториях используют центрифугу-

ТАБЛИЦА 2. УРОВНИ МОЛЕКУЛ TREC В КРОВИ НОВОРОЖДЕННЫХ ПРИ ВЫДЕЛЕНИИ ДНК РАЗНЫМИ НАБОРАМИ РЕАГЕНТОВ

TABLE 2. LEVELS OF TREC MOLECULES IN NEONATAL BLOOD DURING DNA EXTRACTION WITH DIFFERENT REAGENT KITS

	Уровень молекул TREC, копий/10 ⁵ копий Level of TREC molecules, copies/10 ⁵ copies			
	МагноПрайм ЮНИ (ручное выделение) MagnoPrime UNI (manual extraction)	МагноПрайм ЮНИ (автоматическое выделение) MagnoPrime UNI (automatic extraction)	Экстра-ДНК-Био Extra-DNA-Bio	ЭКСТРА-преп PS EXTRA-prep PS
	1	2	3	4
Minimum	643,7	1954	557,4	436,5
25% Percentile	2990	5811	5944	5278
Median	6176	11220	9514	11092
75% Percentile	8489	14967	12405	13542
Maximum	12598	20456	23272	27074

Примечание. Значения p-value при наличии значимых различий: $p_{1-2} = 0,0010$; $p_{1-3} = 0,0061$; $p_{1-4} = 0,0058$.

Note. p-values in the presence of significant differences: $p_{1-2} = 0.0010$; $p_{1-3} = 0.0061$; $p_{1-4} = 0.0058$.

ТАБЛИЦА 3. УРОВНИ МОЛЕКУЛ KREC В КРОВИ НОВОРОЖДЕННЫХ ПРИ ВЫДЕЛЕНИИ ДНК РАЗНЫМИ НАБОРАМИ РЕАГЕНТОВ

TABLE 3. LEVELS OF KREC MOLECULES IN NEONATAL BLOOD DURING DNA EXTRACTION WITH DIFFERENT REAGENT KITS

	Уровень молекул KREC, копий/10 ⁵ копий Level of KREC molecules, copies/10 ⁵ copies			
	МагноПрайм ЮНИ (ручное выделение) MagnoPrime UNI (manual extraction)	МагноПрайм ЮНИ (автоматическое выделение) MagnoPrime UNI (automatic extraction)	Экстра-ДНК-Био Extra-DNA-Bio	ЭКСТРА-преп PS EXTRA-prep PS
	1	2	3	4
Minimum	72,90	379,7	459,8	443,1
25% Percentile	580,6	1698	1393	1409
Median	1028	2514	2177	2116
75% Percentile	1288	3342	3316	3273
Maximum	3047	5716	6637	5497

Примечание. Значения p-value при наличии значимых различий: $p_{1-2} < 0,0001$; $p_{1-3} < 0,0001$; $p_{1-4} < 0,0001$.

Note. p-values in the presence of significant differences: $p_{1-2} < 0.0001$; $p_{1-3} < 0.0001$; $p_{1-4} < 0.0001$.

ги на 12 или 24, в редких случаях на 48 образцов. С количеством образцов в работе и с количеством ячеек в центрифуге связана продолжительность экстракции ДНК, так как оператор, осуществляющий процесс, проводит длительные этапы, не имеющие конкретной протяженности времени, указанной в инструкции. В связи с вышесказанным, метод ручного выделения занимает больше времени, а максимальное количество образцов не может превышать 48. Такие наборы как «Магно-Прайм ЮНИ» (ФБУН ЦНИИЭ, Россия) имеют существенное преимущество за счет возможности при использовании автоматических станций выделения экстрагировать ДНК из большого количества проб за короткое время. Как правило,

масштаб работ в научных целях и в целях клинико-лабораторной диагностики сильно отличается. Чаще всего необходимость таких объемов возникает в лабораторной диагностике при большой рутинной загрузке.

При молекулярно-генетических исследованиях во время неонатального скрининга качество и целостность ДНК имеет большое значение для достоверности результатов. Значительное количество способов экстракции нуклеиновых кислот из различного биологического материала, включая сухую каплю крови, используемые в практике научных лабораторий для получения ДНК высокой концентрации и чистоты, например, методы на основе фенола и хлороформа, обычно

трудно стандартизируемы и требуют много времени, что усложняет применение таких методов в рутинной лабораторной диагностике. В этом контексте коммерческие наборы удобны и для научных, и для рутинно-диагностических исследований, поскольку просты в использовании и имеют стандартизированные экономиящие время протоколы.

Заключение

В ходе настоящего исследования все четыре набора реагентов для экстракции ДНК из сухой капли крови продемонстрировали высокий уровень сходимости полученных данных, удовлетворяя всем необходимым параметрам для проведения дальнейшего молекулярно-генетического

анализа. Различия в показателях могут быть связаны с особенностями наборов и не являются существенными. Наборы «МагноПрайм ЮНИ» (ФБУН ЦНИИЭ, Россия), «ЭКСТРА-преп PS» (ФБУН НИИ им. Пастера, Россия), «Экстра-ДНК-Био» («Алкор-био», Россия) позволяют получить ДНК надлежащего качества и чистоты для проведения информативного неонатального скрининга, а также могут быть использованы в других областях исследований, требующих экстракции ДНК из сухой капли крови. Указанные наборы могут успешно применяться в практике лабораторной диагностики с одинаковым уровнем информативности и надежности.

