

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

Том 26, № 1. С. 1-224

2024

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

МЕДИЦИНСКАЯ ИММУНОЛОГИЯ



**РОССИЙСКОЕ НАУЧНОЕ ОБЩЕСТВО
ИММУНОЛОГОВ**



ОБЪЕДИНЕННЫЙ ИММУНОЛОГИЧЕСКИЙ ФОРУМ – 2024

**28 июня – 5 июля 2024 года
Псковская область, Пушкинские Горы**

**VII Съезд Российского научного общества иммунологов (РНОИ)
IX Конференция Российского цитокинового общества (РЦО)
IX Конференция по иммунологии репродукции
Международная конференция по первичным иммунодефицитам J Project
Школа по проточной цитометрии
Циклы повышения квалификации**

ПРИ ПОДДЕРЖКЕ:

Российской академии наук
Министерства здравоохранения
Российской Федерации
Федеральной службы по надзору
в сфере защиты прав потребителей
и благополучия человека
Российского научного общества иммунологов
Российской ассоциации аллергологов
и клинических иммунологов
Санкт-Петербургского регионального
отделения РААКИ
Российского цитокинового общества
ООО «Ассоциация ревматологов России»

Национальной ассоциации экспертов
в области первичных иммунодефицитов
Евро-Азиатского общества
по инфекционным болезням
Научного Общества
по нейроиммунологии и нейромодуляции
Уральского общества иммунологов
и аллергологов
Общества по клинической адаптологии
и медицинской иммунологии
Ассоциации исследователей цитокинов
и антицитокиновой терапии
Ассоциации специалистов-клинических
иммунологов и клеточных технологов

КОНТАКТЫ:

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

Секретариат:

Ракитянская Наталья Владимировна

Тел.: (812) 644-63-12,
e-mail: raknv@mail.ru

**АДРЕС ДЛЯ КОРРЕСПОНДЕНЦИИ:
197101, Санкт-Петербург, а/я 130,
СПб РО РААКИ**

www.immunologiForum.ru

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

МЕДИЦИНСКАЯ ИММУНОЛОГИЯ

январь-февраль

2024, том 26

№ 1

Основан в марте 1999 года

Главный редактор

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

Заместитель главного редактора

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 10.11.2023 г. Формат 60 x 90 1/8. Печать офсетная.

Усл. печ. л. 28. Тираж 2000 экз. (1-й завод – 1000 экз.) Заказ № 048

Напечатано в ООО «АРТЕМИДА».

199178, Санкт-Петербург, 8-я линия В.О., 83, корп. 1, Литер А
Тел.: (812) 950-10-99.

С 2001 года журнал «Медицинская иммунология» регулярно входит в «Перечень ведущих рецензируемых научных журналов и изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертации на соискание ученой степени доктора наук», рекомендованных ВАК Министерства образования и науки РФ.

С 2016 года журнал «Медицинская иммунология» включен в международную базу SCOPUS.

Пинегин Борис Владимирович – доктор медицинских наук, профессор, руководитель отдела иммунодиагностики и иммунокоррекции ГНЦ Институт иммунологии ФМБА России, Москва, Россия

Симбирцев Андрей Семенович – доктор медицинских наук, профессор, член-корреспондент РАН, научный руководитель Государственного НИИ особо чистых биопрепаратов ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия

Смирнов Вячеслав Сергеевич – доктор медицинских наук, профессор, научный руководитель Медико-биологического научно-производственного комплекса «Цитомед», Санкт-Петербург, Россия

Черных Елена Рэмовна – доктор медицинских наук, профессор, член-корреспондент РАН, заместитель директора по научной работе НИИ фундаментальной и клинической иммунологии Сибирского отделения РАН, заведующая лабораторией клеточной иммунотерапии, Новосибирск, Россия

Редакционный совет

Ласунская Елена – доктор медицинских наук, профессор, Государственный университет Северной Флуминенсе, Лаборатория биологии распознавания, Рио-де-Жанейро, Бразилия

Мароди Ласло – доктор медицинских наук, профессор, Университет Дебрецена, Медицинский научный центр, Отдел инфекционной и педиатрической иммунологии, Дебрецен, Венгрия

Михалек Ярослав – доктор медицинских наук, Университет города Брно, заведующий кафедрой фармакологии медицинского факультета, Брно, Чехия

Рогенбук Дирк – доктор медицинских наук, профессор, Университет Лаузиц «University of Applied Sciences», Зенфтенберг, Германия

Сеонг Сеунг-Йонг – доктор медицинских наук, Национальный Университет, руководитель кафедры микробиологии и иммунологии, Сеул, Корея

Тендлер Евгений – доктор медицинских наук, Медицинский центр Рамбам, Отдел клинической биохимии, Хайфа, Израиль

Фейст Евгений – доктор медицинских наук, Университет Гумбольдта, клиника «Шаритэ», руководитель отделения ревматологии и клинической иммунологии, Берлин, Германия

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

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

(SPb RAACI)

**MEDICAL
IMMUNOLOGY/
MEDITSINSKAYA
IMMUNOLOGIYA**

January-February

2024, volume 26

No.1

Published since March 1999

Editor-in-Chief

Irina S. Freidlin – PhD, MD, Professor, RAS corresponding member, Institute of Experimental Medicine, Department of Immunology, Chief researcher, St. Petersburg, Russian Federation

Deputy Editor-in-Chief

Areg A. Totolian – PhD, MD, Professor, RAS full member, Saint Petersburg Pasteur Institute, Director, Laboratory of Molecular Immunology and Seroepidemiology, Chief, St. Petersburg, Russian Federation

Editorial Board

Ludmila A. Goriachkina – PhD, MD, Russian Academy of Postgraduate Medical Education, Department of Clinical Allergology, Chief, Moscow, Russian Federation

Kirill P. Kashkin – PhD, MD, Professor, RAS full member, Russian Academy of Postgraduate Medical Education, Department of Immunology, Chief, Moscow, Russian Federation

Vladimir A. Kozlov – PhD, MD, Professor, RAS full member, Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Scientific Director, Novosibirsk, Russian Federation

Elena A. Korneva – PhD, MD, Professor, RAS full member, Institute of Experimental Medicine, Department of Pathology and Pathophysiology, Chief researcher, St. Petersburg, Russian Federation

Vadim I. Mazurov – PhD, MD, Professor, RAS full member, Nord-Western State Medical University, President, Department of Therapy and Rheumatology, Chief, St. Petersburg, Russian Federation

Alexander V. Karaulov – PhD, MD, Professor, RAS full member, I. Sechenov First Moscow State Medical University, Department of Clinical Immunology and Allergology, Chief, Moscow, Russia

Sergei A. Nedospasov – PhD, Professor, RAS full member, Lomonosov State University, Department of Immunology, Chief; Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Department of Molecular Immunology, Chief, Moscow, Russian Federation

Managing Editor:

Natalia Rakitianskaia

E-mail: medimmun@spbraaci.ru

Translation editor:

Alexey B. Chukhlovin, PhD, MD

Online version editorial manager:

Erofeeva V.S.

Editorial Office: phone/fax +7 812 233-08-58

Address for correspondence:

197101, St. Petersburg, P.O. Box 130.

Electronic version: www.mimmun.ru; www.elibrary.ru

© Medical Immunology

The Journal is registered at the North Western

Regional Administration for the Press Affairs

of the Russian Federation, March 26, 1999.

Certificate of registration PI № 77-15892

by the Ministry of Press, Television,

Broadcasting and Mass media of the Russian Federation, June 30, 2003.

Federal Service for Supervision of Communications, Information Technology and Mass Media (ROSKOMNADZOR)

Certificate on registration of mass media PI №FS77-60436, December 30, 2014

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

Chelovek Publishing House

199004, Russian Federation, St. Petersburg, Malyyi ave., Vasilevsky Island, 26, office 3.

E-mail: mail@mirmed.ru

Phone/fax: (812) 325-25-64.

Passed for printing 10.11.2023. Print format 60 x 90 1/8. Offset printing.

Printed sheets 28. 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

Маркова К.Л., Зементова М.С., Вашукова Е.С., Перевязкина М.А., Сельков С.А., Соколов Д.И.

МИКРОРНК ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ВЕЗИКУЛ КАК БИОМАРКЕРЫ И РЕГУЛЯТОРЫ ПАТОЛОГИЧЕСКИХ И ФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ 7

Смирнова О.В., Маркина А.Н., Парилова О.В.

ПАТОФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ХРОНИЧЕСКИХ IgE-ОПОСРЕДОВАННЫХ РИНОСИНУСИТОВ
БАКТЕРИАЛЬНОЙ ЭТИОЛОГИИ..... 27

Павлюкова Е.Н., Колосова М.В., Неклюдова Г.В., Карпов Р.С.

ИММУНОМОДУЛИРУЮЩИЙ И РЕГЕНЕРАТИВНЫЙ ПОТЕНЦИАЛЫ ГРУДНОГО МОЛОКА, НЕДОНОШЕННОСТЬ И ДЕТСКОЕ СЕРДЦЕ 37

Оригинальные статьи

Мусина Н.Н., Прохоренко Т.С., Саприна Т.В., Зима А.П.

ТРУДНОСТИ В ПРИМЕНЕНИИ МАРКЕРОВ ВОСПАЛЕНИЯ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ АНЕМИИ ХРОНИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ
У ПАЦИЕНТОВ С САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ 1-ГО И 2-ГО ТИПА 57

Барило А.А., Смирнова С.В., Перетягко О.В.

ЦИТОКИНОВЫЙ ПРОФИЛЬ СЛЮНЫ ПРИ ПИЩЕВОЙ АЛЛЕРГИИ У БОЛЬНЫХ АТОПИЧЕСКИМ ДЕРМАТИТОМ И ПСОРИАЗОМ 67

Штина И.Е., Ошева Л.В., Ермакова О.В., Матьянина А.И.

ОСОБЕННОСТИ ИММУННОГО СТАТУСА И КОМОРБИДНОЙ ПАТОЛОГИИ У ДЕТЕЙ С ГНЕЗДНОЙ АЛОПЕЦИЕЙ 75

Шабалдин А.В., Синицкая А.В., Шмудевич С.А., Гришачева Е.О.

ОСОБЕННОСТИ ЭКСПРЕССИИ МОЛЕКУЛ HLA-G И HLA-DR НА ЛИМФОЦИТАХ ЖЕНЩИН И ИХ ДЕТЕЙ С СЕПТАЛЬНЫМИ
ВРОЖДЕННЫМИ ПОРОКАМИ СЕРДЦА 89

Нестерова И.В., Ковалева С.В., Чудилова Г.А., Ломтатидзе Л.В., Смерчинская Т.В., Чапурина В.Н.

ВЛИЯНИЕ ВНУТРИВЕННЫХ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ НА НЕГАТИВНО ТРАНСФОРМИРОВАННЫЕ СУБПОПУЛЯЦИИ
НЕЙТРОФИЛЬНЫХ ГРАНУЛОЦИТОВ НОВОРОЖДЕННЫХ С ВРОЖДЕННОЙ ПНЕВМОНИЕЙ И НЕОНАТАЛЬНЫМ СЕПСИСОМ 107

Краткие сообщения

Попонина Е.А., Пестрикова А.О., Назарова Е.Л., Исаева Н.В., Фокина Е.С., Эндакова А.И., Минаева Н.В.

ВЛИЯНИЕ ЦИТОКИНПРОДУЦИРУЮЩЕЙ АКТИВНОСТИ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК КОСТНОГО МОЗГА
НА ЭФФЕКТИВНОСТЬ МОБИЛИЗАЦИИ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ СТЕЛОВЫХ КЛЕТОК 121

Борщев Ю.Ю., Минасян С.М., Карасева А.Б., Буровенко И.Ю., Борщев В.Ю., Борщева О.В., Буровенко Д.В., Суворов А.Н., Галагудза М.М.

ВЛИЯНИЕ ПРОБИОТИЧЕСКОГО ШТАММА *LACTOBACILLUS DELBRUECKII* TS1-06 НА РАЗМЕР ИНФАРКТА МИОКАРДА
И ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ ПАРАМЕТРЫ У КРЫС WISTAR С СИНДРОМОМ СИСТЕМНОГО ВОСПАЛИТЕЛЬНОГО ОТВЕТА 127

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

ПОВЫШЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ ТИРОЗИНОВОЙ ПРОТЕИНФОСФАТАЗЫ (CD45) НА ПОВЕРХНОСТИ ГРАНУЛОЦИТОВ КРОВИ
ЧЕЛОВЕКА ПОД ВЛИЯНИЕМ ВАКЦИННОГО ШТАММА *YERSINIA PESTIS* EV НИИЭГ *EX VIVO* И *IN VIVO* 135

Долгих О.В., Дианова Д.Г., Ширинкина А.С., Бомбела Т.В.

ИММУНОМОДУЛИРУЮЩИЕ СВОЙСТВА РАСТИТЕЛЬНЫХ ПОЛИФЕНОЛОВ В ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ МОДЕЛИ *IN VITRO* 143

Янченко В.В., Аляхнович Н.С., Семерник О.Е., Лебедево А.А.

ОСОБЕННОСТИ ВОЗДЕЙСТВИЯ ПЫЛЬЦЫ АМБРОЗИИ НА ОРГАНИЗМ ЧЕЛОВЕКА С ТОЧКИ ЗРЕНИЯ ПЕПТИДОМИКИ 151

Глушков А.Н., Поленок Е.Г., Гордеева Л.А., Мун С.А., Антонов А.В., Байрамов П.В., Вержбицкая Н.Е., Колпинский Г.И., Вафин И.А.

АНТИИДИОТИПИЧЕСКИЕ АНТИТЕЛА ПРОТИВ ЭСТРАДИОЛА И ГЕНЕТИЧЕСКИЙ ПОЛИМОРФИЗМ
ЭСТРОГЕНОВЫХ РЕЦЕПТОРОВ α И β У БОЛЬНЫХ РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ 159

Агарков Н.М., Лев И.В., Воронина Е.А.

ДИССОЦИАЦИЯ ИНТЕРЛЕЙКИНОВ КРОВИ У ПАЦИЕНТОВ С ДИАБЕТИЧЕСКОЙ РЕТИНОПАТИЕЙ С УСКОРЕННЫМ СТАРЕНИЕМ 169

Бедина С.А., Мозговая Е.Э., Трофименко А.С., Спицина С.С., Мамус М.А.

ВНЕКЛЕТОЧНЫЕ ЛОВУШКИ НЕЙТРОФИЛОВ: ОСОБЕННОСТИ ОБРАЗОВАНИЯ ПРИ РЕВМАТОИДНОМ АРТРИТЕ И ОСТЕОАРТРИТЕ 175

Кудряшов С.И., Стенина М.А., Карзакова Л.М., Луткова Т.С.

НОВЫЙ ПОДХОД К ИММУНОСУПРЕССИВНОЙ ТЕРАПИИ У БОЛЬНЫХ ГЛОМЕРУЛОНЕФРИТОМ С НЕФРОТИЧЕСКИМ СИНДРОМОМ 181

Шурыгина А.-П.С., Васильев К.А., Варюшина Е.А., Ладыгина М.Д., Зубкова Т.Г., Бузицкая Ж.В., Стукова М.А., Лиознов Д.А.

ФОРМИРОВАНИЕ В-КЛЕТОЧНОГО ОТВЕТА ПРИ ИММУНИЗАЦИИ ИНАКТИВИРОВАННЫМИ ГРИППОЗНЫМИ
ВАКЦИНАМИ «ГРИППОЛ ПЛЮС», «СОВИГРИПП» И «УЛЬТРИКС» 191

Печникова Н.А., Останкова Ю.В., Сайтгаллина М.А., Бебяков А.М., Тотолян Арег А.

ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ РЕДКОГО СИНОНИМИЧНОГО ВАРИАНТА ГЕНА *KNG1* НА РАЗВИТИЕ НАСЛЕДСТВЕННОГО
АНГИОТЕКА 203

Иммунологические методы

Пономаренко Д.Г., Костюченко М.В., Ракитина Е.Л., Логвиненко О.В., Хачатурова А.А., Лукашевич Д.Е., Курчева С.А., Русанова Д.В., Куличенко А.Н.

КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ АНАЛИЗ ПРОТЕКТИВНОЙ АКТИВНОСТИ Т-КЛЕТОЧНОГО ИММУНИТЕТА К ВОЗБУДИТЕЛЮ БРУЦЕЛЛЕЗА 211

Правила для авторов 221

Авторский указатель 224

Предметный указатель 224

CONTENTS

Reviews

Markova K.L., Zementova M.S., Vashukova E.S., Pereviazkina M.A., Selkov S.A., Sokolov D.I.

MICRORNAs OF EXTRACELLULAR VESICLES AS BIOMARKERS AND REGULATORS OF PATHOLOGICAL AND PHYSIOLOGICAL PROCESSES 7

Smirnova O.V., Markina A.N., Parilova O.V.

PATHOPHYSIOLOGICAL FEATURES OF CHRONIC IGE-MEDIATED RHINOSINUSITIS OF BACTERIAL ETIOLOGY 27

Pavlyukova E.N., Kolosova M.V., Neklyudova G.V., Karpov R.S.

IMMUNOMODULATORY AND REGENERATIVE POTENTIALS OF BREAST MILK, PREMATURITY AND CHILDREN'S HEART 37

Original articles

Musina N.N., Prokhorenko T.S., Saprina T.V., Zima A.P.

PROBLEMS OF APPLYING INFLAMMATORY MARKERS TO DIAGNOSTICS OF ANEMIA OF CHRONIC DISEASE IN PATIENTS WITH TYPE 1 AND TYPE 2 DIABETES 57

Barilo A.A., Smirnova S.V., Peretyatko O.V.

CYTOKINE PROFILE OF ORAL FLUID IN PATIENTS WITH FOOD ALLERGY ASSOCIATED WITH ATOPIC DERMATITIS AND PSORIASIS 67

Shtina I.E., Osheva L.V., Ermakova O.V., Matyanina A.I.

FEATURES OF THE IMMUNE STATUS AND COMORBIDITIES IN CHILDREN WITH ALOPECIA AREATA 75

Shabal'din A.V., Sinitskaya A.V., Shmulevich S.A., Grishacheva E.O.

EXPRESSION PATTERN OF HLA-G AND HLA-DR MOLECULES ON LYMPHOCYTES OF WOMEN AND THEIR CHILDREN WITH SEPTAL CONGENITAL HEART DEFECTS 89

Nesterova I.V., Kovaleva S.V., Chudilova G.A., Lomtadidze L.V., Smerchinskaya T.V., Chapurina V.N.

EFFECTS OF INTRAVENOUS IMMUNOGLOBULIN ON THE NEGATIVELY TRANSFORMED SUBPOPULATIONS OF NEUTROPHILIC GRANULOCYTES IN NEWBORNS WITH CONGENITAL PNEUMONIA AND NEONATAL SEPSIS 107

Short communications

Poponina E.A., Pestrikova A.O., Nazarova E.L., Isaeva N.V., Fokina E.S., Endakova A.I., Minaeva N.V.

EFFECT OF THE BONE MARROW MESENCHYMAL STROMAL CELLS CYTOKINE-PRODUCING ACTIVITY ON MOBILIZATION OF HEMATOPOIETIC STEM CELLS 121

Borshchev Yu.Yu., Minasian S.M., Karaseva A.B., Burovenko I.Yu., Borshchev V.Yu., Borshcheva O.V., Burovenko D.V., Suvorov A.N., Galagudza M.M.

EFFECTS OF LACTOBACILLUS DELBRUECKII TS1-06 PROBIOTIC STRAIN ON THE SIZE OF MYOCARDIAL INFARCTION IN WISTAR RATS WITH SYSTEMIC INFLAMMATORY RESPONSE SYNDROME 127

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

INCREASED EXPRESSION OF TYROSINE PROTEIN PHOSPHATASE (CD45) ON THE SURFACE OF HUMAN BLOOD GRANULOCYTES UNDER THE INFLUENCE OF THE PLAGUE MICROBE VACCINE STRAIN YERSINIA PESTIS EV NIIEG EX VIVO AND IN VIVO 135

Dolgikh O.V., Dianova D.G., Shirinkina A.S., Bombela T.V.

IMMUNOMODULATORY PROPERTIES OF PLANT POLYPHENOLS SHOWN IN AN IN VITRO EXPERIMENTAL MODEL 143

Yanchanka U.V., Aliakhnovich N.S., Semernik O.E., Lebedenko A.A.

FEATURES OF RAGWEED POLLEN EFFECT ON HUMANS IN TERMS OF PEPTIDOMICS 151

Glushkov A.N., Polenok E.G., Gordeeva L.A., Mun S.A., Antonov A.V., Bayramov P.V., Verzhbitskaya N.E., Kolpinskiy G.I., Vafin I.A.

ANTIIDIOTYPIC ANTIBODIES TO ESTRADIOL AND GENE POLYMORPHISMS OF α AND β ESTROGENIC RECEPTORS IN BREAST CANCER PATIENTS 159

Agarkov N.M., Lev I.V., Voronina E.A.

DISSOCIATION OF BLOOD INTERLEUKIN SPECTRUM IN THE PATIENTS WITH ACCELERATED AGING AND DIABETIC RETINOPATHY 169

Bedina S.A., Mozgovaya E.E., Trofimenko A.S., Spitsyna S.S., Mamus M.A.

NEUTROPHIL EXTRACELLULAR TRAPS: FEATURES OF THEIR FORMATION IN RHEUMATOID ARTHRITIS AND OSTEOARTHRITIS 175

Kudryashov S.I., Stenina M.A., Karzakova L.M., Lutkova T.S.

A NEW APPROACH TO IMMUNOSUPPRESSIVE THERAPY IN PATIENTS WITH GLOMERULONEPHRITIS WITH NEPHROTIC SYNDROME 181

Shurygina A.-P.S., Vasiliev K.A., Varyushina E.A., Ladygina M.D., Zubkova T.G., Buzitskaya Zh.V., Stukova M.A., Lioznov D.A.

DEVELOPMENT OF B CELL RESPONSE DURING IMMUNIZATION WITH INACTIVATED INFLUENZA VACCINES "GRIPPOL PLUS", "SOVIGRIPP" AND "ULTRIX" 191

Pechnikova N.A., Ostankova Yu.V., Saitgalina M.A., Bebyakov A.M., Totolian Areg A.

ASSESSING THE IMPACT OF A RARE SYNONYMOUS VARIANT IN THE KNG1 GENE ON THE DEVELOPMENT OF HEREDITARY ANGIOEDEMA 203

Immunological methods

Ponomarenko D.G., Kostyuchenko M.V., Rakitina E.L., Logvinenko O.V., Khachaturova A.A., Lukashevich D.E., Kurcheva S.A., Rusanova D.V., Kulichenko A.N.

QUANTITATIVE ANALYSIS OF PROTECTIVE T CELL IMMUNITY AGAINST BRUCELLA 211

Instructions to Authors 221

Author index 224

Subject index 224

МИКРОРНК ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ВЕЗИКУЛ КАК БИОМАРКЕРЫ И РЕГУЛЯТОРЫ ПАТОЛОГИЧЕСКИХ И ФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ

Маркова К.Л., Зементова М.С., Вашукова Е.С., Перевязкина М.А., Сельков С.А., Соколов Д.И.

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

Резюме. В настоящее время в качестве потенциальных биомаркеров заболеваний, а также «биологических конструкций» для таргетной доставки лекарств рассматривают внеклеточные везикулы. Внеклеточные везикулы представляют собой гетерогенную популяцию мембранных везикул, образуемых различными клетками организма, в том числе клетками иммунной системы, в процессе их жизнедеятельности. В настоящее время, в зависимости от размера и способа образования, везикулы подразделяют на экзосомы, микровезикулы и апоптотические тела. Внеклеточные везикулы обнаружены в различных биологических жидкостях человека, в связи с чем обсуждается возможность их использования в качестве диагностических биомаркеров. Везикулы обладают разнообразным внутренним составом и экспрессируют на своей поверхности широкий репертуар рецепторов, что позволяет им участвовать в межклеточных коммуникациях за счет передачи клеткам различных молекул, в том числе генетического материала. Одним из типов молекул, способных передаваться при помощи внеклеточных везикул, являются молекулы микроРНК, представляющие собой эволюционно консервативные некодирующие молекулы РНК длиной 18-25 нуклеотидов, основной функцией которых является регуляция экспрессии генов на посттранскрипционном уровне. МикроРНК синтезируются во всех клетках организма, однако ряд микроРНК встречается повсеместно, тогда как другие присутствуют только в определенных типах тканей. МикроРНК присутствуют не только внутри, но и вне клетки (внеклеточные или циркулирующие микроРНК). МикроРНК устойчивы к РНКазам и стабильны во внеклеточной среде, что обуславливается тем, что клетки продуцируют их совместно с белковыми комплексами или в составе внеклеточных везикул. Профиль микроРНК во внеклеточных везикулах меняется в зависимости от физиологического состояния и наличия различных заболеваний. В настоящее время появляется все больше данных о том, что микроРНК могут определять функциональную активность внеклеточных везикул, показана возможность использования микроРНК, переносимых во внеклеточных везикулах, в терапевтических целях, а также для диагностики различных патологий.

Адрес для переписки:

Маркова Ксения Львовна
ФГБНУ «Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии имени Д.О. Отта»
199034, Россия, Санкт-Петербург,
Менделеевская линия, 3.
Тел.: 8 (812) 323-75-45 (тел./факс), (812) 328-98-50.
E-mail: kseniyabelyakova129@gmail.com

Address for correspondence:

Ksenia L. Markova
D. Ott Research Institute of Obstetrics,
Gynecology and Reproductology
3 Mendeleevskaya Line
St. Petersburg
199034 Russian Federation
Phone: +7 (812) 323-75-45 (phone/fax), (812) 328-98-50.
E-mail: kseniyabelyakova129@gmail.com

Образец цитирования:

К.Л. Маркова, М.С. Зементова, Е.С. Вашукова, М.А. Перевязкина, С.А. Сельков, Д.И. Соколов «МикроРНК внеклеточных везикул как биомаркеры и регуляторы патологических и физиологических процессов» // Медицинская иммунология, 2024. Т. 26, № 1. С. 7-26. doi: 10.15789/1563-0625-MOE-2617

© Маркова К.Л. и соавт., 2024
Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

K.L. Markova, M.S. Zementova, E.S. Vashukova, M.A. Pereviazkina, S.A. Selkov, D.I. Sokolov "MicroRNAs of extracellular vesicles as biomarkers and regulators of pathological and physiological processes", *Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2024, Vol. 26, no. 1, pp. 7-26.

doi: 10.15789/1563-0625-MOE-2617

© Markova K.L. et al., 2024
The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License

DOI: 10.15789/1563-0625-MOE-2617

В настоящем обзоре рассмотрены популяции внеклеточных везикул и их основные свойства, описаны характеристики внутриклеточных и внеклеточных (циркулирующих) микроРНК, механизмы их биосинтеза, методы детекции и оценки содержания микроРНК. В обзоре описаны микроРНК, входящие в состав экзосом и микровезикул, образованные различными клетками, в том числе клетками иммунной системы при физиологических и патологических процессах, рассмотрены функции данных микроРНК и их диагностический и терапевтический потенциал.

Ключевые слова: везикулы, внеклеточные, экзосомы, микровезикулы, микроРНК, биомаркеры, иммунные клетки

MicroRNAs OF EXTRACELLULAR VESICLES AS BIOMARKERS AND REGULATORS OF PATHOLOGICAL AND PHYSIOLOGICAL PROCESSES

Markova K.L., Zementova M.S., Vashukova E.S., Pereviazkina M.A., Selkov S.A., Sokolov D.I.

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

Abstract. Extracellular vesicles (EV) are currently considered potential biomarkers of diseases, as well as “biological constructs” for targeted drug delivery. Extracellular vesicles represent a heterogeneous population of membrane vesicles formed by various cell populations, including immune cells. At present time, EV are divided into exosomes, microvesicles, and apoptotic bodies, depending on their size and formation manner. EV have been found in various human biological fluids. Therefore, the possibility of their usage as diagnostic biomarkers is under discussion. The vesicles have a diverse internal composition and express a wide repertoire of receptors on their surface, thus allowing them to participate in different intercellular communications by transferring to the cells various molecules, including genetic material. E.g., microRNAs transmitted *via* extracellular vesicles are evolutionarily conserved non-coding RNA molecules 18-25 nucleotides long. Their main function is to regulate gene expression at the post-transcriptional level. MicroRNAs are synthesized by different cell types. However, some microRNAs are found ubiquitously, whereas others are present only in certain types of tissues. MicroRNAs are found both inside, and outside the cells (extracellular or circulating microRNAs). The microRNAs are resistant to RNases and stable in the extracellular environment, due to their secretion as protein complexes, or as part of extracellular vesicles. The variable microRNA profile in extracellular vesicles depends on the physiological conditions and presence of various pathological disorders. Multiple studies show that microRNAs can determine the functional activity of extracellular vesicles, e.g., therapeutic usage of microRNAs carried by EV as well as diagnostic applications in various pathologies. This review considers distinct populations of extracellular vesicles and their main properties, describes the characteristics of intra- and extracellular (circulating) microRNAs, mechanisms of their biosynthesis, and techniques for detection and assessing contents of microRNAs. The review describes microRNAs as a component of exosomes and microvesicles formed by various cells, including cells of the immune system in the course of physiological and pathological processes, with respect to functions of these microRNAs as well as their diagnostic and therapeutic potential.

Keywords: vesicles, extracellular, exosomes, microvesicles, microRNA, biomarkers, immune cells

Работа поддержана Поисковым научным исследованием АААА-А20-120041390023-5.

Введение

Изучение патофизиологических механизмов развития заболеваний на клеточном и молекулярном уровнях, поиск новых неинвазивных маркеров патологий и возможность предупреждения

и регулирования различных патологических состояний на начальных этапах их развития является актуальной задачей современной биологии и медицины. Значительное количество исследований в области медицины направлены на поиск биологических маркеров заболеваний, поскольку прямая оценка состояния здоровья пациента часто требует инвазивного вмешательства

ства и является весьма дорогостоящей и времязатратной процедурой. Помимо этого, биомаркеры имеют важное клиническое значение для оценки риска развития заболевания и раннего выявления патологии, а значит, незамедлительного лечения пациента [15]. Также актуальным направлением медицинских технологий является разработка методов лечения, в основе которых лежит создание биоинженерных конструкций для доставки генов и биологически активных веществ (БАВ) в клетки или патологический очаг [54, 59].

В настоящее время в качестве потенциальных биомаркеров заболеваний, а также «биологических конструкций» для таргетной доставки лекарств рассматривают внеклеточные везикулы, в частности микровезикулы (МВ) [15, 54, 117]. Помимо этого, перспективным объектом с точки зрения диагностики и терапии заболеваний являются микрорибонуклеиновые кислоты (микроРНК) [61]. МикроРНК считаются идеальными биомаркерами из-за простоты их обнаружения, они характеризуются высокой стабильностью и способностью сохраняться даже в замороженных тканях [32].

Молекулы микроРНК являются одним из типов молекул, способных передаваться при помощи внеклеточных везикул [74]. В настоящее время накапливается все больше доказательств того, что микроРНК могут определять функциональную активность внеклеточных везикул. В большом числе исследований продемонстрирована возможность использования микроРНК, переносимых во внеклеточных везикулах, в терапевтических целях [3, 76]. Однако, несмотря на обнадеживающие результаты, эффекты от использования везикулярных микроРНК недостаточно изучены, как и неизвестны механизмы упаковки и сортировки микроРНК в везикулы, а также процессы транспортировки микроРНК между разными типами клеток с помощью везикул.

Характеристика внеклеточных везикул

Внеклеточные везикулы (extracellular vesicles) – гетерогенная популяция мембранных везикул, образуемых различными типами клеток организма в процессе их жизнедеятельности. Они представляют собой замкнутые субклеточные структуры, окруженные билипидной мембраной. Внеклеточные везикулы обладают разнообразным внутренним составом. Их внутреннее содержимое может включать различные белки, липиды, нуклеиновые кислоты, гликолипиды и гликопротеины. В связи с этим, в настоящее время предполагается их активное участие в передаче БАВ и генетического материала между клетками [6, 47, 59, 75, 96]. Имеется предположение, что образование внеклеточных везикул являет-

ся эволюционно-консервативным механизмом коммуникаций клеток [81], имеющим ключевую роль в таких физиологических и патологических процессах, как: развитие коагуляция, воспаление, иммунные и репаративные реакции, опухолестроение [83]. Внеклеточные везикулы образуются клетками различного происхождения во время их жизнедеятельности [31, 86, 94]. В зависимости от размера и способа образования в настоящее время везикулы подразделяют на экзосомы (30–120 нм), микровезикулы (МВ) или эктосомы (100–1000 нм) и апоптотические тела (800–5000 нм). Внеклеточные везикулы обнаружены в различных биологических жидкостях человека: в плазме крови, моче, плевральной жидкости, синовиальной жидкости, слюне, грудном молоке, эякуляте, назальном лаваже как в норме, так и при патологических процессах [8, 15, 16, 31, 60, 90, 109].

В настоящее время экзосомы являются наиболее широко исследованной группой внеклеточных везикул [58, 71]. Установлено, что процесс формирования экзосом происходит при участии эндосомального сортирующего комплекса, необходимого для транспорта (ESCRT). Экзосомы образуются в виде интралюминарных везикул в мультивезикулярном теле, дальнейшее слияние которого с плазматической мембраной (ПМ) клетки приводит к высвобождению экзосом во внеклеточное пространство [48].

Образование апоптотических тел клетками происходит в процессе апоптоза, сопровождающимся фрагментацией клеточного ядра, увеличением проницаемости ПМ клетки и экстернализацией на ней фосфатидилсерина [34]. Внутреннее содержимое апоптотических тел может включать ядерный материал клетки и клеточные органеллы [34]. Имеется предположение, что одной из функций апоптотических тел является привлечение фагоцитов в зону апоптотического процесса, а также предупреждение клеток микроокружения о вторичном некрозе, в том случае, если апоптотическая клетка не деградировала [34].

Наименее изученной популяцией внеклеточных везикул являются МВ. В литературе можно встретить различные термины, обозначающие данную группу внеклеточных везикул: shedding vesicles (сбрасываемые везикулы), эктосомы и микрочастицы [86]. Они образуются путем отпочковывания или блеббинга ПМ клетки [26]. Данный механизм недостаточно изучен, неизвестно, каким образом содержимое попадает в везикулу, однако обнаружено, что процесс образования сопровождается сжатием и потерей асимметрии ПМ клетки, реорганизацией цитоскелета [24]. В зависимости от «места» отщепления МВ могут иметь различные свойства и состав [12]. Послед-

ние исследования показали, что процесс образования МВ зависит от уровня кальция в клетке [31, 51]. Помимо этого, важным участником процесса ремоделирования цитоскелета клетки является Rho-ассоциированная киназа-1 (ROCK-1), которая фосфорилирует легкие цепи миозина, вследствие чего увеличивается его сократимость [31].

В течение длительного времени МВ считались артефактами или клеточным дебрисом [82]. На сегодняшний день МВ признаны биологическими объектами, имеющими определенные свойства, характеристики и функции [22]. В литературе можно встретить описание внеклеточных везикул без разделения на отдельные популяции, это особенно характерно при описании свойств и функций МВ и экзосом [28, 40]. Во многом функциональные характеристики обеих популяций внеклеточных везикул схожи. К примеру, установлено, что и МВ, и экзосомы содержат в своем составе БАВ и способны транспортировать их между клетками. При этом имеются данные о том, что нуклеиновые кислоты более эффективно попадают в МВ, чем в экзосомы [52]. По этой причине предполагают, что МВ могут выступать более универсальными транспортным средством для межклеточной передачи генетической информации. Также предполагают, что МВ могут обладать большим функциональным потенциалом, чем экзосомы. Благодаря тому, что размер МВ в несколько десятков раз превосходит размер экзосом, МВ могут содержать больше функционально активных молекул и иметь большую доступную поверхность для взаимодействия с клетками [52]. Таким образом, МВ представляют особый интерес в качестве переносчиков и адресных средств доставки «биологической информации» клеткам.

Механизмы взаимодействия внеклеточных везикул с клеткам-реципиентами остаются практически неизученными. Описывают несколько видов взаимодействий при помощи которых везикулы могут доставлять свое содержимое в клетки: кавеолин- и клатрин-индуцированный эндоцитоз, макропиноцитоз [23] и эндоцитоз липидных рафтов [92], фагоцитоз [22, 75]. После попадания везикул в клетку они могут поглощаться эндосомально-лизосомальной системой клетки и затем сливаться с мембранами органелл и цитозольным содержимым клетки-реципиента. Они также способны сливаться с самой мембраной клетки-реципиента [75], чтобы высвободить свое содержимое непосредственно или при помощи рецепторов во внутреннюю среду клетки. Везикулы могут высвободить свое содержимое во внеклеточное пространство и тем самым активировать соседние клетки. Наконец, везикулы могут взаимодействовать с клеткой-мишенью

без интернализации, а при помощи лиганд-рецепторных механизмов, запуская сигнальные каскады в ней [21, 86]. Таким образом, везикулы функционируют как динамические системы, передающие информацию клеткам в их тканевой среде при помощи различных механизмов [46]. Помимо этого, везикулы обладают важной функцией – поддержание стабильности переносимых между клетками молекул [74], которые опосредуют функциональную активность везикул. Одним из важнейших составляющих внутреннего содержимого везикул являются микроРНК, позволяющие рассматривать везикулы в качестве биомаркеров патологий и потенциальных терапевтических агентов.

Характеристика микроРНК

С развитием современных молекулярно-генетических методов появилась возможность детально изучить состав РНК внеклеточных везикул. Оказалось, что основная часть этих молекул представлена различными типами некодирующих РНК [87]. Среди последних наиболее изученными являются микроРНК.

МикроРНК – это эволюционно консервативные некодирующие молекулы РНК, длина которых составляет приблизительно 18-25 нуклеотидов. Основной функцией микроРНК является регуляция экспрессии генов на посттранскрипционном уровне (на уровне мРНК) [19, 36, 61, 65, 68, 80]. Впервые они были идентифицированы у нематод *Caenorhabditis elegans* в 1997 г. Первая микроРНК у человека – *let-7* – была открыта в 2000 г. Сегодня описано уже более 2600 различных микроРНК человека (<http://www.miRbase.org>, Release 22). По разным оценкам микроРНК регулируют экспрессию более 60% всех генов человека [68]. В связи с этим микроРНК играют важную роль практически во всех биологических процессах [33], включая пролиферацию, дифференцировку, апоптоз [27], ангиогенез, миграцию [49], иммунный ответ, реакции воспаления [49], и многие другие [67, 69, 108].

Молекулы микроРНК образуются из эндогенной РНК, то есть исходно синтезирующейся в организме [77]. Процесс биосинтеза микроРНК включает в себя несколько ключевых этапов: транскрипцию, процессинг в ядре, экспорт в цитоплазму и формирование там зрелых молекул [19]. Гены, кодирующие микроРНК, расположены в интронах, экзонах, 5'- и 3'-нетранслируемых последовательностях белок-кодирующих генов, а также между белок-кодирующими генами. Подобно белок-кодирующим генам, гены микроРНК транскрибируются с собственных промоторов РНК-полимеразой II, в результате чего образуются первичные транс-

крипты – при-микроРНК длиной до нескольких тысяч нуклеотидов, каждый из которых содержит несколько зрелых микроРНК. При-микроРНК подвергаются кэпированию, полиаденилированию, сплайсингу и образуют вторичные структуры, содержащие «шпильки» длиной около 60–70 нуклеотидов [19]. Далее при-микроРНК узнаются белковым комплексом, включающим РНКазу III Droscha и протеины DGCR8. В результате расщепления при-микроРНК появляются предшественники микроРНК (пре-микроРНК), представляющие собой «шпильки» с «липкими» 3'-концами размером в два-три нуклеотида. «Липкие» концы пре-микроРНК узнаются белковым комплексом экспортина 5 (XPO5) с ГТФазой RAN, который осуществляет их транспорт в цитоплазму, где пре-микроРНК, расщепляясь ферментом РНКазой III Dicer в области петель, преобразуются в двухцепочечные фрагменты РНК длиной около 18–27 нуклеотидов (дуплексы микроРНК) [19, 77]. Далее дуплексы микроРНК диссоциируют, образуя две нити, одна из которых деградирует. Вторая нить, зрелая микроРНК после связывания с белками Argonaute (AGO) включается в состав RISC-комплекса (RNA-induced silencing complex, RISC). В составе этого комплекса зрелая микроРНК взаимодействует с мРНК-мишенью. Чаще всего микроРНК связывается с 3'-нетранслируемой областью мРНК, и в случае полной комплементарности происходит расщепление последней белком AGO. При неполной гомологии наблюдается только ингибирование трансляции без разрушения мРНК [77, 116, 118]. Также показано, что микроРНК могут также подавлять мРНК-мишени, связываясь с другими участками, в том числе с 5'-нетранслируемыми областями или белок-кодирующими экзонами. Таким образом, микроРНК являются специфическими регуляторами синтеза белков, кодируемых мРНК-мишенями. Каждая молекула микроРНК может связываться со многими мРНК, а содержание определенной мРНК может регулироваться несколькими типами микроРНК [19]. Имеются доказательства связывания микроРНК непосредственно с молекулой ДНК в процессе РНК-зависимого метилирования ДНК, одного из механизмов регуляции активности генов [45].

Недавно был открыт дополнительный способ образования микроРНК без участия РНКазы III Droscha. В этом случае микроРНК транскрибируются с коротких шпилечных интронов – митронов (miRtrons) [103]. Образование пре-микроРНК происходит в результате сплайсинга первичных транскриптов. Далее пре-микроРНК переносятся в цитоплазму с помощью экспортина 5 (XPO5). Формирование зрелых микроРНК

в цитоплазме происходит по описанному выше механизму [103].

Для оценки содержания микроРНК используют микрочипы (microarray), метод высокопроизводительного секвенирования (англ. next generation sequencing, NGS – секвенирование следующего поколения) и метод ПЦР в реальном времени. Микрочипы позволяют проводить анализ сразу нескольких сотен микроРНК, однако для исследования требуется большое количество исходного биоматериала и верификация результатов [37]. В свою очередь технология NGS обладает более высокой чувствительностью, позволяет оценивать все разнообразие микроРНК, их количество в образце, осуществлять поиск новых микроРНК, отличается высокой точностью анализа. Недостатками метода являются трудоемкость, высокая стоимость и необходимость верификации результатов. Метод ПЦР в реальном времени является «эталонным» для анализа микроРНК. К достоинствам метода относятся легкость использования, низкая стоимость и высокая чувствительность. Однако существуют сложности с подбором контролей реакции. Метод ПЦР в реальном времени в последние годы все чаще стал использоваться для верификации результатов, полученных с помощью NGS секвенирования или микрочипов [37, 102]. В настоящее время существуют панели для профилирования одновременно нескольких сотен микроРНК в 96- и 384-луночных планшетах, в которых каждая лунка содержит праймеры для оценки содержания индивидуальных молекул РНК методом ПЦР в реальном времени. Однако из-за высокой стоимости возможен анализ лишь небольшого числа образцов. Полученные данные для отдельных микроРНК необходимо подтверждать методом ПЦР в реальном времени с использованием больших выборок.

МикроРНК синтезируются во всех клетках организма. Однако ряд микроРНК встречается повсеместно, тогда, как другие присутствуют только в определенных типах тканей [103]. В многочисленных исследованиях показано, что при возникновении патологических процессов синтез микроРНК в пораженных тканях значительно меняется [2, 5, 13]. При этом изменения в содержании микроРНК могут быть выявлены до проявления клинических симптомов патологии [95].

МикроРНК присутствуют не только внутри, но и вне клетки (внеклеточные или циркулирующие микроРНК) [74]. Циркулирующие микроРНК детектируются в различных биологических жидкостях человека [4]: периферической крови [119], слюне [9, 39], моче [84], грудном молоке [66] и других. Показано, что циркулиру-

ющие микроРНК сохраняют регуляторные свойства и их уровень зависит от содержания соответствующих РНК в тканях [4]. Ряд микроРНК продемонстрировали себя потенциальными биомаркерами онкологических [13], сердечно-сосудистых [25, 100] и других заболеваний [2, 5].

Показано, что развитие плоскоклеточной карциномы слизистой оболочки полости рта коррелирует со снижением содержания в слюне молекул miR-125a и молекул семейства miR-200 [10] и повышением как в слюне, так и в плазме периферической крови молекул miR-31 [55, 64]. Авторы исследования предполагают, что участие молекул семейства miR-200 (miR-200a, miR-200b, miR-200c, miR-141 и miR-429) в патогенезе карциномы слизистой ротовой полости связано с тем, что данные микроРНК участвуют в регуляции функциональной активности опухолевых клеток, а именно в их эпителиально-мезенхимальной трансформации, за счет регуляции генов ZEB1 и ZEB2 и увеличения экспрессии гена виментина [10]. Другой группой ученых при анализе 734 различных микроРНК было установлено, что в образцах слюны пациентов больных плоскоклеточной карциномой был снижен уровень молекул miR-136, miR-147, miR-1250, miR-148a, miR-632, miR-646, miR-668, miR-877, miR-503, miR-220a, miR-323-5p, при этом повышено содержание молекул miR-24 и miR-27b по сравнению с образцами здоровых испытуемых [73].