Финансирование исследования

Работа не имела финансовой поддержки.

Список литературы / References

1. Аукунов Н.Е., Масабаяева М.Р., Хасанова У.У. Выделение и очистка нуклеиновых кислот. Состояние проблемы на современном этапе // Наука и здравоохранение, 2014. № 1. С. 51-53. [Aukenov N.E., Masabaeva M.R., Hasanova U.U. Isolation and purification of nucleic acids. State of the problem at the present stage. *Nauka i zdravoohranenie = Science and Healthcare*, 2014, no. 1, pp. 51-53. (In Russ.)]
2. Воронин С.В., Куцев С.И. Неонатальный скрининг на наследственные заболевания в России: вчера, сегодня, завтра // Неонатология: Новости. Мнения. Обучение, 2022. Т. 10, № 4. С. 34-39. [Voronin S.V., Kutsev S.I. Neonatal screening for hereditary diseases in Russia: yesterday, today, and tomorrow. *Neontologia: Novosti. Mneniya. Obuchenie = Neonatology: News, Opinions, Training*, 2022, Vol. 10, no. 4, pp. 34-39. (In Russ.)]
3. Габдуллина Д.М., Усенова О.П., Моренко М.А., Ковзель Е.Ф. Первичные иммунодефициты: современные подходы в диагностике и терапии // Клиническая медицина Казахстана, 2016. № 1. С. 12-15. [Gabdullina D.M., Ussanova O.P., Morenka M.A., Kovzel E.F. Primary immunodeficiency: modern approaches to diagnosis and therapy. *Clinicheskaya meditsina Kazakhstana = Clinical Medicine of Kazakhstan*, 2016, no. 1, pp. 12-15. (In Russ.)]
4. Григорьев К.И., Харитонов Л.А., Радзинский В.Е., Папышева О.В., Котайш Г.А. Перинатальная медицина и проблемы неонатального скрининга // Медицинская сестра, 2017. № 4. С. 3-9. [Grigoryev K.I., Kharitonova L.A., Radzinsky V.E., Papyшева O.V., Kotaish G.A. Perinatal medicine and problems of newborn screening. *Meditsinskaya sestra = Nurse*, 2017, no. 4, pp. 3-9. (In Russ.)]
5. Дерябина С.С., Тузанкина И.А., Власова Е.В., Болков М.А., Шершнёв В.Н. Неонатальный скрининг на тяжелую комбинированную иммунную недостаточность в России: прекрасное далеко или завтрашняя реальность? // Вопросы современной педиатрии, 2017. Т. 16, № 1. С. 59-66. [Deryabina S.S., Tuzankina I.A., Vlasova E.V., Bolkov M.A., Shershnev V.N. Neonatal screening for severe combined immune deficiency in Russia: Glorious future or tomorrow's reality? *Voprosy sovremennoy pediatrii = Issues of Modern Pediatrics*, 2017, Vol. 16, no. 1, pp. 59-66. (In Russ.)]
6. Долудин Ю.В., Лимонова А.С., Козлова В.А., Ефимова И.А., Борисова А.Л., Мешков А.Н., Покровская М.С., Драпкина О.М. Сбор и хранение ДНК-содержащего биоматериала и выделенной ДНК // Кардиоваскулярная терапия и профилактика, 2020. Т. 19, № 6. С. 196-204. [Doludin Yu.V., Limonova A.S., Kozlova V.A., Efimova I.A., Borisova A.L., Meshkov A.N., Pokrovskaya M.S., Drapkina O.M. Collection and storage of DNA-containing biomaterial and isolated DNA. *Kardiovasculyarnaya terapiya i profilaktika = Cardiovascular Therapy and Prevention*, 2020, Vol. 19, no. 6, pp. 196-204. (In Russ.)]
7. Карева М.А., Орлова Е.М. Аденогенитальный синдром: прошлое, настоящее и будущее // Проблемы эндокринологии, 2011. Т. 57, № 1. С. 66-70. [Kareva M.A., Orlova E.M. Adrenogenital syndrome: past, present, and future. *Problemy endokrinologii = Problems of Endocrinology*, 2011, Vol. 57, no. 1, pp. 66-70. (In Russ.)]
8. Лепесова М.М., Ушакова Т.С., Мырзалива Б.Д. Дифференциальная диагностика спинальной мышечной амиотрофии первого типа // Наука о жизни и здоровье, 2016. № 1. С. 38-46. [Lepessova M.M., Ushakova T.S., Myrzaliyeva B.D. Differential diagnosis of the spinal muscular amyotrophy type one. *Nauka o zhizni i zdorovie = Life and Health Science*, 2016, no. 1, pp. 38-46. (In Russ.)]
9. Никифорова А.И., Абрамов Д.Д., Зобкова Г.Ю., Горяинова А.В., Семькин С.Ю., Шубина Е., Донников А.Е., Трофимов Д.Ю. Определение мутаций гена CFTR у детей с муковисцидозом // Вестник Росийского государственного медицинского университета, 2018. № 3. С. 35-41. [Nikiforova A.I., Abramov D.D., Zobkova G.Y., Goriainova A.V., Semykin S.Y., Shubina J., Donnikov A.E., Trofimov D.Y. Detection of CFTR mutations in children with cystic fibrosis. *Vestnik Rossiiskogo gosudarstvennogo meditsinskogo universiteta = Bulletin of Russian State Medical University*, 2018, no. 3, pp. 35-41. (In Russ.)]
10. Образцов И.В., Фёдорова Л.А., Продеус А.П., Кудлай Д.А., Корсунский И.А. Референсные значения концентрации TREC и KREC у детей и подростков в возрасте 1-17 лет // Педиатрия им. Г. Н. Сперанского,