Имеются данные о том, что у пациентов с острым инфарктом миокарда и стенокардией в периферической крови повышен уровень молекулы miR-21-5p, источниками которой могут являться эндотелиальные клетки, гладкомышечные клетки сосудов, тромбоциты и кардиомиоциты [113]. Показана ассоциация молекулы miR-197-3p с ишемической болезнью сердца [85]. В образцах мочи пациентов больных раком предстательной железы отмечается повышенное содержание молекул miR-10, miR-574-3p, miR-1825, miR-484, miR-183 и miR-205 по сравнению с контрольной группой [38].

МикроРНК устойчивы к РНКазам и стабильны во внеклеточной среде [4]. Стабильность микроРНК во внеклеточной среде обусловлена тем, что последние секретируются клетками с белковыми комплексами или в составе внеклеточных везикул (апоптотических телец, экзосом, МВ) [74]. При этом профиль микроРНК во внеклеточных везикулах меняется в зависимости от физиологического состояния и наличия различных заболеваний. Выявлены ряд везикулярных микроРНК, которые могут быть использованы для диагностики, прогнозирования и терапии некоторых патологий [29, 41, 44, 56, 72].

Функциональная характеристика везикулярных микроРНК

В настоящее время накапливается все больше доказательств того, что микроРНК могут определять функциональную активность внеклеточных везикул. В экспериментах *in vivo* и *in vitro* показано, что микроРНК, попадающие во внеклеточные везикулы, сохраняют свою первичную структуру и могут оказывать влияние на уровень экспрессии генов-мишеней после проникновения в клетку-реципиент.

На сегодняшний день не установлены точные механизмы попадания зрелых микроРНК во внеклеточные везикулы, однако предполагают, что в данном процессе могут принимать участие белок N-SMase (нейтральная сфингомиелиназа), комплекс miRISC, смоделированный белок семейства hnRNP (рибонуклеопротеин), который распознает мотив GGAG в 3'-части последовательности микроРНК и направляет специфические микроРНК для упаковки в везикулы [110]. Важное значение имеет структура самих микроРНК. Предполагают, что 3'-конец микроРНК может содержать сигнальный мотив, определяющий место ее сортировки. Так молекулы микроРНК, 3' конец которых обогащен уридином, сортируются преимущественно в экзосомы [110]. Так же имеются предположения о том, что у микроРНК имеются специфические последовательности, которые могут направлять их включение во внеклеточные везикулы. Кроме того, существуют особые белки и ферменты, которые могут контролировать попадание микроРНК в состав везикул независимым от наличия определенных последовательностей способом [110].

Исследователи предполагают, что везикулярные микроРНК обладают различными функциональными характеристиками (табл. 1).

В литературе имеются данные о том, что некоторые микроРНК, находящиеся в экзосомах, помимо взаимодействия с мРНК способны выступать в качестве лигандов членов семейства toll-подобных рецепторов, локализованных в эндосомах иммунных клеток: TLR7 (мышинный) и TLR8 (человеческий). Связывание молекул микроРНК приводит к опосредованной toll-подобными рецепторами активации транскрипционного фактора NF-κB и секреции воспалительных цитокинов клетками [35, 118], тем самым микроРНК принимают участие в функционировании иммунной системы. Также существует предположение, что везикулярные микроРНК, содержащиеся в грудном молоке, оказывают влияние на регуляцию клеточного метаболизма в различных тканях ребенка [18], на функционирование его иммунной и нервной систем [17, 66]. Имеются данные о про- и антиангиогенной активности

ТАБЛИЦА 1. ФУНКЦИИ И ВОЗМОЖНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ микроРНК В КЛИНИЧЕСКОЙ ПРАКТИКЕ

TABLE 1. FUNCTIONS AND POTENTIAL APPLICATION OF microRNA IN CLINICAL PRACTICE

микроРНК microRNA	Наличие в везикулах Presence in vesicles	Клетки-источник Source cells	Функции и/или возможности применения Functions and/or potential application
miR-125a, miR-200, miR-136, miR-147, miR-1250, miR-148a, miR-632, miR-646, miR-668, miR-877, miR-503, miR-220a, miR-323-5p	микроРНК обнаружены в экзосомах microRNAs have been identified in exosomes	Трансформированные опухолевые эпителиальные клетки слизистой оболочки полости рта Transformed tumor epithelial cells of the oral mucosa	Диагностика патологий. Развитие плоскоклеточной карциномы слизистой оболочки полости рта коррелирует со снижением уровня данных молекул микроРНК [10, 73] Diagnosis of pathologies. The development of squamous cell carcinoma of the oral mucosa correlates with a decrease in the level of these miRNA molecules [10, 73]
miR-31, miR-24 и miR-27b	микроРНК обнаружены в экзосомах microRNAs have been identified in exosomes	Трансформированные опухолевые эпителиальные клетки слизистой оболочки полости рта Transformed tumor epithelial cells of the oral mucosa	Диагностика патологий. Развитие плоскоклеточной карциномы слизистой оболочки полости рта коррелирует с повышением уровня данных молекул микроРНК [55, 64] Diagnosis of pathologies. The development of squamous cell carcinoma of the oral mucosa correlates with an increase in the level of these microRNA molecules [55, 64]
miR-186-5p	микроРНК обнаружена во внеклеточных везикулах НК-клеток microRNA has been identified in extracellular vesicles of NK cells	НК-клетки NK cells	Терапевтическое действие. Подавление жизнеспособности клеток нейробластомы и ингибирование их активность [78] Therapeutic action. Suppression of viability of neuroblastoma cells and inhibition of their activity [78]
miR-146b-5p	микроРНК обнаружена во внеклеточных везикулах НК-клеток microRNA has been identified in extracellular vesicles of NK cells	НК-клетки NK cells	Терапевтическое действие. Подавление пролиферации и миграции опухолевых клеток при лекарственно-устойчивом колоректальном раке и раке легких [115] Therapeutic action. Suppression of proliferation and migration of tumor cells in drug-resistant colorectal cancer and lung cancer [115]
miR-34a	микроРНК обнаружена в микровезикулах НК-клеток microRNA has been identified in microvesicles of NK cells	НК-клетки NK cells	Терапевтическое действие. Регуляция транскрипции генов, участвующих в онкогенезе, в частности PD-L1 [101] Therapeutic action. Regulation of transcription of genes involved in oncogenesis, in particular PD-L1 [101]
miR-335-5p	микроРНК обнаружена во внеклеточных везикулах microRNA has been identified in extracellular vesicles	Звездчатые клетки печени Hepatic stellate cells	Терапевтическое действие. Подавление пролиферации опухолевых клеток при гепатоцеллюлярной карциноме [99] Therapeutic action. Suppression of tumor cell proliferation in hepatocellular carcinoma [99]

Таблица 1 (продолжение)
Table 1 (continued)

микроРНК microRNA	Наличие в везикулах Presence in vesicles	Клетки-источник Source cells	Функции и/или возможности применения Functions and/or potential application
miR-145-5p	микроРНК обнаружена во внеклеточных везикулах microRNA has been identified in extracellular vesicles	Мезенхимальные стромальные клетки пуповины человека Human umbilical cord mesenchymal stem cells	Терапевтическое действие. Снижение роста и инвазивности опухолевых клеток при аденокарциноме поджелудочной железы [30] Therapeutic action. Reduced growth and invasiveness of tumor cells in pancreatic adenocarcinoma [30]
miR-145, miR-200c, miR-200b	микроРНК обнаружены во внеклеточных везикулах microRNAs have been identified in extracellular vesicles	Стволовые гепатоциты Hepatic stem cells	Терапевтическое действие. Подавление опухолевого роста клеток при почечно-клеточной карциноме [14] Therapeutic action. Suppression of tumor cell growth in renal cell carcinoma [14]
miR-159	микроРНК обнаружена в экзосомах моноцитов microRNA has been identified in exosomes of monocytes	Моноциты Monocytes	Терапевтическое действие. Подавление роста клеток рака молочной железы [43] Therapeutic action. Growth suppression of breast cancer cells [43]
miR-34a	микроРНК обнаружена во внеклеточных везикулах microRNA has been identified in extracellular vesicles	Клетки линий HL-60 и Kasumi-1 HL-60 and Kasumi-1 cell lines	Терапевтическое действие. Увеличение чувствительности клеток опухоли к темозоломиду [101] Therapeutic action. Increased sensitivity of tumor cells to temozolomide [101]
miR-3607-3p	микроРНК обнаружена в экзосомах НК-клеток microRNA has been identified in exosomes of NK cells	НК-клетки NK cells	Терапевтическое действие. Ингибирование пролиферации, миграции и инвазии опухолевых клеток рака поджелудочной железы [91] Therapeutic action. Inhibition of proliferation, migration and invasion of pancreatic cancer tumor cells [91]
miR-320b	микроРНК обнаружена в составе микровезикул тромбоцитов microRNA has been identified in microvesicles of platelets	Тромбоциты Platelets	Изменение фенотипических характеристик клеток. Снижение экспрессии молекулы межклеточной адгезии-1 (ICAM-1) на клетках линии HMEC-1 [42] Changes in the phenotypic characteristics of cells. Decreased expression of ICAM-1 on HMEC-1 cells [42]
miR-142-3p	микроРНК обнаружена в составе микровезикул тромбоцитов microRNA has been identified in microvesicles of platelets	Тромбоциты Platelets	Изменение функциональных характеристик клеток. Индукция аномальной пролиферации эндотелиальных клеток [11] Changes in the functional characteristics of cells. Induction of abnormal proliferation of endothelial cells [11]

Таблица 1 (продолжение)
Table 1 (continued)

микроРНК microRNA	Наличие в везикулах Presence in vesicles	Клетки-источник Source cells	Функции и/или возможности применения Functions and/or potential application
miR-let-7a	микроРНК обнаружена в составе микровезикул тромбоцитов microRNA has been identified in microvesicles of platelets	Тромбоциты Platelets	Изменение функциональных характеристик клеток. Индукция образования эндотелиальных канальцев эндотелиальными клетками пупочной вены человека (HUVEC) [7] Changes in the functional characteristics of cells. Induction of endothelial tubule formation by HUVEC [7]
miR-223	микроРНК обнаружена в составе микровезикул тромбоцитов microRNA has been identified in microvesicles of platelets	Тромбоциты Platelets	Изменение функциональных характеристик клеток. Регуляция работы эндогенных эндотелиальных генов: FBXW7 и EFNA1; индукция апоптоза эндотелиальных клеток пупочной вены человека (HUVEC) [57] Changes in the functional characteristics of cells. Regulation of endogenous endothelial genes: FBXW7 and EFNA1; induction of apoptosis in HUVEC [57]
miR-181a	микроРНК обнаружена в составе микровезикул лимфоцитов microRNA has been identified in microvesicles of lymphocytes	Лимфоциты Lymphocytes	Изменение функциональных характеристик клеток. Антиангиогенный эффект [79] Changes in the functional characteristics of cells. Antiangiogenic effect [79]
miR-150	микроРНК обнаружена в составе микровезикул моноцитов microRNA has been identified in microvesicles of monocytes	Моноциты Monocytes	Изменение функциональных характеристик клеток: способствует васкуляризации атеросклеротических бляшек [112] Changes in the functional characteristics of cells. Induction of atherosclerotic plaque vascularization [112]
miR-96, miR-26a	микроРНК обнаружены в составе микровезикул тромбоцитов microRNAs have been identified in microvesicles of platelets	Тромбоциты Platelets	Изменение функциональных характеристик клеток: способствуют снижению миграции эндотелиальных клеток и ингибируют ангиогенез [114] Changes in the functional characteristics of cells. Reduced migration of endothelial cells and inhibition of angiogenesis [114]
miR-19	микроРНК обнаружена в составе микровезикул эндотелиальных клеток microRNA has been identified in microvesicles of endothelial cells	Эндотелиоциты Endothelial cells	Изменение функциональных характеристик клеток: способствуют снижению миграции эндотелиальных клеток и ингибируют ангиогенез [63] Changes in the functional characteristics of cells. Reduced migration of endothelial cells and inhibition of angiogenesis [63]

Таблица 1 (продолжение)
Table 1 (continued)

микроРНК microRNA	Наличие в везикулах Presence in vesicles	Клетки-источник Source cells	Функции и/или возможности применения Functions and/or potential application
miR-126-3p	микроРНК обнаружена в составе микровезикул эндотелиальных клеток microRNA has been identified in microvesicles of endothelial cells	Эндотелиоциты Endothelial cells	Терапевтическое действие, изменение функциональных характеристик клеток: способствует восстановлению эндотелия и ингибирует развитие атеросклероза [50] Therapeutic effect, changes in the functional characteristics of cells: promotes the repair of the endothelium and inhibits the development of atherosclerosis [50]
miR-146a-5p, miR-548e-5p	микроРНК обнаружены в плацентарных внеклеточных везикулах microRNAs have been identified in placental extracellular vesicles	Клетки плаценты Placental cells	Терапевтическое действие, оказывают противовоспалительное действие на клетки трофобласта и могут быть использованы для терапии преждевременных родов [106] Therapeutic action, anti-inflammatory effect on trophoblast cells and can be used for the treatment of preterm labor [106]
miR-133b	микроРНК обнаружена в плацентарных внеклеточных везикулах microRNA has been identified in placental extracellular vesicles	Клетки плаценты Placental cells	Индукция пролиферации, миграции и инвазии клеток трофобласта. Может быть использована для терапии преэклампсии [98] Induction of proliferation, migration and invasion of trophoblast cells, microRNA can be used to treat preeclampsia [98]
let-7a (miR-let-7a), miR-23a, miR-143 и miR-320a	микроРНК обнаружены в эндометриальных внеклеточных везикулах microRNAs have been identified in endometrial extracellular vesicles	Эутопический эндометрий Eutopic endometrium	Диагностика наружного генитального эндометриоза [53] Diagnosis of external genital endometriosis [53]
miR-30d5p, miR-16-5p и miR-27a-3p	микроРНК обнаружены во внеклеточных везикулах плазмы периферической крови microRNAs have been identified in extracellular vesicles of peripheral blood plasma	Клетки периферической крови Peripheral blood cells	Диагностика наружного генитального эндометриоза [53] Diagnosis of external genital endometriosis [53]
miR-22-3p и miR-320a	микроРНК обнаружены в экзосомах сыворотки периферической крови microRNAs have been identified in exosomes of peripheral blood serum	Клетки периферической крови Peripheral blood cells	Диагностика наружного генитального эндометриоза [111] Diagnosis of external genital endometriosis [111]

Таблица 1 (окончание)
Table 1 (continued)

микроРНК microRNA	Наличие в везикулах Presence in vesicles	Клетки-источник Source cells	Функции и/или возможности применения Functions and/or potential application
miR-26b-5p, miR-215-5p и miR-6795-3p	микроРНК обнаружены в экзосомах плазмы периферической крови microRNAs have been identified in in exosomes of peripheral blood plasma	Клетки периферической крови Peripheral blood cells	Диагностика эндометриоза яичников [105] Diagnosis of ovarian endometriosis [105]
miR-214	Везикулы, обогащены микроРНК за счет трансфекции Vesicles enriched with miRNAs by transfection	Стромальные клетки ectopического эндометрия Stromal cells of the ectopic endometrium	Терапевтическое действие. Приводит к снижению сверхэкспрессии гена фактора роста соединительной ткани (CTGF), в результате происходит ингибирование фиброза, ассоциированного с эндометриозом [104] Therapeutic action. It leads to a decrease in the overexpression of the connective tissue growth factor (CTGF) gene, resulting in the inhibition of fibrosis associated with endometriosis [104]

микроРНК. Согласно данным литературы, микроРНК тромбоцитов, транспортируясь в сосудистые эндотелиальные клетки при помощи МВ тромбоцитов, оказывают влияние на их функциональную активность и способствуют участию эндотелиальных клеток в процессе воспаления [88]. Показано, что при гипертензии МВ тромбоцитов доставляют miR-142-3p в эндотелиальные клетки и тем самым усиливают их пролиферацию, воздействуя на мРНК Vcl-2-ассоциированного фактора транскрипции 1 (VCLAF1) [11]. Продемонстрирована способность везикулярной miR-223 тромбоцитов регулировать экспрессию генов (FBXW7 и EFNA1) в клетках линии HUVEC, путем дестабилизации мРНК или ингибирования инициации трансляции мРНК [57]. Предполагают, что МВ лимфоцитов за счет наличия в своем составе miR-181a подавляют пролиферативную активность эндотелиальных клеток [88], так как данная молекула вмешивается в сигнальную систему MAPK1/VEGF [107].

В большом числе исследований продемонстрирована возможность использования микроРНК, переносимых во внеклеточных везикулах, в диагностических и терапевтических целях [3, 76]. В обзоре Martignano и соавт., посвященном описанию возможных биомаркеров рака предстательной железы, сообщалось, что данная патология характеризовалась повышенным содержанием молекул miR-107, miR-574-3p, miR-183, miR-888, miR-100, miR-200b,

miR-375 miR-148a, miR-21, miR-204, miR-375 и сниженным уровнем miR-205, miR-214, miR-429, miR-1825 и miR-484 в экзосомах, выделенных из мочи [38, 70]. Исследователями установлено, что МВ моноцитов пациентов с атеросклерозом обогащены молекулой miR-150, участвующей в регуляции миграционной активности эндотелиоцитов, предполагается роль данной молекулы в высокой васкуляризации атеросклеротических бляшек [112].

Многими исследователями показано, что везикулярные микроРНК имеют большой потенциал для лечения онкологических заболеваний. Например, молекулы miR-335-5p, действуя на гены-мишени, подавляют рост гепатоцеллюлярной карциномы благодаря уменьшению пролиферации ее клеток и усилению апоптоза [99]. В то время как везикулы, содержащие miR-145-5p, уменьшают рост и инвазивность аденокарциномы поджелудочной железы за счет снижения содержания мРНК гена SMAD3 [30]. В случае почечно-клеточной карциномы отмечено уменьшение темпа опухолевого роста под влиянием везикулярных микроРНК на экспрессию целого ряда генов: miR-145 (EGFR и MMP1), miR-200c (ZEB2), miR-200b (MMP1) [14]. Также отмечено угнетение опухолевого роста клеток рака молочной железы в результате использования везикул, содержащих miR-159 [43]. Li и соавт. удалось снизить пролиферацию и миграцию клеток рака эндометрия с помощью miR-302a [41]. Помимо

подавления опухолевого роста, везикулярные микроРНК могут изменять чувствительность пораженных клеток к химиопрепаратам [3, 76]. На модели глиобластомы продемонстрировано, что везикулы, нагруженные miR-34a, увеличивают чувствительность клеток опухоли к темозоломиду [97].

Большим потенциалом в лечении онкологических заболеваний обладают везикулы, образованные естественными киллерами. Показано, что внеклеточные везикулы НК-клеток обладают цитотоксическим потенциалом за счет их внутреннего содержимого и молекул, экспрессируемых на их поверхности [89, 117]. В литературе имеются данные, что цитолитическая противоопухолевая активность везикул НК-клеток может быть обусловлена наличием в их внутреннем содержимом молекул микроРНК, которые доставляются в микроокружение опухоли с помощью внеклеточных везикул и воздействуют на опухолевые клетки-реципиенты с помощью разных механизмов [20]. Показано, что экзосомы НК-клеток содержат микроРНК miR-186, которая, вероятно, является опухолевым супрессором. В экспериментах *in silico* было показано, что данная микроРНК способна ингибировать активность генов киназы Аурого А (AURKA) и N-мус (MYCN), ответственных за жизнеспособность клеток нейробластомы [78]. Также имеются данные, что miR-186-5p способна регулировать компоненты TGF-сигнального пути: TGFBR1, TGFBR2, SMAD2, SMAD3 и блокировать TGF-зависимую супрессию иммунного ответа при нейробластоме [78]. Установлено, что использование молекулы miR-146-5p, содержащейся в везикулах НК-клеток, приводит к подавлению пролиферации и миграции опухолевых клеток легкого [62]. В экспериментах *in vitro* с использованием клеток немелкоклеточного рака легкого линии H1299 было показано, что трансфекция клеток данной клеточной линии miR-146-5p приводила к снижению их пролиферации через 48 и 72 часа по сравнению с контролем [62]. При совместном культивировании экзосом НК-клеток с клетками рака поджелудочной железы линий Mia PaCa-2 и PANC-1 в условиях *in vitro* и *in vivo* было показано ингибирование пролиферации, миграции и инвазии опухолевых клеток, исследователи связывают полученный результат с действием miR-3607-3p, содержащейся в везикулах НК-клеток [91]. Имеются данные, что молекула miR-3607-3p ингибирует продукцию IL-26 на уровне мРНК, а данный цитокин способствует пролиферации и выживанию опухолевых клеток [91]. Имеются предположения, что молекула miR-34a, обнаруженная в составе содержимого МВ естественных киллеров, модулирует транскрипцию генов, участвующих в

онкогенезе. В исследовании Wang X. и соавт. на клетках острого миелоидного лейкоза отмечена обратная корреляция экспрессии онкогена PD-L1 (programmed death-ligand 1) и молекулы miR-34a. Высокое содержание miR-34a в клетках линий HL-60 и Kasumi-1 приводило к блокировке экспрессии гена PD-L1, а также приводила к снижению уровня PD-L1 на поверхности клеток. Авторы исследования предполагают, что miR-34a ингибирует активность гена PD-L1 [101].

В последние несколько лет опубликованы работы, в которых продемонстрирована возможность использования микроРНК, переносимых во внеклеточных везикулах, для терапии осложнений беременности. В работе Yang и соавт. (2019) продемонстрировано, что везикулярные микроРНК miR-146a-5p и miR-548e-5p оказывают противовоспалительное действие на клетки трофобласта и могут быть использованы для терапии преждевременных родов [106]. Wang и соавт. (2020) сообщили, что молекулы miR-133b стимулируют пролиферацию, миграцию и инвазию клеток трофобласта за счет снижения уровня мРНК гена SGK1 (serine/threonine kinase 1), продукт которого может играть важную роль в патогенезе преэклампсии. Действительно, оказалось, что содержание SGK1 повышено в образцах плаценты от женщин с этим осложнением беременности. На основе проведенного исследования, авторы сделали вывод, что везикулы, нагруженные miR-133b, могут быть использованы для терапии преэклампсии [98].

Также в настоящее время активно изучается роль как везикул, так и микроРНК в диагностике и терапии гинекологических заболеваний, в частности наружного генитального эндометриоза (НГЭ) — заболевания, для которого так и не обнаружены маркерные молекулы [1, 93]. Khalaj K. и соавт. с помощью NGS-технологии проведено масштабное исследование профиля РНК внеклеточных везикул, выделенных из эктопического и эутопического эндометрия, перитонеальной жидкости и плазмы крови женщин больных эндометриозом III-IV стадий и здоровых фертильных женщин. Авторами исследования обнаружены уникальные микроРНК во внеклеточных везикулах плазмы и клетках эктопического и эутопического эндометрия женщин больных эндометриозом и не обнаружены в везикулах контрольной группы [53]. Авторы установили, что везикулы эутопического эндометрия больных женщин по сравнению со здоровыми содержали молекулы let-7a (miR-let-7a), miR-23a, miR-143и miR-320a, при этом везикулы плазмы крови женщин с НГЭ содержали молекулы miR-30d5p, miR-16-5p и miR-27a-3p [53]. Zhang и соавт. было показано, что по сравнению со здоровыми женщинами, у

пациенток с эндометриозом в сыворотке крови значительно повышено содержание экзосомальных микроРНК miR-22-3p и miR-320a, авторы предполагают, что данные молекулы могут быть использованы для диагностики эндометриоза [111].

Wu и соавт. был исследован профиль микроРНК в экзосомах, выделенных из плазмы крови женщин с эндометриозом яичников на различных стадиях, и женщин контрольной группы, проходивших обследование в связи с лечением доброкачественной тератомы или кист яичников [105]. Исследователями было продемонстрировано различие в содержании молекул miR-26b-5p, miR-215-5p и miR-6795-3p в экзосомах плазмы женщин больных эндометриозом и женщин контрольной группы, также уровень данных молекул коррелировал по степени тяжести заболевания. Для молекул miR-26b-5p и miR-215-5p было установлено значительное снижение содержания в экзосомах у пациенток с эндометриозом, и еще более значительное снижение у пациенток на III-IV стадиях эндометриоза по сравнению с I-II стадиями. Авторы исследования с использованием программы TargetScan 7.2 установили, что мишенью для miR-26b-5p может являться мРНК гена PTEN, кодирующего гомолог фосфатазы и тензина. Данный ген вовлечен в такие биологические процессы как пролиферация, миграция и инвазия клеток, апоптоз. Также имеются данные о низкой экспрессии PTEN в ткани эндометрия *in situ* у пациенток с эндометриозом, экспрессия PTEN коррелирует с инвазивностью эпителия эндометриальной железы *in situ*. Продукт гена PTEN может действовать на сигнальные пути PI3K/AKT, и тем самым ингибировать ангиогенез и снижать продукцию фактора роста эндотелия сосудов (VEGF). Поэтому авторы исследования предполагают, что низкое содержание экзосомальной miR-26b-5p в сыворотке у пациентов с эндометриозом может приводить к снижению экспрессии целевого гена PTEN. Это может ослабить блокировку сигнального пути PI3K/AKT, тем самым способствовать ангиогенезу, который в свою очередь обеспечивает питание и имплантацию эктопического эндометрия, способствует выживанию и росту эктопического эндометрия и прогрессированию эндометриоза. Мишенью для miR-215-5p может являться мРНК гена хемокина CXCL2, который обладает хемотаксическим действием на нейтрофилы и участвует в стимулировании ангиогенеза и воспалении. Показан высокий уровень содержания данного хемокина в перитонеальной жидкости. Авторы предполагают, что за счет воздействия miR-215-5p происходит аномальная продукция хемокина, что в свою очередь может способство-

вать развитию эндометриоза в связи с индукцией местной воспалительной реакции в брюшной полости и изменения ее микроокружения. Для молекулы miR-6795-3p было установлено повышение уровня в экзосомах у пациенток с эндометриозом, однако механизм ее действия в настоящее время неизвестен [105]. Таким образом, авторы исследования предполагают, что молекулы miR-26b-5p, miR-215-5p и miR-6795-3p могут выступать маркерными молекулами для диагностики эндометриоза яичников и определения тяжести заболевания [105].

В литературе имеются данные о терапевтическом действии везикулярных микроРНК в отношении эндометриоза. В модели эндометриоза с использованием бестимусных мышей было показано, что внутрибрюшинное инъекционное введение мышам экзосом, выделенных из стромальных клеток эктопического эндометрия человека и обогащенных путем трансфекции миметиками miR-214, приводило к снижению фиброза. Как предполагают авторы, использование miR-214 приводит к снижению сверхэкспрессии гена фактора роста соединительной ткани (CTGF), за счет чего происходит ингибирование фиброза, ассоциированного с эндометриозом [104].

Однако, несмотря на обнадеживающие результаты, эффекты от использования везикулярных микроРНК как в диагностике, так и в терапии не однозначны, их применение в клинической практике требует проведения дополнительных исследований. Все это в настоящее время обуславливает повышенный интерес исследователей к изучению состава микроРНК в различных типах клеток и в секретируемых ими везикулах, механизмов упаковки и сортировки микроРНК в везикулы, а также процессов обмена микроРНК между клетками посредством везикул.

Заключение

Суммируя приведенные выше данные литературы, можно отметить, что везикулы являются важнейшим звеном межклеточных коммуникаций, которые способны транспортировать между клетками различные БАВ и генетический материал, в том числе молекулы микроРНК. Везикулы опосредуют устойчивость микроРНК к РНКазам и их стабильность во внеклеточной среде, тем самым делая микроРНК доступными для идентификации в определенных биологических жидкостях. Это в свою очередь дает возможность использовать везикулярные микроРНК и везикулы, содержащие их, в качестве диагностических маркеров патологий. Возможность транспортировки в клетки при помощи везикул молекул микроРНК, являющихся регуляторными

молекулами и влияющими на функциональные характеристики клеток, позволяет рассматривать везикулы в качестве неких функциональных «биологических контейнеров» для доставки молекул клеткам и регуляций их свойств. Это может быть использовано для модулирования функциональной активности клеток и применяться для

терапии заболеваний. В связи с этим, изучение функциональных характеристик везикул, а также их содержимого, включая молекулы микроРНК, является весьма многообещающим направлением, как с точки зрения диагностики и терапии патологий, так и возможного средства доставки молекул в клетки.

Список литературы / References

1. Адамян Л.В., Азнаурова Я.Б. Молекулярные аспекты патогенеза эндометриоза // Проблемы репродукции, 2015. Т. 21, № 2. С. 66-77. [Adamyan L.V., Aznaurova Ya.B. Molecular aspects of endometriosis. *Problemy reproduktivnoy = Russian Journal of Human Reproduction*, 2015, Vol. 21, no. 2, pp. 66-77. (In Russ.)]
2. Баулина Н.М., Кулакова О.Г., Фаворова О.О. МикроРНК: роль в развитии аутоиммунного воспаления // Acta Naturae (русскоязычная версия), 2016. Т. 8, № 1 (28). С. 23-26. [Baulina N.M., Kulakova O.G., Favorova O.O. *Acta Naturae = Acta Naturae (Russian version)*, 2016, Vol. 8, no. 1 (28), pp. 23-26. (In Russ.)]
3. Великонивцев Ф.С., Головкин А.С. Терапия внеклеточными везикулами: возможности, механизмы и перспективы применения // Российский кардиологический журнал, 2020. Т. 25, № 10. С. 4081. [Velikonivtsev F.S., Golovkin A.S. Extracellular vesicles therapy: opportunities, mechanisms and perspectives. *Rossiyskiy kardiologicheskiy zhurnal = Russian Journal of Cardiology*, 2020, Vol. 25, no. 10, 4081. (In Russ.)] doi: 10.15829/1560-4071-2020-4081.
4. Тигунцев В.В., Иванова С.А., Серебров В.Ю., Бухарева М.Б. Малые некодирующие РНК как перспективные биомаркеры: биогенез и терапевтические стратегии // Бюллетень сибирской медицины, 2016. Т. 15, № 2. С. 112-126. [Tiguntsev V.V., Ivanova S.A., Serebrov V.Yu., Buhareva M.B. Small noncoding RNA as perspective biomarkers: biogenesis and therapeutic strategies. *Byulleten sibirskoy meditsiny = Bulletin of Siberian Medicine*, 2016, Vol. 15, no. 2, pp. 112-126. (In Russ.)]
5. Хальчинский С.Е., Комов В.П., Насырова Р.Ф., Иванов М.В. Нарушения регуляции микроРНК при психических и неврологических расстройствах // Обзорение психиатрии и медицинской психологии имени В.М. Бехтерева, 2014. № 4. С. 23-29. [Khalchitsky S.E., Komov V.P., Nasyrova R.F., Ivanov M.V. Violations of microRNA regulation at mental and neurologic disorders. *Obozreniye psikhiiatrii i meditsinskoy psikhologii imeni V.M. Bekhtereva = V. Bekhterev Review of Psychiatry and Medical Psychology*, 2014, no. 4, pp. 23-29. (In Russ.)]
6. Abels E.R., Breakefield X.O. Introduction to Extracellular Vesicles: Biogenesis, RNA Cargo Selection, Content, Release, and Uptake. *Cell. Mol. Neurobiol.*, 2016, Vol. 36, no. 3, pp. 301-312.
7. Anene C., Graham A.M., Boyne J., Roberts W. Platelet microparticle delivered microRNA-Let-7a promotes the angiogenic switch. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis.*, 2018, Vol. 1864, no. 8, pp. 2633-2643.
8. Angelillo-Scherrer A. Leukocyte-derived microparticles in vascular homeostasis. *Circ. Res.*, 2012, Vol. 110, no. 2, pp. 356-369.
9. Arunachalam S.R., Tang K.D., Punyadeera C. Isolation and Quantification of MicroRNAs from Human Saliva. *Methods Mol. Biol.*, 2019, Vol. 2054, pp. 105-114.
10. Arunkumar G., Deva Magendhra Rao A.K., Manikandan M., Prasanna Srinivasa Rao H., Subbiah S., Ilangovan R., Murugan A.K., Munirajan A.K. Dysregulation of miR-200 family microRNAs and epithelial-mesenchymal transition markers in oral squamous cell carcinoma. *Oncol. Lett.*, 2018, Vol. 15, no. 1, pp. 649-657.
11. Bao H., Chen Y.X., Huang K., Zhuang F., Bao M., Han Y., Chen X.H., Shi Q., Yao Q.P., Qi Y.X. Platelet-derived microparticles promote endothelial cell proliferation in hypertension via miR-142-3p. *FASEB J.*, 2018, Vol. 32, no. 7, pp. 3912-3923.
12. Bernimoulin M., Waters E.K., Foy M., Steele B.M., Sullivan M., Falet H., Walsh M.T., Barteneva N., Geng J.G., Hartwig J.H., Maguire P.B., Wagner D.D. Differential stimulation of monocytic cells results in distinct populations of microparticles. *J. Thromb. Haemost.*, 2009, Vol. 7, no. 6, pp. 1019-1028.
13. Brase J.C., Johannes M., Schlomm T., Falth M., Haese A., Steuber T., Beissbarth T., Kuner R., Sultmann H. Circulating miRNAs are correlated with tumor progression in prostate cancer. *Int. J. Cancer*, 2011, Vol. 128, no. 3, pp. 608-616.
14. Brossa A., Fonsato V., Grange C., Tritta S., Tapparo M., Calvetti R., Cedrino M., Fallo S., Gontero P., Camussi G., Bussolati B. Extracellular vesicles from human liver stem cells inhibit renal cancer stem cell-derived tumor growth *in vitro* and *in vivo*. *Int. J. Cancer*, 2020, Vol. 147, no. 6, pp. 1694-1706.
15. Burger D., Schock S., Thompson C.S., Montezano A.C., Hakim A.M., Touyz R.M. Microparticles: biomarkers and beyond. *Clin. Sci. (Lond.)*, 2013, Vol. 124, no. 7, pp. 423-441.
16. Burnier L., Fontana P., Kwak B.R., Angelillo-Scherrer A. Cell-derived microparticles in haemostasis and vascular medicine. *Thromb. Haemost.*, 2009, Vol. 101, no. 3, pp. 439-451.
17. Cao D.D., Li L., Chan W.Y. MicroRNAs: key regulators in the central nervous system and their implication in neurological diseases. *Int. J. Mol. Sci.*, 2016, Vol. 17, no. 6, 842. doi: 10.3390/ijms17060842.

18. Carney M.C., Tarasiuk A., di Angelo S.L., Silveyra P., Podany A., Birch L.L., Paul I.M., Kelleher S., Hicks S.D. Metabolism-related microRNAs in maternal breast milk are influenced by premature delivery. *Pediatr. Res.*, 2017, Vol. 82, no. 2, pp. 226-236.
19. Chen D.B., Wang W. Human placental microRNAs and preeclampsia. *Biol. Reprod.*, 2013, Vol. 88, no. 5, 130. doi: 10.1095/biolreprod.113.107805.
20. Cochran A.M., Kornbluth J. Extracellular vesicles from the human natural killer cell line NK3.3 have broad and potent anti-tumor activity. *Front. Cell Dev. Biol.*, 2021, Vol. 9, 698639. doi: 10.3389/fcell.2021.698639.
21. Cocucci E., Meldolesi J. Ectosomes and exosomes: shedding the confusion between extracellular vesicles. *Trends Cell Biol.*, 2015, Vol. 25, no. 6, pp. 364-372.
22. Cocucci E., Racchetti G., Meldolesi J. Shedding microvesicles: artefacts no more. *Trends Cell Biol.*, 2009, Vol. 19, no. 2, pp. 43-51.
23. Costa Verdera H., Gitz-Francois J.J., Schiffelers R.M., Vader P. Cellular uptake of extracellular vesicles is mediated by clathrin-independent endocytosis and macropinocytosis. *J. Control Release*, 2017, Vol. 266, pp. 100-108.
24. Crompton E., van Damme M., Duvillier H., Pieters K., Vermeesch M., Perez-Morga D., Meuleman N., Mineur P., Bron D., Lagneaux L., Stamatopoulos B. Avoiding false positive antigen detection by flow cytometry on blood cell derived microparticles: the importance of an appropriate negative control. *PLoS One*, 2015, Vol. 10, no. 5, e0127209. doi: 10.1371/journal.pone.0127209.
25. d'Alessandra Y., Devanna P., Limana F., Straino S., di Carlo A., Brambilla P.G., Rubino M., Carena M.C., Spazzafumo L., de Simone M., Micheli B., Biglioli P., Achilli F., Martelli F., Maggiolini S., Marenzi G., Pompilio G., Capogrossi M.C. Circulating microRNAs are new and sensitive biomarkers of myocardial infarction. *Eur. Heart J.*, 2010, Vol. 31, no. 22, pp. 2765-2773.
26. d'Souza-Schorey C., Clancy J.W. Tumor-derived microvesicles: shedding light on novel microenvironment modulators and prospective cancer biomarkers. *Genes Dev.*, 2012, Vol. 26, no. 12, pp. 1287-1299.
27. de Mattei M., Grassilli S., Pellati A., Brugnoli F., de Marchi E., Contartese D., Bertagnolo V. Pulsed electromagnetic fields modulate miRNAs during osteogenic differentiation of bone mesenchymal stem cells: a possible role in the osteogenic-angiogenic coupling. *Stem Cell Rev. Rep.*, 2020, Vol. 16, no. 5, pp. 1005-1012.
28. Desrochers L.M., Antonyak M.A., Cerione R.A. Extracellular vesicles: satellites of information transfer in cancer and stem cell biology. *Dev. Cell*, 2016, Vol. 37, no. 4, pp. 301-309.
29. Devor E., Santillan D., Scroggins S., Warriar A., Santillan M. Trimester-specific plasma exosome microRNA expression profiles in preeclampsia. *J. Matern. Fetal Neonatal Med.*, 2020, Vol. 33, no. 18, pp. 3116-3124.
30. Ding Y., Cao F., Sun H., Wang Y., Liu S., Wu Y., Cui Q., Mei W., Li F. Exosomes derived from human umbilical cord mesenchymal stromal cells deliver exogenous miR-145-5p to inhibit pancreatic ductal adenocarcinoma progression. *Cancer Lett.*, 2019, Vol. 442, pp. 351-361.
31. Distler J.H., Huber L.C., Gay S., Distler O., Pisetsky D.S. Microparticles as mediators of cellular cross-talk in inflammatory disease. *Autoimmunity*, 2006, Vol. 39, no. 8, pp. 683-690.
32. Doroszkiewicz J., Groblewska M., Mroczko B. Molecular biomarkers and their implications for the early diagnosis of selected neurodegenerative diseases. *Int. J. Mol. Sci.*, 2022, Vol. 23, no. 9, 4610. doi: 10.3390/ijms23094610.
33. Eiring A.M., Harb J.G., Neviani P., Garton C., Oaks J.J., Spizzo R., Liu S., Schwind S., Santhanam R., Hickey C.J., Becker H., Chandler J.C., Andino R., Cortes J., Hokland P., Huettner C.S., Bhatia R., Roy D.C., Liebhaber S.A., Caligiuri M.A., Marcucci G., Garzon R., Croce C.M., Calin G.A., Perrotti D. miR-328 functions as an RNA decoy to modulate hnRNP E2 regulation of mRNA translation in leukemic blasts. *Cell*, 2010, Vol. 140, no. 5, pp. 652-665.
34. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol. Pathol.*, 2007, Vol. 35, no. 4, pp. 495-516.
35. Fabbri M., Paone A., Calore F., Galli R., Gaudio E., Santhanam R., Lovat F., Fadda P., Mao C., Nuovo G.J., Zanesi N., Crawford M., Ozer G.H., Wernicke D., Alder H., Caligiuri M.A., Nana-Sinkam P., Perrotti D., Croce C.M. MicroRNAs bind to Toll-like receptors to induce prometastatic inflammatory response. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 2012, Vol. 109, no. 31, pp. E2110-E2116.
36. Feng Y., Li J., Zhang Y. Chemical knockdown of MicroRNA with Small-Molecule Chimeras. *Chembiochem*, 2020, Vol. 21, no. 22, pp. 3180-3185.
37. Fu G., Brkic J., Hayder H., Peng C. MicroRNAs in human placental development and pregnancy complications. *Int. J. Mol. Sci.*, 2013, Vol. 14, no. 3, pp. 5519-5544.
38. Fujita K., Nonomura N. Urinary biomarkers of prostate cancer. *Int. J. Urol.*, 2018, Vol. 25, no. 9, pp. 770-779.
39. Gallo A., Tandon M., Alevizos I., Illei G.G. The majority of microRNAs detectable in serum and saliva is concentrated in exosomes. *PLoS One*, 2012, Vol. 7, no. 3, e30679. doi: 10.1371/journal.pone.0030679.
40. Gangoda L., Boukouris S., Liem M., Kalra H., Mathivanan S. Extracellular vesicles including exosomes are mediators of signal transduction: are they protective or pathogenic? *Proteomics*, 2015, Vol. 15, no. 2-3, pp. 260-271.
41. Gheyntchi E., Madjd Z., Janani L., Rasti A., Ghods R., Atyabi F., Asadi-Lari M.H., Babashah S. Exosomal microRNAs as potential circulating biomarkers in gastrointestinal tract cancers: a systematic review protocol. *Syst. Rev.*, 2017, Vol. 6, no. 1, 228. doi: 10.1186/s13643-017-0624-2.
42. Gidlöf O., van der Brug M., Ohman J., Gilje P., Olde B., Wahlestedt C., Erlinge D. Platelets activated during myocardial infarction release functional miRNA, which can be taken up by endothelial cells and regulate ICAM1 expression. *Blood*, 2013, Vol. 121, no. 19, pp. 3908-3917, s1-26.