2021. T.100, № 6. С. 38-45. [Obraztsov L.A. Fedorova A.P. Prodeus D.A. Kudlay I.A. Korsunsky. Reference values for the concentration of TREC and KREC in children aged 1-17 years. *Pediatrics. Zhurnal im. G.N. Speransky = Pediatrics. Journal n. a. G.N. Speransky*, 2021, Vol. 100, no. 6, pp. 38-45. (In Russ.)]

11. Петеркова В.А., Безлепкина О.Б., Ширяева Т.Ю., Вадина Т.А., Нагаева Е.В., Чикулаева О.А., Шредер Е.В., Конюхова М.Б., Макрецкая Н.А., Шестопалова Е.А., Митькина В.Б. Клинические рекомендации «Врожденный гипотиреоз» // Проблемы эндокринологии, 2022. Т. 68, № 2. С. 90-103. [Peterkova V.A., Bezlepina O.B., Shiryaeva T.U., Vadina T.A., Nagaeva E.V., Chikulaeva O.A., Shreder E.V., Konuhova M.B., Makretskaya N.A., Shestopalova E.A., Mitkina V.B. Clinical guideline of “Congenital hypothyroidism”. *Problemi endokrinologii = Problems of Endocrinology*, 2022, Vol. 68, no. 2, pp. 90-103. (In Russ.)]

12. Ребриков Д.В., Трофимов Д.Ю. ПЦР «В реальном времени»: подходы к анализу данных (обзор) // Прикладная биохимия и микробиология, 2006. Т. 42, № 5. С. 520-528. [Rebrikov D.V., Trofimov D.Yu. Real-time PCR: a review of approaches to data analysis. *Prikladnaya biokhimiya i microbiologia = Applied Biochemistry and Microbiology*, 2006, Vol. 42, no. 5, pp. 520-528. (In Russ.)]

13. Сайдгалина М.А., Останкова Ю.В., Любимова Н.Е., Семенов А.В., Кузнецова Р.Н., Тотолян А.А. Модифицированный метод количественного определения уровней TREC и KREC в периферической крови у больных с иммунодефицитными состояниями // Инфекция и иммунитет, 2022. Т. 12, № 5. С. 981-996. [Saitgalina M.A., Ostankova Y.V., Liubimova N.E., Semenov A.V., Kuznetsova R.N., Totolian A.A. Modified quantitative approach for assessing peripheral blood TREC and KREC levels in immunodeficient patients. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2022, Vol. 12, no. 5, pp. 981-996. (In Russ.)] doi: 10.15789/2220-7619-MMF-2039.

14. Anderson S. GALT deficiency galactosemia. *MCN Am. J. Matern. Child Nurs.*, 2018, Vol. 43, no. 1, pp. 44-51.

15. Choi E.H., Lee S.K., Ihm C., Sohn Y.H. Rapid DNA extraction from dried blood spots on filter paper: potential applications in biobanking. *Osong Public Health and Res. Perspect.*, 2014, Vol. 5, no. 6, pp. 351-357.

16. Lucena-Aguilar G., Sanchez-Lopez A.M., Barberan-Aceituno C., Carrillo-Ávila J.A., Lopez-Guerrero J.A., Aguilar-Quesada R. DNA Source Selection for Downstream Applications Based on DNA Quality Indicators Analysis. *Biopreserv. Biobank.*, 2016, Vol. 14, no. 4, pp. 264-270.

17. Mas S., Crescenti A., Gasso P., Vidal-Taboada J.M., Lafuente A. DNA cards: determinants of DNA yield and quality in collecting genetic samples for pharmacogenetic studies. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.*, 2007, Vol. 101, no. 2, pp. 132-137.

18. Nikiforova A.I., Abramov D.D., Kadochnikova V.V., Zobkova G.U., Ogurtsova K.A., Brjuhanova N.O., Shestopalova E.A., Kochetkova T.O., Shubina E.S., Donnikov A.E., Trofimov D.Y. Determining the frequency of PAH mutations in Moscow region residents with phenylketonuria using a combination of real-time PCR and next-generation sequencing. *Bulletin of Russian State Medical University*, 2017, no. 4, pp. 38-44.