43. Gong C., Tian J., Wang Z., Gao Y., Wu X., Ding X., Qiang L., Li G., Han Z., Yuan Y., Gao S. Functional exosome-mediated co-delivery of doxorubicin and hydrophobically modified microRNA 159 for triple-negative breast cancer therapy. *J. Nanobiotechnology*, 2019, Vol. 17, no. 1, 93. doi: 10.1186/s12951-019-0526-7.
44. Goto T., Fujiya M., Konishi H., Sasajima J., Fujibayashi S., Hayashi A., Utsumi T., Sato H., Iwama T., Ijiri M., Sakatani A., Tanaka K., Nomura Y., Ueno N., Kashima S., Moriichi K., Mizukami Y., Kohgo Y., Okumura T. An elevated expression of serum exosomal microRNA-191, -21, -451a of pancreatic neoplasm is considered to be efficient diagnostic marker. *BMC Cancer*, 2018, Vol. 18, no. 1, 116. doi: 10.1186/s12885-018-4006-5.
45. Gunel T., Zeybek Y.G., Akcakaya P., Kalelioglu I., Benian A., Ermis H., Aydinli K. Serum microRNA expression in pregnancies with preeclampsia. *Genet. Mol. Res.*, 2011, Vol. 10, no. 4, pp. 4034-4040.
46. Gyorgy B., Szabo T.G., Pasztoi M., Pal Z., Misjak P., Aradi B., Laszlo V., Pallinger E., Pap E., Kittel A., Nagy G., Falus A., Buzas E.I. Membrane vesicles, current state-of-the-art: emerging role of extracellular vesicles. *Cell. Mol. Life Sci.*, 2011, Vol. 68, no. 16, pp. 2667-2688.
47. Henderson M.C., Azorsa D.O. The genomic and proteomic content of cancer cell-derived exosomes. *Front. Oncol.*, 2012, Vol. 2, 38. doi: 10.3389/fonc.2012.00038.
48. Hessvik N.P., Llorente A. Current knowledge on exosome biogenesis and release. *Cell. Mol. Life Sci.*, 2018, Vol. 75, no. 2, pp. 193-208.
49. Hosseinpour S., He Y., Nanda A., Ye Q. MicroRNAs involved in the regulation of angiogenesis in bone regeneration. *Calcif. Tissue Int.*, 2019, Vol. 105, no. 3, pp. 223-238.
50. Jansen F., Stumpf T., Proebsting S., Franklin B.S., Wenzel D., Pfeifer P., Flender A., Schmitz T., Yang X., Fleischmann B.K., Nickenig G., Werner N. Intercellular transfer of miR-126-3p by endothelial microparticles reduces vascular smooth muscle cell proliferation and limits neointima formation by inhibiting LRP6. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 2017, Vol. 104, pp. 43-52.
51. Johnson B.L., III, Kuethe J.W., Caldwell C.C. Neutrophil derived microvesicles: emerging role of a key mediator to the immune response. *Endocr. Metab. Immune Disord. Drug Targets*, 2014, Vol. 14, no. 3, pp. 210-217.
52. Kanada M., Bachmann M.H., Hardy J.W., Frimannson D.O., Bronsart L., Wang A., Sylvester M.D., Schmidt T.L., Kaspar R.L., Butte M.J., Matin A.C., Contag C.H. Differential fates of biomolecules delivered to target cells via extracellular vesicles. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 2015, Vol. 112, no. 12, pp. E1433-E1442.
53. Khalaj K., Miller J.E., Lingegowda H., Fazleabas A.T., Young S.L., Lessey B.A., Koti M., Tayade C. Extracellular vesicles from endometriosis patients are characterized by a unique miRNA-lncRNA signature. *JCI Insight*, 2019, Vol. 4, no. 18, e128846. doi: 10.1172/jci.insight.128846.
54. Komuro H., Kawai-Harada Y., Aminova S., Pascual N., Malik A., Contag C.H., Harada M. Engineering extracellular vesicles to target pancreatic tissue *in vivo*. *Nanotheranostics*, 2021, Vol. 5, no. 4, pp. 378-390.
55. Kumari P., Syed S.A., Wahid M., Qureshi M.A., Kumar R. Expression of miR-31 in saliva-liquid biopsy in patients with oral squamous cell carcinoma. *J. Taibah Univ. Med. Sci.*, 2021, Vol. 16, no. 5, pp. 733-739.
56. Kuwabara Y., Ono K., Horie T., Nishi H., Nagao K., Kinoshita M., Watanabe S., Baba O., Kojima Y., Shizuta S., Imai M., Tamura T., Kita T., Kimura T. Increased microRNA-1 and microRNA-133a levels in serum of patients with cardiovascular disease indicate myocardial damage. *Circ. Cardiovasc. Genet.*, 2011, Vol. 4, no. 4, pp. 446-454.
57. Laffont B., Corduan A., Plé H., Duchez A.C., Cloutier N., Boilard E., Provost P. Activated platelets can deliver mRNA regulatory Ago2•microRNA complexes to endothelial cells via microparticles. *Blood*, 2013, Vol. 122, no. 2, pp. 253-261.
58. Latifkar A., Hur Y.H., Sanchez J.C., Cerione R.A., Antonyak M.A. New insights into extracellular vesicle biogenesis and function. *J. Cell Sci.*, 2019, Vol. 132, no. 13, jcs222406. doi: 10.1242/jcs.222406.
59. Lee T.H., D'Asti E., Magnus N., Al-Nedawi K., Meehan B., Rak J. Microvesicles as mediators of intercellular communication in cancer – the emerging science of cellular 'debris'. *Semin. Immunopathol.*, 2011, Vol. 33, no. 5, pp. 455-467.
60. Leroyer A.S., Rautou P.E., Silvestre J.S., Castier Y., Leseche G., Devue C., Duriez M., Brandes R.P., Lutgens E., Tedgui A., Boulanger C.M. CD40 ligand+ microparticles from human atherosclerotic plaques stimulate endothelial proliferation and angiogenesis a potential mechanism for intraplaque neovascularization. *J. Am. Coll. Cardiol.*, 2008, Vol. 52, no. 16, pp. 1302-1311.
61. Li T., Leong M.H., Harms B., Kennedy G., Chen L. MicroRNA-21 as a potential colon and rectal cancer biomarker. *World J. Gastroenterol.*, 2013, Vol. 19, no. 34, pp. 5615-5621.
62. Li Y., Zhang H., Dong Y., Fan Y., Li Y., Zhao C., Wang C., Liu J., Li X., Dong M., Liu H., Chen J. MiR-146b-5p functions as a suppressor miRNA and prognosis predictor in non-small cell lung cancer. *J. Cancer*, 2017, Vol. 8, no. 9, pp. 1704-1716.
63. Liang H.Z., Li S.F., Zhang F., Wu M.Y., Li C.L., Song J.X., Lee C., Chen H. Effect of endothelial microparticles induced by Hypoxia on migration and angiogenesis of human umbilical vein endothelial cells by delivering MicroRNA-19b. *Chin. Med. J. (Engl.)*, 2018, Vol. 131, no. 22, pp. 2726-2733.
64. Liu C.J., Lin S.C., Yang C.C., Cheng H.W., Chang K.W. Exploiting salivary miR-31 as a clinical biomarker of oral squamous cell carcinoma. *Head Neck*, 2012, Vol. 34, no. 2, pp. 219-224.
65. Liu Y., Song J.W., Lin J.Y., Miao R., Zhong J.C. Roles of MicroRNA-122 in Cardiovascular Fibrosis and Related Diseases. *Cardiovasc. Toxicol.*, 2020, Vol. 20, no. 5, pp. 463-473.
66. Lönnerdal B. Human Milk MicroRNAs/Exosomes: Composition and Biological Effects. *Nestle Nutr. Inst. Workshop Ser.*, 2019, Vol. 90, pp. 83-92.

67. Lv Y., Lu C., Ji X., Miao Z., Long W., Ding H., Lv M. Roles of microRNAs in preeclampsia. *J. Cell. Physiol.*, 2019, Vol. 234, no. 2, pp. 1052-1061.
68. Lycoudi A., Mavreli D., Mavrou A., Papantoniou N., Kolialexi A. miRNAs in pregnancy-related complications. *Expert Rev. Mol. Diagn.*, 2015, Vol. 15, no. 8, pp. 999-1010.
69. Mahesh G., Biswas R. MicroRNA-155: a master regulator of inflammation. *J. Interferon Cytokine Res.*, 2019, Vol. 39, no. 6, pp. 321-330.
70. Martignano F., Rossi L., Maugeri A., Gallà V., Conteduca V., de Giorgi U., Casadio V., Schepisi G. Urinary RNA-based biomarkers for prostate cancer detection. *Clin. Chim. Acta*, 2017, Vol. 473, pp. 96-105.
71. Mathivanan S., Ji H., Simpson R.J. Exosomes: Extracellular organelles important in intercellular communication. *J. Proteomics*, 2010, Vol. 73, no. 10, pp. 1907-1920.
72. Menon R., Debnath C., Lai A., Guanzon D., Bhatnagar S., Kshetrapal P.K., Sheller-Miller S., Salomon C., Garbhini Study T. Circulating Exosomal miRNA Profile During Term and Preterm Birth Pregnancies: A Longitudinal Study. *Endocrinology*, 2019, Vol. 160, no. 2, pp. 249-275.
73. Momen-Heravi F., Trachtenberg A.J., Kuo W.P., Cheng Y.S. Genomewide Study of Salivary MicroRNAs for Detection of Oral Cancer. *J. Dent. Res.*, 2014, Vol. 93, no. 7 Suppl., pp. 86s-93s.
74. Mouillet J.F., Ouyang Y., Coyne C.B., Sadovsky Y. MicroRNAs in placental health and disease. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 2015, Vol. 213, no. 4 Suppl., pp. S163-S172.
75. Mulcahy L.A., Pink R.C., Carter D.R. Routes and mechanisms of extracellular vesicle uptake. *J. Extracell. Vesicles*, 2014, 3. doi: 10.3402/jev.v3.24641.
76. Munir J., Yoon J.K., Ryu S. Therapeutic miRNA-Enriched Extracellular Vesicles: Current Approaches and Future Prospects. *Cells*, 2020, Vol. 9, no 10, 2271. doi: 10.3390/cells9102271.
77. Nakanishi K. Anatomy of RISC: how do small RNAs and chaperones activate Argonaute proteins? *Wiley Interdiscip. Rev. RNA*, 2016, Vol. 7, no. 5, pp. 637-660.
78. Neviani P., Wise P.M., Murtadha M., Liu C.W., Wu C.H., Jong A.Y., Seeger R.C., Fabbri M. Natural killer-derived exosomal mir-186 inhibits neuroblastoma growth and immune escape mechanisms. *Cancer Res.*, 2019, Vol. 79, no. 6, pp. 1151-1164.
79. Pan Y., Liang H., Liu H., Li D., Chen X., Li L., Zhang C.Y., Zen K. Platelet-secreted microRNA-223 promotes endothelial cell apoptosis induced by advanced glycation end products via targeting the insulin-like growth factor 1 receptor. *J. Immunol.*, 2014, Vol. 192, no. 1, pp. 437-446.
80. Poirier C., Desgagne V., Guerin R., Bouchard L. MicroRNAs in pregnancy and gestational diabetes mellitus: emerging role in maternal metabolic regulation. *Curr. Diab. Rep.*, 2017, Vol. 17, no. 5, 35. doi: 10.1007/s11892-017-0856-5.
81. Ratajczak J., Miekus K., Kucia M., Zhang J., Reca R., Dvorak P., Ratajczak M.Z. Embryonic stem cell-derived microvesicles reprogram hematopoietic progenitors: evidence for horizontal transfer of mRNA and protein delivery. *Leukemia*, 2006, Vol. 20, no. 5, pp. 847-856.
82. Ratajczak J., Wysoczynski M., Hayek F., Janowska-Wieczorek A., Ratajczak M.Z. Membrane-derived microvesicles: important and underappreciated mediators of cell-to-cell communication. *Leukemia*, 2006, Vol. 20, no. 9, pp. 1487-1495.
83. Roberts C.T., Jr., Kurre P. Vesicle trafficking and RNA transfer add complexity and connectivity to cell-cell communication. *Cancer Res.*, 2013, Vol. 73, no. 11, pp. 3200-3205.
84. Samsonov R., Shtam T., Burdakov V., Glotov A., Tsyrlina E., Berstein L., Nosov A., Evtushenko V., Filatov M., Malek A. Lectin-induced agglutination method of urinary exosomes isolation followed by mi-RNA analysis: Application for prostate cancer diagnostic. *Prostate*, 2016, Vol. 76, no. 1, pp. 68-79.
85. Schulte C., Molz S., Appelbaum S., Karakas M., Ojeda F., Lau D.M., Hartmann T., Lackner K.J., Westermann D., Schnabel R.B., Blankenberg S., Zeller T. miRNA-197 and miRNA-223 predict cardiovascular death in a cohort of patients with symptomatic coronary artery disease. *PLoS One*, 2015, Vol. 10, no. 12, e0145930. doi: 10.1371/journal.pone.0145930.
86. Sedgwick A.E., D'Souza-Schorey C. The biology of extracellular microvesicles. *Traffic*, 2018, Vol. 19, no. 5, pp. 319-327.
87. Semenov D.V., Baryakin D.N., Brenner E.V., Kurilshikov A.M., Vasiliev G.V., Bryzgalov L.A., Chikova E.D., Filippova J.A., Kuligina E.V., Richter V.A. Unbiased approach to profile the variety of small non-coding RNA of human blood plasma with massively parallel sequencing technology. *Expert Opin. Biol. Ther.*, 2012, Vol. 12, Suppl. 1, pp. S43-S51.
88. Shu Z., Tan J., Miao Y., Zhang Q. The role of microvesicles containing microRNAs in vascular endothelial dysfunction. *J. Cell. Mol. Med.*, 2019, Vol. 23, no. 12, pp. 7933-7945.
89. Sokolov D.I., Markova K.L., Mikhailova V.A., Vyazmina L.P., Milyutina Yu.P., Kozyreva A.R., Zhdanova A.A., Malygina D.A., Onokhin K.V., Ivanova A.N., Korenevsky A.V., Selkov S.A. Phenotypic and functional characteristics of microvesicles produced by natural killer cells. *Medical Immunology (Russia)*, 2019, Vol. 21, no. 4, pp. 669-688. doi: 10.15789/1563-0625-2019-4-669-688.
90. Sokolov D.I., Ovchinnikova O.M., Korenkov D.A., Viknyanschuk A.N., Benken K.A., Onokhin K.V., Selkov S.A. Influence of peripheral blood microparticles of pregnant women with preeclampsia on the phenotype of monocytes. *Transl. Res.*, 2014, Vol. 170, pp. 112-123.

91. Sun H., Shi K., Qi K., Kong H., Zhang J., Dai S., Ye W., Deng T., He Q., Zhou M. Natural killer cell-derived exosomal miR-3607-3p Inhibits Pancreatic Cancer Progression by Targeting IL-26. *Front. Immunol.*, 2019, Vol. 10, 2819. doi: 10.3389/fimmu.2019.02819.
92. Svensson K.J., Christianson H.C., Wittrup A., Bourseau-Guilmain E., Lindqvist E., Svensson L.M., Morgelin M., Belting M. Exosome uptake depends on ERK1/2-heat shock protein 27 signaling and lipid Raft-mediated endocytosis negatively regulated by caveolin-1. *J. Biol. Chem.*, 2013, Vol. 288, no. 24, pp. 17713-17724.
93. Symons L.K., Miller J.E., Kay V.R., Marks R.M., Liblik K., Koti M., Tayade C. The Immunopathophysiology of Endometriosis. *Trends Mol. Med.*, 2018, Vol. 24, no. 9, pp. 748-762.
94. Todorova D., Simoncini S., Lacroix R., Sabatier F., Dignat-George F. Extracellular Vesicles in Angiogenesis. *Circ. Res.*, 2017, Vol. 120, no. 10, pp. 1658-1673.
95. Ura B., Feriotto G., Monasta L., Bilel S., Zweyer M., Celeghini C. Potential role of circulating microRNAs as early markers of preeclampsia. *Taiwan J. Obstet. Gynecol.*, 2014, Vol. 53, no. 2, pp. 232-234.
96. Waldenstrom A., Genneback N., Hellman U., Ronquist G. Cardiomyocyte microvesicles contain DNA/RNA and convey biological messages to target cells. *PLoS One*, 2012, Vol. 7, no. 4, e34653. doi: 10.1371/journal.pone.0034653.
97. Wang B., Wu Z.H., Lou P.Y., Chai C., Han S.Y., Ning J.F., Li M. Human bone marrow-derived mesenchymal stem cell-secreted exosomes overexpressing microRNA-34a ameliorate glioblastoma development via down-regulating MYCN. *Cell. Oncol. (Dordr.)*, 2019, Vol. 42, no. 6, pp. 783-799.
98. Wang D., Na Q., Song G.Y., Wang L. Human umbilical cord mesenchymal stem cell-derived exosome-mediated transfer of microRNA-133b boosts trophoblast cell proliferation, migration and invasion in preeclampsia by restricting SGK1. *Cell Cycle*, 2020, Vol. 19, no. 15, pp. 1869-1883.
99. Wang F., Li L., Piontek K., Sakaguchi M., Selaru F.M. Exosome miR-335 as a novel therapeutic strategy in hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, 2018, Vol. 67, no. 3, pp. 940-954.
100. Wang G.K., Zhu J.Q., Zhang J.T., Li Q., Li Y., He J., Qin Y.W., Jing Q. Circulating microRNA: a novel potential biomarker for early diagnosis of acute myocardial infarction in humans. *Eur. Heart J.*, 2010, Vol. 31, no. 6, pp. 659-666.
101. Wang X., Li J., Dong K., Lin F., Long M., Ouyang Y., Wei J., Chen X., Weng Y., He T., Zhang H. Tumor suppressor miR-34a targets PD-L1 and functions as a potential immunotherapeutic target in acute myeloid leukemia. *Cell Signal*, 2015, Vol. 27, no. 3, pp. 443-452.
102. Wang Z., Gerstein M., Snyder M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nat. Rev. Genet.*, 2009, Vol. 10, no. 1, pp. 57-63.
103. Westholm J.O., Lai E.C. Mirtrons: microRNA biogenesis via splicing. *Biochimie*, 2011, Vol. 93, no. 11, pp. 1897-904.
104. Wu D., Lu P., Mi X., Miao J. Exosomal miR-214 from endometrial stromal cells inhibits endometriosis fibrosis. *Mol. Hum. Reprod.*, 2018, Vol. 24, no. 7, pp. 357-365.
105. Wu Y., Yuan W., Ding H., Wu X. Serum exosomal miRNA from endometriosis patients correlates with disease severity. *Arch. Gynecol. Obstet.*, 2022, Vol. 305, no. 1, pp. 117-127.
106. Yang C., Lim W., Park J., Park S., You S., Song G. Anti-inflammatory effects of mesenchymal stem cell-derived exosomal microRNA-146a-5p and microRNA-548e-5p on human trophoblast cells. *Mol. Hum. Reprod.*, 2019, Vol. 25, no. 11, pp. 755-771.
107. Yang C., Tahiri H., Cai C., Gu M., Gagnon C., Hardy P. microRNA-181a inhibits ocular neovascularization by interfering with vascular endothelial growth factor expression. *Cardiovasc. Ther.*, 2018, Vol. 36, no. 3, e12329. doi: 10.1111/1755-5922.12329.
108. Yu X., Fang X., Gao M., Mi J., Zhang X., Xia L., Zhao Z., Albrecht E., Maak S., Yang R. Isolation and identification of bovine preadipocytes and screening of microRNAs associated with adipogenesis. *Animals (Basel)*, 2020, Vol. 10, no. 5, 818. doi: 10.3390/ani10050818.
109. Yuana Y., Bertina R.M., Osanto S. Pre-analytical and analytical issues in the analysis of blood microparticles. *Thromb. Haemost.*, 2011, Vol. 105, no. 3, pp. 396-408.
110. Zhang J., Li S., Li L., Li M., Guo C., Yao J., Mi S. Exosome and exosomal microRNA: trafficking, sorting, and function. *Genomics Proteomics Bioinformatics*, 2015, Vol. 13, no. 1, pp. 17-24.
111. Zhang L., Li H., Yuan M., Li D., Sun C., Wang G. Serum Exosomal MicroRNAs as Potential Circulating Biomarkers for Endometriosis. *Dis. Markers*, 2020, Vol. 2020, 2456340. doi: 10.1155/2020/2456340.
112. Zhang Y., Liu D., Chen X., Li J., Li L., Bian Z., Sun F., Lu J., Yin Y., Cai X., Sun Q., Wang K., Ba Y., Wang Q., Wang D., Yang J., Liu P., Xu T., Yan Q., Zhang J., Zen K., Zhang C.Y. Secreted monocytic miR-150 enhances targeted endothelial cell migration. *Mol. Cell*, 2010, Vol. 39, no. 1, pp. 133-144.
113. Zhang Y., Liu Y.J., Liu T., Zhang H., Yang S.J. Plasma microRNA-21 is a potential diagnostic biomarker of acute myocardial infarction. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.*, 2016, Vol. 20, no. 2, pp. 323-329.
114. Zhang Y., Zhang W., Zha C., Liu Y. Platelets activated by the anti- β 2GPI/ β 2GPI complex release microRNAs to inhibit migration and tube formation of human umbilical vein endothelial cells. *Cell. Mol. Biol. Lett.*, 2018, Vol. 23, 24. doi: 10.1186/s11658-018-0091-3.
115. Zhao H., Su W., Kang Q., Xing Z., Lin X., Wu Z. Natural killer cells inhibit oxaliplatin-resistant colorectal cancer by repressing WBSCR22 via upregulating microRNA-146b-5p. *Am. J. Cancer Res.*, 2018, Vol. 8, no. 5, pp. 824-834.

116. Zhu K.Y., Palli S.R. Mechanisms, Applications, and Challenges of Insect RNA Interference. *Annu Rev. Entomol.*, 2020, Vol. 65, pp. 293-311.
117. Zhu L., Kalimuthu S., Gangadaran P., Oh J.M., Lee H.W., Baek S.H., Jeong S.Y., Lee S.W., Lee J., Ahn B.C. Exosomes derived from natural killer cells exert therapeutic effect in melanoma. *Theranostics*, 2017, Vol. 7, no. 10, pp. 2732-2745.
118. Zitzer N.C., Garzon R., Ranganathan P. Toll-like receptor stimulation by micrnas in acute graft-vs.-Host disease. *Front. Immunol.*, 2018, Vol. 9, 2561. doi: 10.3389/fimmu.2018.02561.
119. Zou J., Peng H., Liu Y. The roles of exosomes in immunoregulation and autoimmune thyroid diseases. *Front. Immunol.*, 2021, Vol. 12, 757674. doi: 10.3389/fimmu.2021.757674.

Авторы:

Маркова К.Л. — к.б.н., младший научный сотрудник лаборатории межклеточных взаимодействий, отдел иммунологии и межклеточных взаимодействий ФГБНУ «Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии имени Д.О. Отта», Санкт-Петербург, Россия

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

Вашукова Е.С. — к.б.н., научный сотрудник отдела геномной медицины ФГБНУ «Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии имени Д.О. Отта», Санкт-Петербург, Россия

Authors:

Markova K.L., PhD (Biology), Junior Research Associate, Laboratory of Cell Interactions, Department of Immunology and Cell Interactions, D. Ott Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductology, St. Petersburg, Russian Federation

Zementova M.S., Research Assistant, Laboratory of Cell Interactions, Department of Immunology and Cell Interactions, D. Ott Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductology, St. Petersburg, Russian Federation

Vashukova E.S., PhD (Biology), Research Associate, Department of Genomic Medicine, D. Ott Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductology, St. Petersburg, Russian Federation

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

Сергей А.С. — д.м.н., профессор, заслуженный деятель науки РФ, руководитель отдела иммунологии и межклеточных взаимодействий ФГБНУ «Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии имени Д.О. Отта», Санкт-Петербург, Россия

Соколов Д.И. — д.б.н., профессор, заведующий лабораторией межклеточных взаимодействий, отдел иммунологии и межклеточных взаимодействий ФГБНУ «Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии имени Д.О. Отта», Санкт-Петербург, Россия

Pereviazkina M.A., Research Assistant, Laboratory of Cell Interactions, Department of Immunology and Cell Interactions, D. Ott Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductology, St. Petersburg, Russian Federation

Selkov S.A., PhD, MD (Medicine), Professor, Honored Scientist of Russian Federation, Head, Department of Immunology and Cell Interactions, D. Ott Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductology, St. Petersburg, Russian Federation

Sokolov D.I., PhD, MD (Biology), Professor, Head, Laboratory of Cell Interactions, Department of Immunology and Cell Interactions, D. Ott Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductology, St. Petersburg, Russian Federation

Поступила 25.11.2022
Принята к печати 20.02.2023

Received 25.11.2022
Accepted 20.02.2023

ПАТОФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ХРОНИЧЕСКИХ IgE-ОПОСРЕДОВАННЫХ РИНОСИНУСИТОВ БАКТЕРИАЛЬНОЙ ЭТИОЛОГИИ

Смирнова О.В., Маркина А.Н., Парилова О.В.

Научно-исследовательский институт медицинских проблем Севера – обособленное подразделение ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр “Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук”», г. Красноярск, Россия

Резюме. Хронический риносинусит (ХРС) – заболевание, обусловленное воспалением придаточных пазух носа и ее слизистой оболочки с длительностью симптомов заболевания более 4 недель непрерывно. Целью нашего исследования явилось изучение основных патофизиологических особенностей хронических IgE-опосредованных риносинуситов бактериальной этиологии по данным публикаций в Российской Федерации и в мире. Был произведен анализ англо- и русскоязычных публикаций с использованием следующих баз данных: PubMed, MedLine, Web of Science, Russian Science Citation Index, Springer, Scopus, Scientific Research, Google Scholar, Crossref, eLibrary. Были изучены эпидемиологические особенности ХРС в Российской Федерации, бактериальные возбудители и патофизиологическая характеристика ХРС. За последние 20 лет наблюдается увеличение распространенности ХРС в 2 раза. С ростом возрастного интервала повышается и распространенность заболевания. Хронический риносинусит занимает первое место среди всех хронических заболеваний в оториноларингологии Аллергический ринит, астма, бронхоэктатическая болезнь, иммунодефициты, муковисцидоз, первичная цилиарная дискинезия и аутоиммунные заболевания связаны с ХРС. Наиболее часто бактериальными возбудителями являются *S. aureus*, *Staphylococcus epidermidis* и *Propionibacterium acnes*, *Prevotella*, *Streptococcus* и *Veillonella*, а из грамотрицательных бактерий такие, как *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*), *Proteus mirabilis* и *Klebsiella pneumoniae*. Золотистый стафилококк (*S. aureus*) участвует в патогенезе носовых полипов. Колонизирующие бактерии могут способствовать патогенезу ХРС посредством образования биопленок. Изменение синоназального микробиома также может способствовать развитию ХРС. В патогенезе ХРС играет значимую роль ассоциация мутаций генов CRS и CFTR. Предложена «гипотеза иммунного барьера» как причины ХРС. Снижение экспрессии SPINK5, нарушение передачи сигналов STAT3, полиморфизм рецептора горького вкуса T2R38, были выявлены в патогенезе ХРС. Ген T2R38 стимулирует эпителиальные клетки к выработке закиси азота с бактерицидным действием, способствует мукоцилиарной элиминации патогенов и профилактике

Адрес для переписки:

Смирнова Ольга Валентиновна
Научно-исследовательский институт медицинских проблем Севера
660022, Россия, г. Красноярск,
ул. Партизана Железняка, 3г.
Тел.: 8 (913) 567-97-19.
E-mail: ovsmirnova71@mail.ru

Address for correspondence:

Olga V. Smirnova
Research Institute of Medical Problems of the North
3g Partizan Zheleznyak St
Krasnoyarsk
660022 Russian Federation
Phone: +7 (913) 567-97-19.
E-mail: ovsmirnova71@mail.ru

Образец цитирования:

О.В. Смирнова, А.Н. Маркина, О.В. Парилова
«Патофизиологические особенности хронических IgE-опосредованных риносинуситов бактериальной этиологии» // Медицинская иммунология, 2024. Т. 26, № 1. С. 27-36.
doi: 10.15789/1563-0625-PFO-2634

© Смирнова О.В. и соавт., 2024
Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

O.V. Smirnova, A.N. Markina, O.V. Parilova
“Pathophysiological features of chronic IgE-mediated rhinosinusitis of bacterial etiology”, *Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2024, Vol. 26, no. 1, pp. 27-36.
doi: 10.15789/1563-0625-PFO-2634

© Smirnova O.V. et al., 2024
The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License
DOI: 10.15789/1563-0625-PFO-2634

инфекций верхних дыхательных путей, полиморфизм данного гена предрасполагает больных к грамотрицательным инфекционным заболеваниям, поэтому является фактором риска развития ХРС. Кроме этого дефицит антител является наиболее распространенным первичным иммунодефицитом, связанным с ХРС.

Таким образом, патогенез хронических IgE-опосредованных риносинуситов бактериальной этиологии связан с дефектами врожденного иммунитета и мукоцилиарного клиренса, влиянием синоназального микробиома, аллергии и генетических факторов. Комплексная оценка перечисленных факторов необходима для разработки новых профилактических и терапевтических вариантов коррекции ХРС.

Ключевые слова: хронический риносинусит, полипы, синоназальный микробиом, биологические пленки, генетические факторы, иммунитет

PATHOPHYSIOLOGICAL FEATURES OF CHRONIC IgE-MEDIATED RHINOSINUSITIS OF BACTERIAL ETIOLOGY

Smirnova O.V., Markina A.N., Parilova O.V.

Research Institute of Medical Problems of the North, Krasnoyarsk Research Center, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Krasnoyarsk, Russian Federation

Abstract. Chronic rhinosinusitis (CRS) is a disease caused by inflammation of the paranasal sinuses and its mucous membrane lasting for more than 4 weeks continuously. The aim of our study was to examine the main pathophysiological features of chronic IgE-mediated rhinosinusitis of bacterial etiology according to publications in the Russian Federation and in the world. A search was made through English- and Russian-language literature sources using the following databases: PubMed, MedLine, Web of Science, Russian Science Citation Index, Springer, Scopus, Scientific Research, Google Scholar, Crossref, eLibrary. The epidemiological features of CRS in the Russian Federation, bacterial pathogens and pathophysiological characteristics of CRS were analyzed. A 2-fold increase in the prevalence of CRS was registered over the past 20 years. Prevalence of the disease increases at longer age ranges. Chronic rhinosinusitis ranks first among all chronic diseases in the field of otorhinolaryngology. Allergic rhinitis, asthma, bronchiectasia, immunodeficiencies, cystic fibrosis, primary ciliary dyskinesia and autoimmune diseases are associated with CRS. The most common bacterial pathogens are *S. aureus*, *Staphylococcus epidermidis* and *Propionibacterium acnes*, *Prevotella*, *Streptococcus* and *Veillonella*, and some Gram-negative bacteria, e.g., *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*), *Proteus mirabilis* and *Klebsiella pneumoniae*. *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) is involved in pathogenesis of nasal polyps. The colonizing bacteria may contribute to pathogenesis of CRS through the formation of biofilms. Alterations in the sino-nasal microbiome may also contribute to the development of CRS. An association of the CRS and CFTR gene mutations plays a significant role in the pathogenesis of chronic rhinosinusitis. An “immune barrier hypothesis” has been proposed as potential mechanism of CRS. Reduced expression of SPINK5, impaired STAT3 signaling, and T2R38 bitter taste receptor polymorphism have been identified in the pathogenesis of CRS. The T2R38 gene stimulates epithelial cells to produce nitrous oxide with a bactericidal effect, promotes mucociliary elimination of pathogens and prevention of upper respiratory tract infections, the polymorphism of this gene predisposes patients to gram-negative infectious diseases, and therefore is a risk factor for the development of CRS. In addition, antibody deficiency is the most common primary immunodeficiency associated with CRS.

Hence, the pathogenesis of chronic IgE-mediated rhinosinusitis of bacterial etiology is associated with defects in innate immunity and mucociliary clearance, influence of the sinonasal microbiome, allergies, and genetic factors. A comprehensive assessment of these factors is necessary for the development of new preventive and therapeutic options for the correction of CRS.

Keywords: chronic rhinosinusitis, polyps, sinonasal microbiome, biological films, genetic factors, immunity

Введение

Хронический риносинусит (ХРС) – сложное заболевание, обусловленное воспалением придаточных пазух носа и ее слизистой оболочки с длительностью симптомов заболевания более 4 недель непрерывно (ЕР3ОS, 2012) [30]. У пациентов обнаруживаются стойкие синоназальные симптомы, длящиеся не менее 12 недель с объективными признаками воспаления, подтверждаемыми назальной эндоскопией или компьютерной томографией околоносовых пазух [10, 32, 38, 54]. Патогенез ХРС является многофакторным, при этом инфекционные, генетические и экологические его компоненты играют важную роль в течение заболевания. Тем не менее точный вклад каждого из этих патогенетических факторов неясен. Также до конца неизвестна роль бактериальных инфекций при ХРС, особенно при хронических IgE-опосредованных риносинуситах. **Целью нашего исследования** явилось изучение основных патофизиологических особенностей хронических IgE-опосредованных риносинуситов бактериальной этиологии по данным публикаций в Российской Федерации и в мире.

Материалы и методы

Был произведен анализ англо- и русскоязычных публикаций с использованием следующих баз данных: PubMed, MedLine, Web of Science, Russian Science Citation Index, Springer, Scopus, Scientific Research, Google Scholar, Crossref, eLibrary. Поиск осуществлялся по следующим ключевым словам на русском и английском языках: хронический синусит, гиперпластический синусит, хронический риносинусит, chronic sinusitis, epidemiology, hyperplastic sinusitis, chronic rhinosinusitis. Согласно критериям поиска найдено 98 233 статей. Однако цели настоящего исследования соответствовало 5780 работ, среди которых в базах было найдено: PubMed (2520 статей), Web of Science (1640), Scopus (720), Google Scholar (1300), Crossref (1225), eLibrary (55). Из них проанализировано 54 полнотекстовые статьи на русском и английском языках.

Результаты

Эпидемиологические особенности ХРС в Российской Федерации

Выделяют ХРС без полипов носа и ХРС с полипами носа, которые составляют примерно 60% и 38% всех случаев ХРС соответственно [30]. Хронический IgE-опосредованный риносинусит в подавляющем большинстве случаев – это ХРС

с полипами носа. Данное хроническое заболевание приводит к снижению качества жизни, вызывая нарушение носового дыхания, плохой сон, усталость и соматические боли [39]. Трудно поддающийся лечению ХРС может быть связан с гуморальным иммунодефицитом [32]. Небольшой процент пациентов с рефрактерным синуситом имеют генетические нарушения, такие как муковисцидоз (МВ) и первичная цилиарная дискинезия (ПЦД), которые повышают риск развития этого заболевания [28]. По данным Ю.К. Янова и соавт. (2003), в России синуситом страдают около 10 млн человек в год, а среди пациентов, госпитализированных в ЛОР-стационары, данная патология составляет от 15% до 36% [5]. А.С. Лопатин и В.П. Гамов (2011) выявили увеличение распространенности ХРС в 2 раза за последние 20 лет [3]. Имеется корреляция между распространенностью ХРС и возрастом пациентов, с увеличением возрастного интервала повышается и распространенность: от 20 до 29 лет она составляет 2,7%, от 50 до 59 лет – 6,6%. Согласно исследованиям А.Б. Туровского (2013), [4] синусит занимает первое место среди всех хронических заболеваний в оториноларингологии (146/1000 населения, т. е. 14,6%). В среднем около 5-15% взрослого населения и 5% детей страдают той или иной формой синусита. За последние 10 лет отмечается рост заболеваемости синуситами в 3 раза, а больные, госпитализированные по поводу патологии околоносовых пазух, составляют примерно 2/3 от общего числа пациентов специализированных стационаров. По результатам московского исследования О.А. Иванченко и А.С. Лопатина (2013), среди опрошенных пациентов симптомы ХРС отмечали 35% респондентов [1]. А.А. Кривопапов и соавт. (2016) представили результаты крупного эпидемиологического исследования распространенности заболеваний ЛОР-органов в 32 субъектах РФ, в структуре которого воспалительные заболевания носа и околоносовых пазух составили $32,31 \pm 2,02\%$ [2].

Аллергический ринит, астма, бронхоэктатическая болезнь, иммунодефициты, муковисцидоз, первичная цилиарная дискинезия и аутоиммунные заболевания, такие как эозинофильный гранулематоз с полиангиитом, связаны с ХРС, но их причинно-следственная связь в развитии ХРС не доказана [8, 29, 30, 32]. Некоторые из этих сопутствующих и сосуществующих заболеваний могут либо предрасполагать пациентов с ХРС к развитию инфекционных обострений, либо быть следствием этого хронического синоназального состояния. Бронхиальная астма и ХРС часто сосуществуют; обострения астмы связаны с обо-

стрениями ХРС, а лечение ХРС приводит к улучшению контроля над астмой [14, 35]. У большого процента пациентов с бронхоэктазами имеется ХРС, а наличие ХРС связано с более тяжелым течением бронхоэктатической болезни [19]. Нарушения мукоцилиарной транспортной системы также могут способствовать развитию ХРС. Причиной муковисцидоза является дефект гена трансмембранного регулятора проводимости при муковисцидозе (CFTR) и специфические мутации в DNAH5 и DNAH11 обнаруживаются у пациентов с ХРС [21].

Бактериальные возбудители ХРС

Для пациентов с ХРС характерны синоназальные симптомы, при этом может развиваться эпизодическое ухудшение симптомов, характеризующееся гнойными выделениями из полости носа. Из пораженной и здоровой слизистой оболочки придаточных пазух у лиц, страдающих ХРС, выделяют аэробные, и анаэробные виды бактерий [11]. *S. aureus* является наиболее частым микроорганизмом, выделяемым у пациентов с ХРС [12]. На основании молекулярной диагностики *S. aureus*, *Staphylococcus epidermidis* и *Propionibacterium acnes* являются многочисленными микроорганизмами у пациентов с ХРС [12, 36]. Патогены, которые культивируются у пациентов с ХРС, включают коагулазоотрицательный стафилококк, *Haemophilus influenzae* (*H. influenzae*) и *Streptococcus pneumoniae* [36, 46]. Кроме того, у пациентов с ХРС с гнойными выделениями повышено количество видов *Prevotella*, *Streptococcus* и *Veillonella*, что было выявлено с помощью количественной ДНК-ПЦР [36]. В отличие от обычных обострений внебольничного риносинусита, нозокомиальные обострения риносинусита вызываются преимущественно грамотрицательными бактериями, такими как *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*), *Proteus mirabilis* и *Klebsiella pneumoniae* [43, 51]. Микроорганизмы, которые не обнаруживаются ни с помощью обычного посева, ни с помощью молекулярной диагностики, вероятно, являются частью резидентного микробиома и, вероятно, помогают поддерживать здоровье слизистой оболочки носовых пазух. Кроме того, возможно развитие варианта, когда некоторые непатогенные бактерии в слизистой оболочке пазухи действительно ответственны за процесс заболевания ХРС, но их точная роль неясна.

Пациенты с ХРС с полипами носа обычно отмечают жалобы на боли в точках проекции околоносовых пазух и гнойного отделяемого, преимущественно жалуются на заложенность носа с гипосмией или аносмией [29]. Пациенты с ХРС имеют некоторую степень персистирующих си-

ноназальных симптомов. У пациентов, которые жалуются на постоянную заложенность носа и наличие густых «арахисовых» выделений в полости носа или околоносовых пазух носа, следует исключать аллергический грибковый риносинусит [32].

Патофизиологическая характеристика ХРС

Точный патогенез ХРС остается неизвестным [27]. Высокая распространенность ХРС при наследственных синдромах предполагает, что генетические факторы, вероятно, играют роль в развитии ХРС [15]. На сегодняшний день ассоциация мутаций генов *CRS* и *CFTR* является наиболее многообещающей находкой при ХРС благодаря повторению данных в различных исследованиях [21]. Высокая распространенность ХРС у пациентов с муковисцидозом позволяет предположить, что ген *CFTR* может быть вовлечен в патогенез ХРС. Остальные данные по генетическим исследованиям при ХРС немногочисленны и противоречивы, также отсутствуют биомаркеры для диагностики обострений инфекционного ХРС в настоящее время. Патофизиология ХРС сложна и основана на фундаментальном принципе дисфункционального взаимодействия между организмом хозяина и факторами окружающей среды на границе слизистой оболочки придаточных пазух носа. В настоящее время было предложено несколько патогенетических механизмов [17]. Золотистый стафилококк (*S. aureus*) участвует в патогенезе носовых полипов [17]. Как локальные, так и системные IgE к энтеротоксинам *S. aureus* были обнаружены у пациентов с ХРС с полипами носа, а уровни специфического IgE прямо коррелировали с эозинофильным воспалением 2-го типа, характерным для данного заболевания [9, 48]. Роль бактерий при ХРС до конца неясна. Полость пазухи не является стерильной зоной и заселена различными видами бактерий. Полимикробные виды бактерий были идентифицированы в здоровой и пораженной слизистой оболочке пазух с помощью традиционных культуральных и молекулярных методов [12, 36, 46]. Предполагается, что колонизирующие бактерии могут способствовать патогенезу ХРС посредством образования биопленок. Биопленки состоят из слоев живых бактерий в матрице из белка и нуклеиновой кислоты. Эти бактериальные бляшки на поверхности слизистых оболочек позволяют инфекционным патогенам развивать устойчивость к противомикробным препаратам и уклоняться от иммунитета хозяина [16]. Данные бактерии метаболически малоактивны, что потенциально могут привести к инфекционным обострениям ХРС. Исследования показывают,

что бактериальные биопленки являются причиной стойкого ХРС [42]. Изменение синоназального микробиома также может способствовать развитию ХРС. У пациентов с ХРС наблюдается дисбиоз микробиома, который характеризуется снижением бактериального разнообразия и увеличением относительной численности определенных видов бактерий по сравнению со здоровыми людьми [6, 44]. Эта измененная микробная флора способствует фенотипическим различиям между пациентами с ХРС и пациентами без ХРС.

Была предложена «гипотеза иммунного барьера» как причины ХРС [17]. Эпителиальные клетки секретируют молекулы неспецифической защиты. Небольшие пептиды, такие как дефензины и кателицидины, и крупные ферментные белки, такие как лизоцим и лактоферрин, убивают бактерии [48]. Нарушения барьерной функции эпителиальных клеток приводят к нарушению работы иммунной системы и способствуют колонизации инфекционными патогенами, такими как бактерии и грибки. Семейство белков S100, продуцируемых эпителиальными клетками, играет важную роль в дифференцировке клеток, барьерной функции и антимикробной активности. Исследования у пациентов с ХРС показали снижение уровней белков S100, псориазина и кальпротектина, что потенциально может повышать восприимчивость к инфекциям [6, 47]. Другое семейство секретируемых эпителием белков, называемое PLUNC (продуценты – эпителиоциты неба, легких и носа), которое участвует во врожденном иммунитете, было значительно уменьшено в ткани полипа у пациентов с ХРС с полипами носа [41, 49]. Дополнительные аномалии врожденной иммунной системы, которые могут способствовать инфицированию ХРС, включают снижение экспрессии SPINK5, гена, ответственного за экспрессию эпителиального белка LEKT1, который снижен при ХРС, но важен для функции эпителиального барьера [37]. Высвобождение защитной молекулы эпителиальной клетки-хозяина регулируется преобразователем сигнала и активатором транскрипции 3 (STAT3) [8], нарушение передачи сигналов STAT3 было выявлено при ХРС и являлось причиной снижения высвобождения антимикробного белка из эпителиальных клеток в полипах носа [31]. Важным рецептором врожденного иммунитета, который может играть роль в патогенезе ХРС, является рецептор горького вкуса T2R38, который активируется бактериальными продуктами [25]. T2R38 стимулирует эпителиальные клетки к выработке закиси азота с бактерицидным действием, способствует мукоцилиарной элиминации патогенов и профилак-

тике инфекций верхних дыхательных путей [7]. Полиморфизм гена T2R38 (генотип TAS2R38) делает рецептор горького вкуса неактивным и предрасполагает больных к грамотрицательным инфекционным заболеваниям, таким образом, является фактором риска развития ХРС [49]. Все эти дефекты барьерной функции эпителиальных клеток создают нарушение врожденной иммунной системы и способствуют уязвимости слизистой оболочки придаточных пазух носа для патогенов и микробной колонизации. Следовательно, существует множество патогенетических факторов, делающих человека восприимчивым к ХРС. Пациенты с трудно поддающимся лечению ХРС должны быть обследованы на наличие основного иммунодефицита [32]. Дефицит антител является наиболее распространенным первичным иммунодефицитом, связанным с ХРС. Недавний метаанализ дефицита антител у пациентов с ХРС показал комбинированную распространенность дефицита IgG, IgA и IgM у 13% пациентов с рецидивирующим ХРС и у 23% пациентов с трудно поддающимся лечению ХРС [40]. Дефицит антител может возникать из-за дефекта продукции антител (общий переменный иммунодефицит, дефицит IgA или IgM) или из-за плохой функции антител (дефицит специфических антител). Общий переменный иммунодефицит (ОВИН) является наиболее частым симптоматическим дефицитом антител и характеризуется снижением уровня IgG более чем на 2 стандартных отклонения в сочетании с низким уровнем IgA и/или IgM. Кроме того, при ОВИН нарушается ответ на полисахаридные и белковые антигены. Более 50% пациентов с ОВИН имеют ХРС [23]. Распространенность селективного дефицита IgA (уровень IgA < 7 мг/дл) оценивается в 1 на 300-700 человек [13, 18]. У большинства пациентов с дефицитом IgA симптомы отсутствуют; однако примерно у 7% пациентов с ХРС может быть дефицит IgA [40]. Дефицит специфических антител определяется как нарушение ответа на иммунизацию полисахаридными антигенами, такими как пневмовакс, при нормальных количественных уровнях иммуноглобулинов (IgG, IgA и IgM) и наличии в анамнезе рецидивирующих или длительных синусно-пульмональных инфекций [22, 30]. Адекватный ответ на полисахаридную вакцину точно не определен; тем не менее 50-70% пневмококковых серотипов должны быть выше 1,3 мкг/мл после вакцинации [13]. В ретроспективном обзоре пациентов с трудно поддающимся лечению ХРС до 23% пациентов были отмечены, как имеющие дефицит специфических антител [22]. Пациентам с ХРС и иммунной дисфунк-

цией может потребоваться более агрессивная стратегия лечения, которая включает профилактическое назначение антибиотиков для предотвращения повторных инфекционных обострений ХРС, раннюю антибактериальную терапию на основе посева, заместительную терапию иммуноглобулином (Ig) или раннее хирургическое лечение [23].