Авторы:

Седых А.В. — младший научный сотрудник лаборатории молекулярной иммунологии ФБУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера», Санкт-Петербург, Россия

Сайдгалина М.А. — младший научный сотрудник лаборатории молекулярной иммунологии 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

Тотолян 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:

Sedykh A.V., Junior Research Associate, Laboratory of Molecular Immunology, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation

Saitgalina M.A., Junior Research Associate, Laboratory of Molecular Immunology, St. 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 St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, 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

ПРАВИЛА ДЛЯ АВТОРОВ

Статьи представляются в редакцию через систему электронного издательства (<http://mimmun.ru>) в соответствии с требованиями журнала «Медицинская иммунология» и «Инструкцией по подготовке и отправке статьи», представленной на сайте.

С 2016 г. в журнале публикуются статьи на русском и на английском языках.

В журнал принимаются следующие виды публикаций:

Оригинальная статья

Статья должна описывать результаты законченного исследования. Допускается объем статьи до 20 машинописных страниц, включая рисунки, таблицы. Статья должна содержать: 1) введение; 2) материалы и методы; 3) результаты исследований; 4) обсуждение результатов; 5) благодарности.

- **Введение** содержит обоснование цели и задач проведенного исследования.
- **Материалы и методы** могут излагаться в виде отдельных фрагментов с короткими подзаголовками. Все нетрадиционные модификации методов должны быть описаны с достаточной степенью подробности. Для всех используемых в работе реактивов, животных, клеточных культур и т. д. необходимо точно указывать производителей и/или источники получения (с названиями страны, фирмы, института).
- **Результаты** описываются в логической последовательности в виде отдельных фрагментов, разделенных подзаголовками, без элементов обсуждения, без повторения методических подробностей, без дублирования цифровых данных, приведенных в таблицах и рисунках.
- В **обсуждении** проводится детальный анализ полученных данных в сопоставлении с данными литературы, что служит обоснованием выводов и заключений авторов.
- Раздел «**Благодарности**» не является обязательным, но крайне желателен. В этом разделе авторы могут выразить признательность организации, субсидировавшей проведение исследований, коллегам, консультировавшим работу в процессе ее выполнения и/или написания, а также техническому персоналу за помощь в выполнении исследований. Благодарности за предоставление специфических реактивов или оборудования, как правило, помещаются в разделе «Материалы и методы».

Краткие сообщения

Журнал публикует небольшие по объему статьи, которые имеют безусловную новизну и значимость. Эти статьи проходят ускоренное рецензирование и публикуются в короткие сроки. Общий объем краткого сообщения ограничен 8 машинописными страницами, количество рисунков и/или таблиц не может быть более 3, а список использованных литературных источников не должен превышать 15. Титульный лист оформляется, как описано выше.

Разделы краткого сообщения аналогичны вышеописанным разделам оригинальной статьи, но не выделяются заголовками и подзаголовками, результаты могут быть изложены вместе с обсуждением.

Обзорные статьи и лекции

Обзорные статьи и лекции в основном заказываются редакцией или могут быть рекомендованы одним из членов редколлегии. Более подробную информацию о правилах оформления этих статей можно узнать в редакции

Библиографические стандарты описания цитируемых публикаций

Описание статьи из журнала:

Варюшина Е.А., Александров Г.В., Сазонова Т.А., Симбирцев А.С. Изучение влияния местного применения рекомбинантного человеческого интерлейкина-1 β на репарацию язвенных повреждений слизистой оболочки желудка // Цитокины и воспаление, 2012. Т. 11, № 1. С. 64-69. [Varyushina E.A., Alexandrov G.V., Sazonova T.A., Simbirtsev A.S. Study of the effect of local application of recombinant human interleukin-1 β in the repair of ulcerative lesions of gastric mucosa. *Tsitokiny i vospalenie = Cytokines and Inflammation*, 2012, Vol. 11, no. 1, pp. 64-69. (In Russ.)]

Описание статьи из книги (монографии):

Соколова Г.Н., Потапова В.Б. Клинико-патогенетические аспекты язвенной болезни желудка. М.: Анахарсис, 2009. 328 с. [Sokolova G.N., Potapova V.B. Clinical and pathogenetic aspects of gastric ulcer. Moscow: Anacharsis, 2009. 328 p.]

Примеры правильного оформления англоязычных ссылок:

Wells S.M., Kantor A.B., Stall A.M. CD43(S7) expression identifies peripheral B-cell subsets. *J. Immunol.*, 1994, Vol. 153, no. 12, pp. 5503-5515.

Goodman J.W., Parslow T.G. Immunoglobulin proteins. Basic and Clinical Immunology. Ed. Stites D.P., Terr A.I., Parslow T.G., Appleton and Lange, 1994, pp. 66-79.

Ссылки на литературные источники в тексте статьи, в рисунках и таблицах обозначаются арабскими цифрами в квадратных скобках [1, 2, 3,...]. не допускаются ссылки на диссертации, авторефераты диссертаций, публикации в сборниках, методические документы местного уровня. Количество источников не ограничено. В каждой ссылке приводятся все авторы работы. Неопубликованные статьи в список не включаются.