Для коррекции патогенетических нарушений пациентам с рецидивирующими инфекционными обострениями ХРС или трудно поддающимся лечению ХРС, у которых эмпирическое лечение с применением комбинации местных или пероральных антибиотиков со стероидами или без них неэффективно, эффективной будет антибактериальная терапия под контролем посева. При подозрении на сопутствующий иммунодефицит требуется интерпретирование клинического анализа крови с дифференциальным количественным определением иммуноглобулинов (IgG, IgA и IgM) и скринингом на ВИЧ для исключения приобретенного иммунодефицита [32]. Варианты коррекции патофизиологических нарушений при ХРС включают местные интраназальные стероиды, пероральные антибиотики, местные антибиотики, промывание носа физиологическим раствором, пероральные стероиды или комбинацию пероральных антибиотиков и стероидов [32]. Трудно поддающийся лечению ХРС может потребовать хирургического вмешательства, а ХРС на фоне основного иммунодефицита может потребовать профилактического назначения антибиотиков или заместительной терапии иммуноглобулинами. Местные интраназальные стероиды помогают уменьшить воспаление околоносовых пазух носа и могут быть чрезвычайно эффективны у некоторых пациентов с ХРС [32, 34]. Промывание носа физиологическим раствором удаляет слизь и способствует очищению от бактериальных биопленок [38]. Комбинация местных интраназальных стероидов и промывания носа солевым раствором может быть патогенетически эффективным при ХРС, но среди этих двух вариантов терапии местные интраназальные стероиды лучше в качестве монотерапии [20]. Хотя лечение пероральными антибиотиками обычно является первым терапевтическим вариантом, используемым при ХРС, в литературе отсутствуют убедительные доказательства использования пероральных антибиотиков при ХРС. Существует только 3 плацебо-контролируемых исследования, оценивающих лечение пероральными антибиотиками при ХРС [50, 52, 53]. Обзор системных антибиотиков при ХРС показал ограниченную эффективность терапии макролида-

ми [33]. Длительное применение азитромицина для лечения ХРС не показало преимуществ по сравнению с плацебо [52]. Другое исследование, показало значительное влияние перорального приема метилпреднизолона и доксициклина на размер носовых полипов, назальные симптомы, слизистые и системные маркеры воспаления у пациентов с ХРС и полипами носа [50]. Пероральные антибиотики могут быть наиболее полезными при инфекционных обострениях ХРС, и особенно у пациентов с гнойным отделяемым. Местные антибиотики могут быть эффективны при ХРС после хирургического лечения [26]. Пероральные стероиды могут обеспечить симптоматическое облегчение заложенности носа и улучшить обоняние у пациентов с ХРС с полипами носа [32]. Ретроспективные исследования, изучающие совместное применение пероральных антибиотиков и стероидов у пациентов с ХРС, продемонстрировали устранение патогенетических нарушений, улучшение клинических симптомов, снижение рентгенологической тяжести синусита, и снижение вероятности операции на околоносовых пазухах [24, 45]. Профилактическое назначение антибиотиков или заместительная терапия иммуноглобулинами следует рассматривать у пациентов с рецидивирующими обострениями инфекционного ХРС и доказанным дефектом гуморального иммунитета [32]. Любой пациент с ХРС с подозрением на иммунодефицит или с наличием атипичных или оппортунистических патогенов в слизистой оболочке носовых пазух должен исследоваться на аллергии, заболевания носовых пазух и иммунодефицит. Если считается, что анатомические аномалии, такие как искривление носовой перегородки, являются причиной рецидивирующих инфекционных обострений ХРС, то, для устранения патофизиологических нарушений требуется хирургическая коррекция [32]. Кроме того, любой пациент, у которого в раннем возрасте диагностированы полипы носа или ХРС, а также при культивировании обнаруживается *P. aeruginosa* из полости носа, обследуется на муковисцидоз [32].

Обсуждение

Хронические IgE-опосредованные риносинуситы бактериальной этиологии — это чаще ХРС с полипами носа. За последние 20 лет наблюдается увеличение распространенности ХРС в 2 раза. С ростом возрастного интервала повышается и распространенность заболевания. Хронический риносинусит занимает первое место среди всех хронических заболеваний в отори-

ноларингологии Аллергический ринит, астма, бронхоэктатическая болезнь, иммунодефициты, муковисцидоз, первичная цилиарная дискинезия и аутоиммунные заболевания связаны с ХРС. Наиболее часто бактериальными возбудителями являются *S. aureus*, *Staphylococcus epidermidis* и *Propionibacterium acnes*, *Prevotella*, *Streptococcus* и *Veillonella*, а из грамотрицательных бактерий такие, как *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*), *Proteus mirabilis* и *Klebsiella pneumoniae*. Золотистый стафилококк (*S. aureus*) участвует в патогенезе носовых полипов. Колонизирующие бактерии могут способствовать патогенезу ХРС посредством образования биопленок. Изменение синоназального микробиома также может способствовать развитию ХРС. В патогенезе ХРС играет значимую роль ассоциация мутаций генов CRS и CFTR. Предложена «гипотеза иммунного барьера» как причины ХРС. Снижение экспрессии SPINK5, нарушение передачи сигналов STAT3, полиморфизм рецептора горького вкуса

T2R38, были выявлены в патогенезе ХРС. Ген T2R38 стимулирует эпителиальные клетки к выработке закиси азота с бактерицидным действием, способствует мукоцилиарной элиминации патогенов и профилактике инфекций верхних дыхательных путей, полиморфизм данного гена предрасполагает больных к грамотрицательным инфекционным заболеваниям, поэтому является фактором риска развития ХРС. Кроме этого дефицит антител является наиболее распространенным первичным иммунодефицитом, связанным с ХРС.

Таким образом, патогенез хронических IgE-опосредованных риносинуситов бактериальной этиологии связан с дефектами врожденного иммунитета и мукоцилиарного клиренса, влиянием синоназального микробиома, аллергии и генетических факторов. Комплексная оценка перечисленных факторов необходима для разработки новых профилактических и терапевтических вариантов коррекции ХРС.

Список литературы / References

1. Иванченко О.А., Лопатин А.С. Эпидемиология хронического риносинусита: результаты многоцентрового опроса взрослой популяции // Российская ринология, 2013. Т. 21, № 3. С. 16-19. [Ivanchenko O.A., Lopatin A.S. Epidemiology of chronic rhinosinusitis: results of a multicentre survey of the adult population. *Rossiyskaya rinologiya = Russian Rhinology*, 2013, Vol. 21, no. 3, pp. 16-19. (In Russ.)]
2. Кривопапов А.А. Определения, классификации, этиология и эпидемиология риносинуситов (обзор литературы) // Российская ринология. 2016. Т. 24, № 2. С. 39-45. [Krivopalov A.A. Definitions, classifications, etiology and epidemiology of rhinosinusitis (literature review). *Rossiyskaya rinologiya = Russian Rhinology*, 2016, Vol. 24, no. 2, pp. 39-45. (In Russ.)]
3. Лопатин А.С., Гамов В.П. Острый и хронический риносинусит. М.: МИА, 2011. 76 с. [Lopatin A.S., Gamov V.P. Acute and chronic rhinosinusitis]. Moscow: MIA, 2011. 76 p.
4. Туровский А.Б. Хронический синусит. Новые возможности медикаментозной терапии // Поликлиника, 2013. Т. 2, № 1. С. 66-68. [Turovsky A.B. Chronic sinusitis. New possibilities of drug therapy. *Poliklinika = Polyclinic*, 2013, Vol. 2, no. 1, pp. 66-68. (In Russ.)]
5. Янов Ю.К., Рязанцев С.В., Страчунский Л.С., Стецюк О.У., Каманин Е.И., Тарасов А.А., Отвагин И.В., Крюков А.И., Богомильский М.Р. Практические рекомендации по антибактериальной терапии синусита. Пособие для врачей // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия, 2003. Т. 5, № 2. С. 167-174. [Yanov Yu.K., Ryzantsev S.V., Strachounski L.S., Stetsiuk O.U., Kamanin E.I., Tarasov A.A., Otvagin I.V., Kryukov A.I., Bogomilsky M.R. Practical guidelines on antimicrobial therapy of sinusitis. Guidelines for clinicians. *Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya khimioterapiya = Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy*, 2003, Vol. 5, no. 2, pp. 167-174. (In Russ.)]
6. Abreu N.A., Nagalingam N.A., Song Y., Roediger F.C., Pletcher S.D., Goldberg A.N., Lynch S.V. Sinus microbiome diversity depletion and *Corynebacterium tuberculostearicum* enrichment mediates rhinosinusitis. *Sci. Transl. Med.*, 2012, Vol. 4, 151ra124. doi: 10.1126/scitranslmed.3003783
7. Adappa N.D., Zhang Z., Palmer J.N., Kennedy D.W., Doghramji L., Lysenko A., Reed D.R., Scott T., Zhao N.W., D. Owens BS, Robert J. Lee PhD, Noam A. Cohen MD. The bitter taste receptor T2R38 is an independent risk factor for chronic rhinosinusitis requiring sinus surgery. *Int. Forum Allergy Rhinol.*, 2014, Vol. 4, pp. 3-7.
8. Akdis C.A., Bachert C., Cingi C., Dykewicz M.S., Hellings P.W., Naclerio R.M., Schleimer R.P., Ledford D. Endotypes and phenotypes of chronic rhinosinusitis: a PRACTALL document of the European Academy of Allergy and Clinical Immunology and the American Academy of Allergy, Asthma & Immunology. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2013, Vol. 131, pp. 1479-1490.

9. Bachert C., Gevaert P., Holtappels G., Johansson S.G., van Cauwenberge P. Total and specific IgE in nasal polyps is related to local eosinophilic inflammation. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2001, Vol. 107, pp. 607-614.
10. Bhattacharyya N., Fried M.P. The accuracy of computed tomography in the diagnosis of chronic rhinosinusitis. *Laryngoscope*, 2003, Vol. 113, pp. 125-129.
11. Bhattacharyya N. Bacterial infection in chronic rhinosinusitis: a controlled paired analysis. *Am. J. Rhinol.*, 2005, Vol. 19, pp. 544-548.
12. Boase S., Foreman A., Cleland E., Tan L., Melton-Kreft R., Pant H., Z Hu F., Ehrlich G.D., Wormald P.J. The microbiome of chronic rhinosinusitis: culture, molecular diagnostics and biofilm detection. *BMC Infect. Dis.*, 2013, Vol. 13, 210. doi: 10.1186/1471-2334-13-210.
13. Bonilla F.A., Khan D.A., Ballas Z.K., Chinen J., Frank M.M., Hsu J.T., Keller M., Kobrynski L.J., Komarow H.D., Mazer B., Nelson Jr R.P., Orange J.S., Routes J.M., Shearer W.T., Sorensen R.U., Verbsky J.W., Bernstein D.I., Blessing-Moore J., Lang D., Nicklas R.A., Oppenheimer J., Portnoy J.M., Randolph C.R., Schuller D., Spector S.L., Tilles S., Wallace D. Practice parameter for the diagnosis and management of primary immunodeficiency. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2015, Vol. 136, pp. 1186-1205.e78.
14. Brinke A., Sterk P.J., Masclee A.M., Spinhoven P., Schmidt J.T., Zwinderman A.H., Rabe K.F., Bel E.H. Risk factors of frequent exacerbations in difficult-to-treat asthma. *Eur. Respir. J.*, 2005, Vol. 26, pp. 812-818.
15. Cohen N.A., Wideltz J.S., Chiu A.G., Palmer J.N., Kennedy D.W. Familial aggregation of sinonasal polyps correlates with severity of disease. *Otolaryngol. Head Neck Surg.*, 2006, Vol. 134, pp. 601-604.
16. Costerton J.W., Stewart P.S., Greenberg E.P. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*, 1999, Vol. 284, pp. 1318-1322.
17. Fokkens W.J., Lund V.J., Mullol J., Bachert C., Alobid I., Baroody F., Cohen N., Cervin A., Douglas R., Gevaert P., Georgalas C., Goossens H., Harvey R., Hellings P., Hopkins C., Jones N., Joos G., Kalogjera L., Kern B., Kowalski M., Price D., Riechelmann H., Schlosser R., Senior B., Thomas M., Toskala E., Voegels R., Wang D.Y., Wormald P.J. European position paper on rhinosinusitis and nasal polyps 2012. *Rhinol. Suppl.*, 2012, Vol. 23, pp. 1-298.
18. Fried A.J., Bonilla F.A. Pathogenesis, diagnosis, and management of primary antibody deficiencies and infections. *Clin. Microbiol. Rev.*, 2009, Vol. 22, pp. 396-414.
19. Guilemany J.M., Angrill J., Alobid I., Centellas S., Pujols L., Bartra J., Bernal-Sprekelsen M., Valero A., Picado C., Mullol J. United airways again: high prevalence of rhinosinusitis and nasal polyps in bronchiectasis. *Allergy*, 2009, Vol. 64, pp. 790-797.
20. Harvey R., Hannan S.A., Badia L., Scadding G. Nasal saline irrigations for the symptoms of chronic rhinosinusitis. *Cochrane Database Syst. Rev.*, 2007, no. 3, CD006394. doi: 10.1002/14651858.CD006394.pub2.
21. Hsu J., Avila P.C., Kern R.C., Hayes M.G., Schleimer R.P., Pinto J.M. Genetics of chronic rhinosinusitis: state of the field and directions forward. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2013, Vol. 131, pp. 977-993.
22. Kashani S., Carr T.F., Grammer L.C., Schleimer R.P., Hulse K.E., Kato A., Kern R.C., Conley D.B., Chandra R.K., Tan B.K., Peters A.T. Clinical characteristics of adults with chronic rhinosinusitis and specific antibody deficiency. *J. Allergy Clin. Immunol. Pract.*, 2015, Vol. 3, pp. 236-242.
23. Khalid A.N., Mace J.C., Smith T.L. Outcomes of sinus surgery in ambulatory patients with immune dysfunction. *Am. J. Rhinol. Allergy*, 2010, Vol. 24, pp. 230-233.
24. Lal D., Scianna J.M., Stankiewicz J.A. Efficacy of targeted medical therapy in chronic rhinosinusitis, and predictors of failure. *Am. J. Rhinol. Allergy*, 2009, Vol. 23, pp. 396-400.
25. Lee R.J., Cohen N.A. Role of the bitter taste receptor T2R38 in upper respiratory infection and chronic rhinosinusitis. *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.*, 2015, Vol. 15, pp. 14-20.
26. Lim M., Citardi M.J., Leong J.L. Topical antimicrobials in the management of chronic rhinosinusitis: a systematic review. *Am. J. Rhinol.*, 2008, Vol. 22, pp. 381-389.
27. Mfuna-Endam L., Zhang Y., Desrosiers M.Y. Genetics of rhinosinusitis. *Curr. Allergy Asthma Rep.*, 2011, Vol. 11, pp. 236-246.
28. Min J.Y., Tan B.K. Risk factors for chronic rhinosinusitis. *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.*, 2015, Vol. 15, pp. 1-13.
29. Ocampo C.J., Grammer L.C. Chronic rhinosinusitis. *J. Allergy Clin. Immunol. Pract.*, 2013, Vol. 1, pp. 205-211.
30. Ocampo C.J., Peters A.T. Antibody deficiency in chronic rhinosinusitis: epidemiology and burden of illness. *Am. J. Rhinol. Allergy*, 2013, Vol. 27, pp. 34-38.
31. Peters A.T., Kato A., Zhang N., Conley D.B., Suh L., Tancowny B., Carter D., Carr T., Radtke M., Hulse K.E., Seshadri S., Chandra R., Grammer L.C., Harris K.E., Kern R., Schleimer R.P. Evidence for altered activity of the IL-6 pathway in chronic rhinosinusitis with nasal polyps. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2010, Vol. 125, pp. 397-403.e10.

32. Peters A.T., Spector S., Hsu J., Hamilos D.L., Baroody F.M., Chandra R.K., Grammer L.C., Kennedy D.W., Cohen N.A., Kaliner M.A., Wald E.R., Karagianis A., Slavin R.G. Diagnosis and management of rhinosinusitis: a practice parameter update. *Ann. Allergy Asthma Immunol.*, 2014, Vol. 113, pp. 347-385.
33. Piomchai P., Thanaviratananich S., Laopaiboon M. Systemic antibiotics for chronic rhinosinusitis without nasal polyps in adults. *Cochrane Database Syst. Rev.*, 2011, no. 5, CD008233. doi: 10.1002/14651858.CD008233.pub2.
34. Quinti I., Soresina A., Spadaro G., Martino S., Donnanno S., Agostini C., Claudio P., Franco D., Pesce A.M., Borghese F., Guerra A., Rondelli R., Plebani A. Long-term follow-up and outcome of a large cohort of patients with common variable immunodeficiency. *J. Clin. Immunol.*, 2007, Vol. 27, pp. 308-316.
35. Ragab S., Scadding G.K., Lund V.J., Saleh H. Treatment of chronic rhinosinusitis and its effects on asthma. *Eur. Respir. J.*, 2006, Vol. 28, pp. 68-74.
36. Ramakrishnan V.R., Hauser L.J., Feazel L.M., Ir D., Robertson C.E., Frank D.N. Sinus microbiota varies among chronic rhinosinusitis phenotypes and predicts surgical outcome. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2015, Vol. 136, pp. 334-342.e1.
37. Richer S.L., Truong-Tran A.Q., Conley D.B., Carter R., Vermeylen D., Grammer L.C., Peters A.T., Chandra R.K., Harris K.E., Kern R.C., Schleimer R.P. Epithelial genes in chronic rhinosinusitis with and without nasal polyps. *Am. J. Rhinol.*, 2008, Vol. 22, pp. 228-234.
38. Rosenfeld R.M., Piccirillo J.F., Chandrasekhar S.S., Brook I., Kumar K.A., Kramper M., Orlandi R.R., Palmer J.N., Patel Z.M., Peters A., Walsh S.A., Corrigan M.D. Clinical practice guideline (update): adult sinusitis. *Otolaryngol. Head Neck Surg.*, 2015, Vol. 152, pp. S1-S39.
39. Rudmik L., Smith T.L., Schlosser R.J., Hwang P.H., Mace J.C., Soler Z.M. Productivity costs in patients with refractory chronic rhinosinusitis. *Laryngoscope*, 2014, Vol. 124, pp. 2007-2012.
40. Schwitzguebel A.J., Jandus P., Lacroix J.S., Seebach J.D., Harr T. Immunoglobulin deficiency in patients with chronic rhinosinusitis: systematic review of the literature and meta-analysis. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2015, Vol. 136, pp. 1523-1531.
41. Seshadri S., Lin D.C., Rosati M., Carter R.G., Norton J.E., Suh L., Kato A., Chandra R.K., Harris K.E., Chu H.W., Peters A.T., Tan B.K., Conley D.B., Grammer L.C., Kern R.C., Schleimer R.P. Reduced expression of antimicrobial PLUNC proteins in nasal polyp tissues of patients with chronic rhinosinusitis. *Allergy*, 2012, Vol. 67, pp. 920-928.
42. Singhal D., Foreman A., Jarvis-Bardy J., Wormald P.J. Staphylococcus aureus biofilms: nemesis of endoscopic sinus surgery. *Laryngoscope*, 2011, Vol. 121, pp. 1578-1583.
43. Stein M., Caplan E.S. Nosocomial sinusitis: a unique subset of sinusitis. *Curr. Opin. Infect. Dis.*, 2005, Vol. 18, pp. 147-150.
44. Stevens W.W., Lee R.J., Schleimer R.P., Cohen N.A. Chronic rhinosinusitis pathogenesis. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2015, Vol. 136, pp. 1442-1453.
45. Subramanian H.N., Schechtman K.B., Hamilos D.L. A retrospective analysis of treatment outcomes and time to relapse after intensive medical treatment for chronic sinusitis. *Am. J. Rhinol.*, 2002, Vol. 16, pp. 303-312.
46. Thanasumpun T., Batra P.S. Endoscopically-derived bacterial cultures in chronic rhinosinusitis: a systematic review. *Am. J. Otolaryngol.*, 2015, Vol. 36, pp. 686-691.
47. Tieu D.D., Peters A.T., Carter R.G., Suh L., Conley D.B., Chandra R., Norton J., Grammer L.C., Harris K.E., Kato A., Kern R.C., Schleimer R.P. Evidence for diminished levels of epithelial psoriasin and calprotectin in chronic rhinosinusitis. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2010, Vol. 125, pp. 667-675.
48. Tripathi A., Conley D.B., Grammer L.C., Ditto A.M., Lowery M.M., Seiberling K.A., Yarnold P.A., Zeifer B., Kern R.C. Immunoglobulin E to staphylococcal and streptococcal toxins in patients with chronic sinusitis/nasal polyposis. *Laryngoscope*, 2004, Vol. 114, pp. 1822-1826.
49. Tsou Y.-A., Peng M.-T., Wu Y.-F., Lai C.-H., Lin C.-D., Tai C.-J., Tsai M.-H., Chen C.-M., Chen H.-C. Decreased PLUNC expression in nasal polyps is associated with multibacterial colonization in chronic rhinosinusitis patients. *Eur. Arch. Otorhinolaryngol.*, 2014, Vol. 271, pp. 299-304.
50. van Zele T.V., Gevaert P., Holtappels G., Beule A., Wormald P.J., Mayr S., Hens G., Hellings P., Ebbens F.A., Fokkens W., Cauwenberge P.V., Bachert C. Oral steroids and doxycycline: two different approaches to treat nasal polyps. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2010, Vol. 125, pp. 1069-1076.e4.
51. Vargas F., Nam Bui H., Boyer A., Bébear C.M., Lacher-Fougère S., De-Barbeyrac B.M., Salmi L.R., Traissac L., Gbikpi-Benissan G., Gruson D., Hilbert G. Transnasal puncture based on echographic sinusitis evidence in mechanically ventilated patients with suspicion of nosocomial maxillary sinusitis. *Intensive Care Med.*, 2006, Vol. 32, pp. 858-866.
52. Videler W.J., Badia L., Harvey R.J., Gane S., Georgalas C., van der Meulen F.W., Menger D.J., Lehtonen M.T., Toppila-Salmi S.K., Vento S.I., Hytönen M., Hellings P.W., Kalogjera L., Lund V.J., Scadding G., Mullol J., Fokkens W.J.

Lack of efficacy of long-term, low-dose azithromycin in chronic rhinosinusitis: a randomized controlled trial. *Allergy* 2011, Vol. 66, pp. 1457-1468.

53. Wallwork B., Coman W., Mackay-Sim A., Greiff L., Cervin A. A double-blind, randomized, placebo-controlled trial of macrolide in the treatment of chronic rhinosinusitis. *Laryngoscope*, 2006, Vol. 116, pp. 189-193.

54. Wuister A.M.H., Goto N.A., Oostveen E.J., de Jong W.U., van der Valk E.S., Kaper N.M., Aarts M.C.J., Grolman W., van der Heijden G.J.M.G. Nasal endoscopy is recommended for diagnosing adults with chronic rhinosinusitis. *Otolaryngol. Head Neck Surg.*, 2014, Vol. 150, pp. 359-364.