Обозначения, сокращения и единицы измерения

Для сложных терминов или названий, наиболее часто используемых в тексте статьи, можно ввести (в круглых скобках после первого упоминания полного названия термина) не более 3–5 нетрадиционных сокращений. Узаконенные международными номенклатурами сокращения используются в соответствующей транскрипции. Например, для термина «интерлейкин» используется сокращение «IL»,

а не русскоязычный вариант «ИЛ»; аналогично этому используются сокращения: «TNF», а не «ТНФ» или «ФНО»; «CD», а не «СД». Названия микроорганизмов приводятся в оригинальной транскрипции с использованием курсива (*E. coli*, *Streptococcus pyogenes*). Единицы измерения приводятся без точки после их сокращенного обозначения (с, ч, см, мл, мг, kDa и т.д.), регламентированного международными правилами.

Оформление иллюстративного материала

Иллюстративный материал должен быть оригинальным, то есть ранее нигде не опубликованным. Общее количество иллюстраций (таблиц и рисунков) не должно превышать восьми. При большем количестве иллюстраций их публикация оплачивается автором. Публикация цветных иллюстраций (независимо от их количества) также оплачивается автором. Весь иллюстративный материал присылается в двух экземплярах и на диске в виде отдельных файлов.

Размеры иллюстраций:

- максимальная высота – 210 мм
- максимальная ширина для 1 столбца – 82 мм, для 2 столбцов – 170 мм

Таблицы. Каждая таблица печатается на отдельном листе (в отдельном файле на диске) через 2 интервала. Нумерация таблиц дается арабскими цифрами отдельно от нумерации рисунков (графиков и фотографий). Название печатается над таблицей. Весь текст на русском языке, содержащийся в таблице, включая единицы измерения, должен быть переведен на английский язык; при этом перевод следует помещать в ячейку с соответствующим русским текстом отдельной строкой. Название таблицы и текст примечания к ней также должны быть переведены на английский язык и приведены под русским текстом с новой строки. Для пометок в таблицах следует использовать одну или несколько (*). Пояснения печатаются после соответствующего количества (*) под таблицей. Единицы измерения, при необходимости, включаются в заголовки строк или столбцов.

Рисунки (графики и фотографии). В тексте статьи названия рисунков (графиков, фотографий) и таблиц размещаются сразу после абзаца, где на них дается первая ссылка. Все рисунки нумеруются последовательно арабскими цифрами по мере их использования в тексте статьи. Названия рисунков и подписи к ним выносятся в виде списка на отдельную страницу. В списке указываются: номер рисунка, название (с большой буквы), текст примечаний (для микрофотографий должно быть указано увеличение). Подписи к рисункам даются краткие, но достаточно информативные. Названия рисунков и примечаний к ним, нарисовочные подписи, текст легенды должны быть переведены на английский язык и размещены под соответствующим текстом с новой строки. На обороте каждой иллюстрации подписывается фамилия первого автора, название статьи и порядковый номер. Для публикации в журнале принимаются только оригиналы фотографий (не ксерокопии) хорошего качества, максимально приближенные к вышеуказанным размерам.

Фотографии не должны иметь больших полей, т. е. фотографический материал должен занимать всю площадь фотографии. Рисунки могут быть представлены в графических форматах с расширением .tiff (разрешение не менее 300 dpi при 100% масштабе), .eps или .ai. Изображения, встроенные в документы Word, не принимаются. Графики и диаграммы предоставляются вместе с таблицами, на основе которых они были созданы, или с численными обозначениями показателей, отображаемых соответствующими графическими элементами (столбиками, секторами и т.п.) в виде файлов с расширениями .doc или, предпочтительнее, .xls.

Плата за публикацию статей

При соблюдении правил публикация статей в журнале «Медицинская иммунология» является бесплатной для авторов и учреждений, в которых они работают. Редакция может потребовать оплату в следующих случаях: 1) за публикацию цветных иллюстраций; 2) при большом количестве иллюстративного материала (свыше 8 иллюстраций).

Подготовка статей

Для представления статьи авторы должны подтвердить нижеследующие пункты. Статья может быть отклонена, если она им не соответствует.

- А. Направляя статью в журнал, авторы гарантируют, что поданные материалы не были ранее опубликованы полностью или по частям, в любой форме, в любом месте или на любом языке. Также авторы гарантируют, что статья не представлена для рассмотрения и публикации в другом журнале. С момента принятия статьи к печати в журнале «Медицинская иммунология» приведенный в ней материал не может быть опубликован авторами полностью или по частям в любой форме, в любом месте и на любом языке без согласования с руководством журнала. Исключением может являться: 1) предварительная или последующая публикация материалов статьи в виде тезисов или короткого резюме; 2) использование материалов статьи как части лекции или обзора; 3) использование автором представленных в журнал материалов при написании диссертации, книги или монографии. Воспроизведение всего издания или части любым способом запрещается без письменного разрешения издателей. Нарушение закона будет преследоваться в судебном порядке. Охраняется Законом РФ № 5351-1 «Об авторском праве и смежных правах» от 09.07.93 г.
- Б. Файл отправляемой статьи представлен в формате .doc, .docx, .rtf.
- В. Помимо файла со статьей, предоставлены следующие файлы:
 - 1) Файл с метаданными (при загрузке в систему ему присваивается имя «Метаданные»):
 - Фамилия, имя, отчество, ученая степень, ученое звание, должность автора, ответственного за дальнейшую переписку с редакцией (на русском и английском языках).
 - Название учреждения, где работает ответственный автор (в русском и официально принятом английском вариантах).

- Почтовый адрес для переписки с указанием почтового индекса (на русском и английском языках).
 - Телефон, факс (с указанием кода страны и города), e-mail.
 - Фамилия и инициалы остальных соавторов, их ученые степени, ученые звания, должности.
 - Полное название статьи, направляемой в редакцию.
 - Количество страниц текста, количество рисунков, количество таблиц.
 - Указать, для какого раздела журнала предназначена работа: оригинальные статьи, лекции, обзоры, «точка зрения», краткие сообщения, новые иммунологические методы, случаи из практики, дневник иммунолога, книжное обозрение.
 - Дата отправления работы.
- 2) Отсканированная копия файла с метаданными, подписанная всеми авторами (при загрузке в систему ему присваивается имя «Подписи авторов»)
- 3) Титульный лист (при загрузке в систему ему присваивается имя «Титульный лист»), по форме:
- название статьи (без использования каких-либо сокращений) (на русском и английском языках);
 - Фамилия, имя, отчество, ученая степень, ученое звание, должность всех авторов (полностью) (на русском и английском языках);
 - подразделение и учреждение, в котором выполнялась работа (если в работе участвовали авторы из разных учреждений, это должно быть отмечено звездочками) (в русском и официально принятом английском вариантах);
 - сокращенное название статьи для верхнего колонтитула (не более 35 символов, включая пробелы и знаки препинания) (на русском и английском языках);
 - не менее 6 ключевых слов на русском и английском языках;
 - адрес для переписки с указанием телефона, номера факса и адреса e-mail.
- 4) Резюме (при загрузке в систему ему присваивается имя «Резюме»). Предоставляется в виде одного абзаца без ссылок и специфических сокращений. Объем — не менее 300 слов. Резюме в полном объеме представляется также в переводе на английский язык. В отдельных случаях, по решению редакционной коллегии, может быть затребован развернутый вариант резюме на английском языке.
- 5) Рисунки, если они есть - каждый отдельным файлом (при загрузке в систему каждому рисунку присваивается имя «Рисунок. Название рисунка (где название рисунка соответствует содержанию в файле рисунку. Порядковый номер рисунка)»)

6) Файл в формате .doc, .docx, rtf, с названиями рисунков

7) Таблицы, если они есть - каждая отдельным файлом (Название каждой таблицы должно быть приведено заголовком в файле с самой таблицей)

8) Файл с цитируемой литературой (при загрузке в систему ему присваивается имя «Литература»), по следующей форме: таблица из четырех столбцов (альбомная ориентация), где:

Порядковый номер ссылки	Авторы, название публикации и источника, где она опубликована, выходные данные	ФИО, название публикации и источника на английском	Полный интернет-адрес (URL) цитируемой статьи
Размещаются в таблице в алфавитном порядке, вначале русскоязычные, затем на языках с латинской графикой	Указывать по библиографическому стандарту, представленному выше	Официальное англоязычное название публикации и источника, где она опубликована - для русскоязычных статей. В редких случаях, когда не существует официальных англоязычных названий (это возможно для таких типов публикаций, как тезисы, книги и др.) - редакция просит предоставить их перевод, используя красный цвет шрифта. Для англоязычных публикаций и источников в этом столбце ставится прочерк	В том случае, если информация о статье не размещена на официальном сайте издания, допустимо использовать URL статьи со сторонних сайтов, в том числе системы www.e-library.ru

Текст должен быть набран с одинарным межстрочным интервалом; используется кегль шрифта в 14 пунктов; для выделения используется курсив, а не подчеркивание; все ссылки на иллюстрации, графики и таблицы расположены в соответствующих местах в тексте, а не в конце документа.

Текст соответствует стилистическим и библиографическим требованиям.

Если вы отправляете статью в рецензируемый раздел журнала, то вы согласны с требованиями слепого рецензирования, подробнее о котором можно узнать на сайте журнала (<http://mimmun.ru>) из рубрики **Рецензирование**, в разделе **«О Журнале»**.

Вы можете оформить подписку на журнал «Медицинская иммунология» через отделения связи: Каталог «УРАЛ-ПРЕСС» — индекс 42311. Подписка на электронную версию журнала на сайте www.elibrary.ru

АВТОРСКИЙ УКАЗАТЕЛЬ

Агарков Н.М.....	1417	Камший А.А.	1299	Сайтгалина М.А....	1441, 1453	Яцков И.А.....	1299
Агзамова Ю.М.....	1299	Кобылянский В.И.	1307	Седых А.В.	1441, 1453	Bochkova M.S.....	1329
Аутеншлюс А.И.....	1407	Колобов А.А.	1395	Селедцов В.И.	1319	Hamed Ebrahimzadeh	
Афридонова З.Э.	1431	Колыганова Т.И.	1363	Селедцова Г.В.	1319	Leylabadlo.....	1389
Баторов Е.В.....	1353	Леплина О.Ю.	1353	Семикина Е.Л.....	1431	Kolyadich J.V.....	1343
Бекпергенова А.В.....	1371	Маркушин С.Г.....	1363	Сенникова С.В.	1395	Kropaneva M.D.	1329
Белоглазов В.А.	1299	Микрюкова Н.В.....	1289	Симбирцев А.С.	1395	Marozava N.A.	1343
Боброва З.В.....	1423	Михайлова Е.С.....	1407	Сметаненко Е.А.	1353	Nizheharodava D.B.....	1343
Боголюбова А.В.....	1431	Мягкова М.А.	1423	Студеникина А.А.	1407	Parvin Sarbakhsh.....	1389
Бондаренко Т.А.	1371	Негребецкий В.А.....	1417	Татаурщикова Н.С.	1277	Rayev M.B.....	1329
Бухарин О.В.....	1371	Нестерова И.В.	1277	Тихонова М.А.	1353	Reza Ghotaslou.....	1389
Вараксин Н.А.	1407	<u>Никифоров И.А.</u>	1371	Топтыгина А.П.....	1395, 1431	Sevda Zoghi.....	1389
Гаврилова М.В.	1363	Останкова Ю.В.	1441, 1453	Тотоян Арег А.	1441, 1453	Shardina K.Yu.	1329
Доржиева А.Б.	1319	Пасман Н.М.	1353	Хонина Н.А.	1353	Sina Hamzehzadeh.....	1389
Жернакова Н.И.....	1417	Перепечаева М.Л.	1407	Чайникова И.Н.	1371	Timganova V.P.	1329
Зайцева Т.А.	1363	Перунова Н.Б.	1371	Челпаченко О.Е.	1371	Uzhviyuk S.V.....	1329
Иванова Е.В.....	1371	Петроченко С.Н.....	1423	Черных Е.Р.....	1353	Zafranskaya M.M.....	1343
Калинина Н.М.....	1289	Ртищев А.А.	1363	Шатунова П.О.....	1363	Zamorina S.A.....	1329

ПРЕДМЕТНЫЙ УКАЗАТЕЛЬ

адаптивная медицинская иммунология.....	1278	кишечные микросимбиоты.....	1372	системный мастоцитоз.....	1290
активные формы кислорода.....	1320	клеточный иммунитет.....	1432	спортивная деятельность.....	1424
ангиотензин.....	1424	коронавирус.....	1299	сухие пятна крови.....	1442, 1454
антитела.....	1389	коррекция иммунной системы ..	1278	Табриз.....	1389
артериальная гипертензия.....	1424	лимфоидные клетки.....	1344	топические препараты.....	1396
аэрозоль.....	1308	методы многомерной статистики.....	1372	триптаза.....	1290
беременность.....	1354	микроРНК.....	1408	тройной негативный рак.....	1408
брадикинин.....	1424	молекулярные подтипы.....	1408	тучные клетки.....	1290
венозная кровь.....	1396	моноклональные антитела.....	1308	химиолучевая терапия.....	1320
вирус гриппа птиц.....	1364	натуральные киллеры.....	1364	хроническая крапивница.....	1290
воспаление.....	1299, 1308	нейроиммуноэндокринный комплекс.....	1278	цитокины.....	1308, 1396, 1408
выделение ДНК.....	1454	неонатальный скрининг	1442, 1454	цитокины крови.....	1418
гибридный иммунитет.....	1432	окислительный стресс.....	1320	цитостатики.....	1308
гипербарическая оксигенация ...	1320	опухолевое микроокружение.....	1320	цитотоксические лимфоциты	1432
гипоксия.....	1320	опухоли околоносовых пазух.....	1344	экспрессия.....	1299
гистамин.....	1424	опухоли полости носа.....	1344	эубиоз.....	1372
гликоделин.....	1330	опухоль.....	1320	CCR6 ⁺ Т-хелперы.....	1330
глюкокортикоидные гормоны ...	1396	ошибки взятия материала.....	1442	CD8 ⁺	1432
грипп.....	1364	первичные иммунодефициты	1454	COVID-19.....	1299, 1308, 1418
дисбиоз.....	1372	пожилой возраст.....	1418	CTLA-4 чек-поинт молекулы.....	1354
дофамин.....	1424	полиморфизм.....	1299	ELISpot.....	1432
естественные антитела.....	1424	преаналитический этап.....	1442	<i>Helicobacter pylori</i>	1389
изопентенил пирофосфат.....	1344	преэклампсия.....	1354	IFN γ	1344
иммунодефицит.....	1278	провоспалительные цитокины... 1372		IL-17.....	1330, 1344
иммунозависимые заболевания .	1278	прорывной иммунитет.....	1432	KREC.....	1454
иммунорегуляция.....	1364	противовоспалительные цитокины.....	1372	miR-181a.....	1408
иммуносупрессоры.....	1308	псориаз.....	1396	miR-25.....	1408
иммунотерапия.....	1320	пуриnergическая регуляция.....	1308	РАЕР.....	1330
иммуоферментный анализ.....	1418, 1424	рак молочной железы.....	1408	PP14.....	1330
инвазивная карцинома неспецифического типа.....	1408	ранний период выздоровления ..	1418	SARS-CoV-2.....	1432
ингибиторные PD-1.....	1354	расстройство активации тучных клеток.....	1290	Th17.....	1330
ингибиторы кальциневрина.....	1308	регуляторные Т-клетки.....	1308	TIM-3.....	1354
интеграционная программа.....	1278	рецепторный антагонист IL-36 ...	1396	TLR.....	1299
Иран.....	1389	САТК.....	1290	TREC.....	1454
истощение Т-лимфоцитов.....	1364	серопозитивность.....	1389	TREC/KREC.....	1442
ишемическая болезнь сердца.....	1418	серотонин.....	1424	Т-клетки.....	1354
ишемия-реперфузия.....	1320	синдром активации тучных клеток.....	1290	Т-лимфоциты.....	1364
капиллярная кровь.....	1396			Т-хелперы.....	1364
				γ Т-лимфоциты.....	1344



Рисунок 9. Схема для изучения влияния объема цельной крови при подготовке сухого пятна на определяемые уровни TREC и KREC

Примечание. Слева направо кровь наносили в следующих объемах: 50 мкл, 100 мкл, 150 мкл, 200 мкл, 250 мкл, 300 мкл.

Figure 9. Schematic for studying the effect of whole blood volume during dry spot preparation on detectable TREC and KREC levels

Note. From left to right, blood was applied in the following volumes: 50 μ L, 100 μ L, 150 μ L, 200 μ L, 250 μ L, 300 μ L.

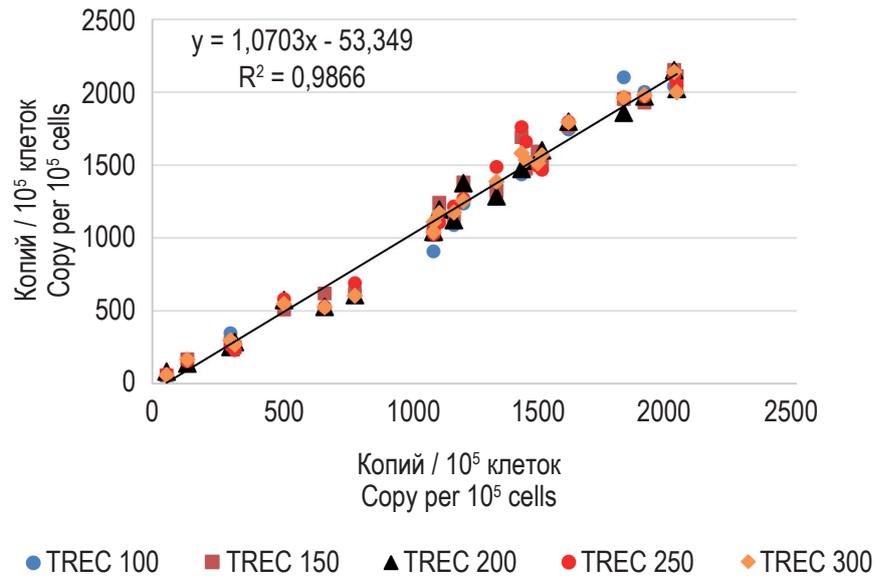


Рисунок 11. Корреляция уровней TREC, рассчитанных в пробах ДНК, экстрагированных из карт Гатри, пропитанных разными объемами крови, полученной от одного и того же индивидуума

Figure 11. Correlation of TREC levels calculated in DNA samples extracted from Guthrie cards soaked in different volumes of blood obtained from the same individual

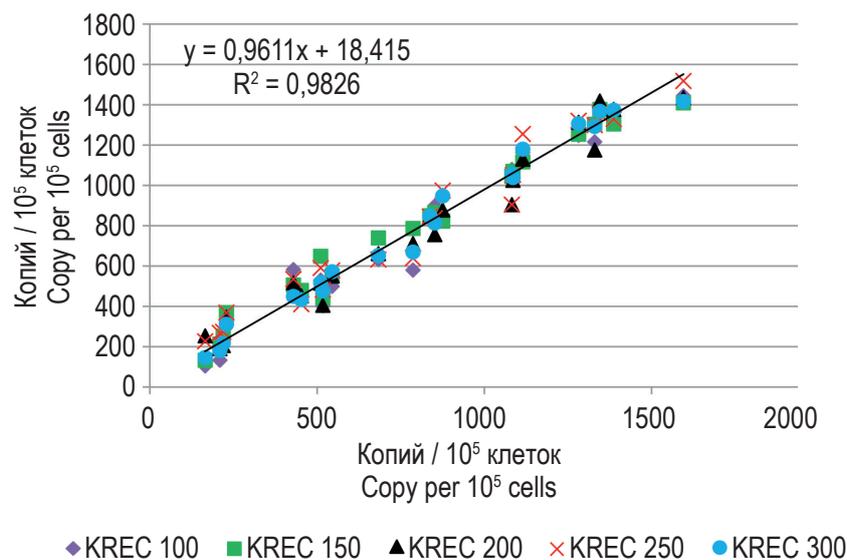


Рисунок 13. Корреляция уровней KREC, рассчитанных в пробах ДНК, экстрагированных из карт Гатри, пропитанных разными объемами крови, полученной от одного и того же индивидуума

Figure 13. Correlation of KREC levels calculated in DNA samples extracted from Guthrie cards soaked in different volumes of blood obtained from the same individual

**ПОДПИСНОЙ ИНДЕКС:
УРАЛ-ПРЕСС – 42311**