Авторы:

Смирнова О.В. — д.м.н., профессор, заведующая лабораторией клинической патофизиологии, Научно-исследовательский институт медицинских проблем Севера — обособленное подразделение ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук»», г. Красноярск, Россия

Маркина А.Н. — к.м.н., старший научный сотрудник лаборатории клинической патофизиологии, Научно-исследовательский институт медицинских проблем Севера — обособленное подразделение ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук»», г. Красноярск, Россия

Парилова О.В. — к.м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории клинической патофизиологии, Научно-исследовательский институт медицинских проблем Севера — обособленное подразделение ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук»», г. Красноярск, Россия

Authors:

Smirnova O.V., PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Laboratory of Clinical Pathophysiology, Research Institute of Medical Problems of the North, Krasnoyarsk Research Center, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Krasnoyarsk, Russian Federation

Markina A.N., PhD (Medicine), Senior Research Associate, Laboratory of Clinical Pathophysiology, Research Institute of Medical Problems of the North, Krasnoyarsk Research Center, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Krasnoyarsk, Russian Federation

Parilova O.V., PhD (Medicine), Leading Research Associate, Laboratory of Clinical Pathophysiology, Research Institute of Medical Problems of the North, Krasnoyarsk Research Center, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Krasnoyarsk, Russian Federation

ИММУНОМОДУЛИРУЮЩИЙ И РЕГЕНЕРАТИВНЫЙ ПОТЕНЦИАЛЫ ГРУДНОГО МОЛОКА, НЕДОНОШЕННОСТЬ И ДЕТСКОЕ СЕРДЦЕ

Павлюкова Е.Н.¹, Колосова М.В.², Неклюдова Г.В.¹, Карпов Р.С.¹

¹ Научно-исследовательский институт кардиологии ФГБНУ «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук», г. Томск, Россия

² ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Томск, Россия

Резюме. Расширение в современных условиях фундаментальных знаний по вопросам физиологии лактации, биологии стволовых клеток и экзосом грудного молока, нюансам взаимодействия организма матери и ребенка, начиная от внутриутробного периода, заканчивая постнатальным развитием, требует от научного сообщества и практикующих врачей прогрессивного, динамичного взгляда при анализе известных, общепринятых клинических явлений и закономерностей (развитие иммунной системы младенцев и детей раннего возраста, естественное и искусственное вскармливание, особенности постнатального развития и роста органов и тканей детей, рожденных недоношенными). Компоненты триады «мать – грудное молоко – младенец» тесно связаны друг с другом и влияют на траекторию развития младенца. Грудное молоко кормящей женщины по современным представлениям является «живой, метаболической/эндокринной сигнальной системой», может рассматриваться как «иммунный орган», значимый для постнатального роста и программирования организма недоношенного ребенка. Не меньшую ценность для постнатального развития в период новорожденности и раннего детства имеет активно обсуждаемое в специальной литературе явление – «микрохимеризм», вызванный грудным вскармливанием и играющий по современным представлениям ключевую роль в развитии иммунной системы и организма в целом. Течение постнатального онтогенеза сердечно-сосудистой системы при отсутствии протективного (иммуномодулирующего и регенеративного) эффекта грудного молока кормящей женщины на спонтанное, некорректируемое воздействие неблагоприятных факторов недоношенности приводит, с высокой вероятностью, к ремоделированию и дисфункции сердца у рожденных недоношенными детей, а в отдаленной перспективе и у взрослых. Поскольку молодые люди, родившиеся недоношенными, демонстрируют уникальный кардиальный фенотип, характеризующийся уменьшенным бивентрикулярным объемом, относительно более низкой систолической и диастолической функциями, непропорциональным увеличением мышечной

Адрес для переписки:

Павлюкова Елена Николаевна
Научно-исследовательский институт кардиологии
634012, Россия, г. Томск, ул. Киевская, 111а.
Тел.: 8 (960) 977-86-98.
E-mail: pavluk@cardio-tomsk.ru;
pavlyukovaelena@yandex.ru

Address for correspondence:

Elena N. Pavlyukova
Research Institute of Cardiology
111a Kiyevskaya St
Tomsk
634012 Russian Federation
Phone: +7 (960) 977-86-98.
E-mail: pavluk@cardio-tomsk.ru;
pavlyukovaelena@yandex.ru

Образец цитирования:

Е.Н. Павлюкова, М.В. Колосова, Г.В. Неклюдова, Р.С. Карпов «Иммуномодулирующий и регенеративный потенциалы грудного молока, недоношенность и детское сердце» // Медицинская иммунология, 2024. Т. 26, № 1. С. 37-56.
doi: 10.15789/1563-0625-IAR-2619

© Павлюкова Е.Н. и соавт., 2024
Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

E.N. Pavlyukova, M.V. Kolosova, G.V. Neklyudova, R.S. Karpov "Immunomodulatory and regenerative potentials of breast milk, prematurity and children's heart", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2024, Vol. 26, no. 1, pp. 37-56.
doi: 10.15789/1563-0625-IAR-2619

© Pavlyukova E.N. et al., 2024
The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License

DOI: 10.15789/1563-0625-IAR-2619

массы, клинически проявляющийся повышенным риском сердечно-сосудистых заболеваний, гипертонией и снижением толерантности к физической нагрузке, то целесообразно считать преждевременные роды хроническим заболеванием. Следовательно, именно естественное вскармливание, реализующее эволюционно целесообразный защитный механизм для детского сердца, следует относить к фундаментальным факторам, выполняющим жизненно важную роль в профилактике сердечно-сосудистых заболеваний у рожденных недоношенными детей и взрослых.

Ключевые слова: детское сердце, недоношенность, грудное молоко, микрохимеризм, экзосомы, грудное вскармливание

IMMUNOMODULATORY AND REGENERATIVE POTENTIALS OF BREAST MILK, PREMATURITY AND CHILDREN'S HEART

Pavlyukova E.N.^a, Kolosova M.V.^b, Neklyudova G.V.^a, Karpov R.S.^a

^a Research Institute of Cardiology, Tomsk National Research Medical Center, Tomsk, Russian Federation

^b Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation

Abstract. Recent expansion of fundamental knowledge on the physiology of lactation, and breast milk exosomes, stem cell biology, mother-child interactions from prenatal period to postnatal development requires a progressive, dynamic view from the scientific community and practicing physicians when analyzing known, generally accepted clinical phenomena and patterns (development of the immune system of infants and young children, natural and artificial feeding, features of postnatal development and growth of organs and tissues in children born prematurely). The components of the mother-breast-milk-infant triad are closely related to each other and influence developmental trajectory of the infant. According to modern concepts, breast milk of a nursing woman is a “living, metabolic / endocrine signaling system”, which may be considered an “immune organ” significant for postnatal growth and body programming of a premature baby. A valuable phenomenon of early postnatal development is actively discussed in the special literature, i.e., “microchimerism” caused by breastfeeding which, according to modern concepts, may play a key role in development of immune system and the whole body. Absence of protective (immunomodulatory and regenerative) effects of breast milk from a nursing woman on the spontaneous, uncorrectable impact of adverse factors of prematurity is likely predispose for remodeling and dysfunction of heart in prematurely born children, and, at longer range, in adults. The young children born prematurely show a unique cardiac phenotype characterized by reduced biventricular volume, relatively lower systolic and diastolic function, disproportionate muscle mass gain, clinically manifesting by increased risk of cardiovascular disease, hypertension, and decreased exercise tolerance. Hence, the premature birth may be considered a chronic disease state. Therefore, the natural feeding which provides a natural evolutionarily protective mechanism for the child's heart should be attributed to the fundamental factors that play a vital role in prevention of cardiovascular diseases in prematurely born children and at later life periods.

Keywords: baby heart, prematurity, breast milk, microchimerism, exosomes, breast feeding

Введение

Иммунная система начинает формироваться во внутриутробный период у плода [7, 52, 62, 74, 89], продолжая развитие постнатально, адаптируясь и активно развиваясь на протяжении первых лет жизни ребенка [62, 74]. Иммунная система у новорожденных, детей раннего возраста и недоношенных детей, остается незрелой, при этом незрелость иммунной системы наиболее вы-

ражена у рожденных преждевременно [74, 89]. К признакам незрелости иммунной системы у новорожденных, детей грудного и раннего возрастов относятся дисфункция В-лимфоцитов (недостаточная по количеству и специфичности выработка антител (функция синтеза IgG1, IgG3 созревает к одному-двум годам), задержка выработки IgG2, IgG4 (функция созревает к трем-семи годам), ограниченное переключение изотипов синтезируемых антител (IgM, IgG)) [62],

функциональная несостоятельность клеточно-опосредованного иммунного ответа (возможности эффекторных Т-клеток, снижение активности NK-клеток). В младенчестве в ограниченных количествах вырабатываются белки системы комплемента, интерферон- γ , секреторный иммуноглобулин А, интерлейкины (IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, IL-10), фактор некроза опухоли TNF α , лактоферрин, лизоцим [62, 74]. У недоношенных детей уменьшен пул нейтрофилов, моноцитов и их предшественников, снижены уровни гранулоцитарного колониестимулирующего (G-CSF) и гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего факторов (GM-CSF) [62, 74]. Ряд скомпрометированных функций нейтрофилов (производство резервных фагоцитов и гидроксильных радикалов в ответ на влияние инфекционных факторов; способность к миграции и формированию внеклеточных ловушек) у ребенка «созревает» в течение первых шести месяцев жизни [7, 62, 74, 89].

В связи с вышеизложенным особое значение приобретает утверждение следующего характера – грудное молоко кормящей ребенка матери рассматривается как новый «иммунный орган» ребенка [60, 87]. Грудное молоко представляет собой динамичную, сложную, «живую» жидкость [21, 60], содержит биохимические и клеточные компоненты, обеспечивая не только иммунитет новорожденных детей и детей раннего возраста, но и влияя на развитие, программу дифференцировки и рост органов и тканей [21, 40, 87]. Постнатальный онтогенез сердечно-сосудистой системы при отсутствии протективного влияния грудного молока кормящей женщины на спонтанное, некорректируемое воздействие неблагоприятных факторов недоношенности приводит, с высокой вероятностью, к ремоделированию и дисфункции сердца у рожденных недоношенными детей, а в отдаленной перспективе – и у взрослых [37, 65]. Данные обстоятельства делают особо актуальным анализ механизмов реализации иммуномодулирующего и регенеративного эффектов грудного молока при развитии детского сердца в условиях недоношенности с целью обоснования мероприятий профилактики ранних дебютов сердечно-сосудистых заболеваний у рожденных преждевременно детей и взрослых.

Имуномодулирующий и регенеративный потенциалы грудного молока

Грудное молоко женщины содержит разнообразные типы материнских живых клеток, происходящих из молочной железы и крови кормящей женщины. Сообщается о существенных

различиях в содержании клеток в различных образцах грудного молока. Количество клеток варьирует от десяти тысяч до тринадцати миллионов в миллилитре грудного молока [25, 46, 49, 65]. Принимая во внимание ежедневное потребление грудного молока ребенком в объемах 470-1350 мл и тот факт, что свежее грудное молоко состоит на сорок-шестьдесят процентов из лейкоцитов, можно рассчитать содержание в грудном молоке количества лейкоцитов – ~ 260 000 лейкоцитов/мл. Потребление младенцами общего количества лейкоцитов грудного молока может составлять ежедневно до 351 млн/сутки [96, 101]. Более девяноста процентов лейкоцитов оказываются жизнеспособными клетками, реализующими иммуномодулирующие функции в организме ребенка [19, 48, 49, 90].

Зрелое грудное молоко человека богато моноцитами / макрофагами, нейтрофилами, Т-клетками, естественными киллерами (NK) и В-клетками [67]. Лимфоциты молозива представлены в большей степени Т-клетками, В-клетками и клетками киллерами. Т-клетки грудного молока вырабатывают весь спектр иммуnoreгуляторных белков и являются клетками иммунной памяти [91], В-клетки продуцируют иммуноглобулины (IgA, IgG и IgM) [67].

Формированию барьерной функции слизистой оболочки желудочно-кишечного тракта ребенка способствуют ряд факторов: употребление грудного молока, перистальтика желудочно-кишечного тракта, кислотность желудочного сока, слизь, выделяемая бокаловидными клетками в криптах, слой эпителиальных клеток кишечника, иммуноглобулин А [30]. Эффективность воздействия клеток молозива и грудного молока на новорожденных и детей раннего возраста зависит от возможности выживать их желудочно-кишечном тракте, чему способствует минимальная выработка соляной кислоты в течение нескольких первых месяцев жизни. Сразу после начала кормления ребенка рН может повышаться до шести единиц и возвращаться к норме через три часа [62]. Экспериментально установленные факты свидетельствуют: клетки грудного молока, выделяемые из желудка 2-недельных новорожденных после вскармливания молоком, сохраняют свою жизнеспособность на восемьдесят процентов [18]. Это весьма логично, поскольку известно, что кислотность желудочного сока детей в большей степени обеспечивается не хлористоводородной кислотой, а молочной, так как париетальные клетки еще не способны синтезировать HCl, а рН желудочного содержимого новорожденного находится в диапазоне от слабоосновного или ней-

трального до слабокислого (рН = 6). «В первые шесть-двенадцать часов жизни рН секрета у ребенка часов уменьшается до 1-2, затем в течение первой постнатальной недели достигает 4-6, к одному году снижается до 3-4» (цит.) [2]. Секреция соляной кислоты железами желудка зависит от вида вскармливания ребенка — она минимальна при естественном вскармливании, увеличивается при смешанном вскармливании примерно в два раза и еще более при искусственном (в три-шесть раз).

Различные исследования предоставлены доказательства, подтверждающие идею о возможности переноса содержащихся в грудном молоке клеток из слизистой оболочки кишечника в ткани младенца [79, 97]. Возможность проникновения иммунокомпетентных клеток молозива кормящей матери в кровотоки потомства доказана при использовании естественной метки (полового хроматина). Обнаруженное количество клеток молозива в кишечной стенке и кровеносном русле потомства составляет примерно двадцать пять процентов — в крови, один процент — в лимфе и около семидесяти процентов в кишечнике [91], поскольку во время лактации проницаемость эпителия молочной железы, эпителия кишечника младенца, а также концентрация иммунных и неиммунных клеток самые высокие [97].

Трансмиссионная и сканирующая электронная микроскопия позволяют обнаружить в эпителиальном слое кишечника вскармливаемого грудным молоком потомства материнские клетки, попавшие из просвета их кишечника [91]. Клетки грудного молока матери не подвергаются деградации [62, 91], хорошо перенося изменение рН в желудке и кишечнике ребенка и оставаясь неповрежденными клетками с ядрами, не утрачивают способность к фагоцитозу [62].

Иммунные клетки грудного молока могут сохраняться целостными в пищеварительном тракте новорожденных в течение шести дней [19]. Посредством диапедеза иммунные клетки грудного молока пересекают слизистую кишечника, попадают в кровотоки, где обеспечивают активный иммунитет и далее проникают в отдаленные органы ребенка [12, 87, 90]. Лимфоидные клетки грудного молока кормящей матери без потери функциональных способностей проходят через стенку слизистой оболочки кишечника потомства [62], раздвигая структуры эпителиального пласта [91], а далее, находясь в иммунологически активной форме, поддерживают систему клеточного иммунитета. Микрофаги, Т- и В-клетки проникают в лимфоидные ткани кишечника потомства через межклеточные пространства, передают антиген-

специфические иммунные рецепторы неонатальным пролимфоцитам, чтобы вооружиться потенциалом распознавания чужеродных веществ. Неонатальные пролимфоциты после получения таких биохимических сигналов и прохождения многоступенчатого жизненного цикла превращаются в Т- и В-клетки потомства [91].

Грудное молоко содержит гетерогенную популяцию клеток, включая помимо иммунных клеток неиммунные клетки, плюрипотентные / мультипотентные стволовые клетки [21, 40, 60] (рис. 1). Методом проточной цитометрии в грудном молоке подтверждено существование двух основных групп клеток: клеток, полученных из молочной железы, и клеток, полученных из крови. Обе эти группы содержат гетерогенные стволовые клетки-предшественники — гемопоэтические стволовые клетки, стволовые клетки молочной железы, мезенхимальные стволовые клетки, клетки-предшественники нейронов и миоэпителиальные клетки-предшественники [67]. На долю иерархии стволовых и прогениторных стволовых клеток грудного молока (гемопоэтических, мезенхимальных, нейроэпителиальной линии) приходится до пяти-шести процентов всех клеток грудного молока женщины [40, 60, 97], что весьма существенно, принимая во внимание тот факт, что здоровые младенцы потребляют от 0,5 до 1,5 литров грудного молока в день [67]. Количество стволовых клеток, ежедневно поступающих в организм ребенка, может достигать миллиарда. Описано более высокое количество гемопоэтических стволовых клеток в зрелом грудном молоке по сравнению с молозивом [67]. Мезенхимальные стволовые клетки (CD44⁺, CD90⁺ и CD105⁺) составляют десять-пятнадцать процентов стволовых клеток, а их количество в зрелом молоке выше, чем в молозиве [67]. Стволовые клетки грудного молока остаются жизнеспособными в течение лишь нескольких часов после сцеживания грудного молока, обычно не выживая после его замораживания или пастеризации [56, 131].

В эксперименте доказана возможность пересечения слизистой оболочки желудочно-кишечного тракта посредством диапедеза и попадание в системный кровоток новорожденных, находящихся на естественном вскармливании, жизнеспособных многофункциональных стволовых клеток грудного молока. Далее клетки иммигрируют в различные органы, где и дифференцируются в функциональные клетки [60, 67]. В грудном молоке матерей, родивших недоношенных детей, также были обнаружены гемопоэтические,

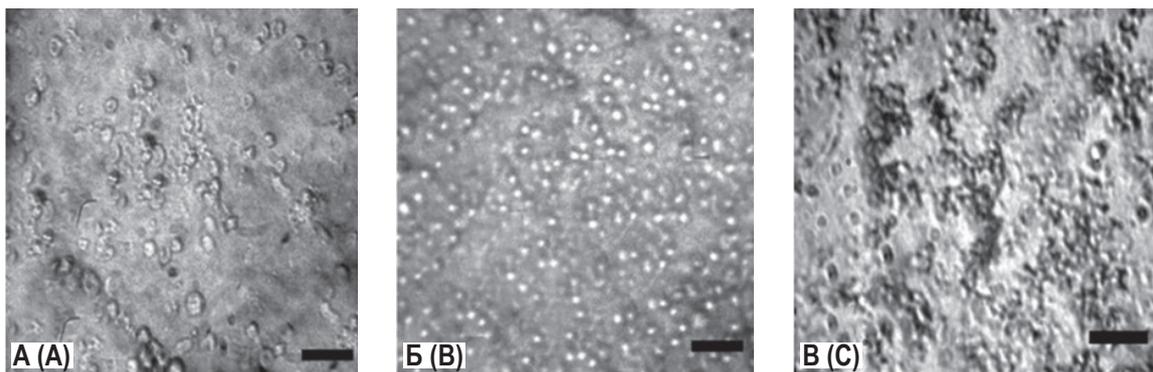


Рисунок 1. Мезенхимальные стволовые клетки, выделенные из грудного молока, в процессе культивирования: А – первый день культивирования, Б – третий день, В – видны тысячи мезенхимальных стволовых клеток, образующих крупные колонии [12]

Figure 1. Mesenchymal stem cells isolated from breast milk during cultivation: A, the first day of cultivation; B, the third day; C, thousands of mesenchymal stem cells forming large colonies are visible [12]

мезенхимальные стволовые клетки и иммунные клетки [60].

Микрохимеризм и грудное вскармливание

Микрохимеризм обусловлен поступлением материнских клеток в ткани плода, при этом материнские ДНК определяются у плодов с момента развития плацентарного кровообращения [7]. Во время физиологически текущей беременности в одном миллилитре материнской крови выявляется всего одна-две клетки плода, включая моноциты, В- и Т-лимфоциты, эритроциты с ядрами и гемопоэтические предшественники [24]. Представлены убедительные доказательства перемещения клеток грудного молока от матери к тканям и слизистой оболочке младенца [7, 37], лежащего в основе материнского микрохимеризма, вызванного грудным вскармливанием [20, 79], который может играть ключевую роль в развитии иммунитета у младенцев [20, 24, 34, 79].

Ярким примером микрохимеризма являются стволовые клетки, полученные из грудного молока (идеального источника стволовых клеток), обладающие иммунными и неопухолевыми свойствами, интегрирующиеся *in vivo* во многие ткани новорожденных и дифференцирующиеся в зрелые клетки [21, 40, 118]. Переданные младенцам стволовые клетки или предшественники из грудного молока могут легко переноситься в ткани ребенка и играть важную роль в созревании/регуляции иммунитета, иммунной толерантности к материнским антигенам [79], поскольку не экспрессируют антигены МНС [97].

Доказан факт выявления в тканях, в том числе, ткани сердца ребенка, клеток, принадлежащих его матери [7, 121]. Материнские клетки были обнаружены в ткани сердца новорожденных (включая недоношенных детей) в количе-

стве от 0-0,1-0,025% до 2,2% от общего числа клеток [108]. Существует обоснованное мнение, что полученные по материнской линии стволовые клетки сердца пополняют запасы кардиомиоцитов у потомства [36]. Миллиарды стволовых клеток, поступая с грудным молоком [128], выявляются между кардиомиоцитами в кровеносных сосудах [12] и в соединительной ткани детского сердца [18].

К клеткам грудного молока, принимающим участие в процессе микрохимеризма, относят не только прогениторные/стволовые клетки, но и зрелые иммунные клетки. Микрохимеризм (встраивание клеток в органы ребенка), вызванный грудным вскармливанием, может играть ключевую роль в иммунном развитии и защите от инфекционных заболеваний ребенка, в восстановлении/росте тканей кишечника [79]. Среди позитивных последствий микрохимеризма для плода и ребенка выделены замена поврежденных клеток в пострадавших тканях [108] и замена неполноценных иммунных клеток [59]. Грудное молоко играет роль материнской крови, поставляя материнские растворимые факторы (макромолекулы, иммуноглобулины, цитокины) и иммунологически активные клетки молока [79]. Материнские клетки и антигены влияют на иммунную систему плода посредством индукции толерантности и стимуляции адаптивного иммунного ответа [7, 20].

Материнские клетки могут сохраняться и циркулировать в течение длительного времени в организме ребенка. Материнские клетки были обнаружены через шестьдесят два года у потомства. Подсчитано теоретически, что вследствие материнского микрохимеризма одна из пяти тысяч клеток периферической крови (монону-

клеаров) является клеткой материнского происхождения [79]. Не только материнские клетки проникают в организм ребенка, но и фетальные клетки могут проникать в кровь и ткани матери, сохраняясь десятилетиями [58].

Материнский микрохимеризм, обусловленный грудным вскармливанием, может дополнять связанный с беременностью двунаправленный микрохимеризм, способствуя развитию толерантности, а также обучению и созреванию иммунной системы младенца, и, вероятно, для многих других соответствующих функций, которые в настоящее время неизвестны [97]. Учитывая способность эмбриональных клеток дифференцироваться в различные типы клеток сердца, включая кардиомиоциты [58] и разнообразие клеточных популяций в грудном молоке (от лимфоцитов до эмбриональных и мезенхимальных стволовых клеток), необходимы дополнительные исследования, чтобы выяснить, как микрохимерные клетки молока могут влиять на здоровье и болезни в течение жизни [97].

Нейтрофилы, моноциты, макрофаги грудного молока восполняют недостатки функций клеток недоношенных детей, являясь более активными и подвижными, участвуя в иммунном ответе у младенцев [67]. Макрофаги грудного молока, составляя до восьмидесяти процентов клеток молозива и переходного грудного молока, также принимают участие в иммунной защите младенца, демонстрируя очевидные способности к фагоцитозу. Обилие моноцитов/макрофагов в грудном молоке позволяют отнести их в воспалительным (CD16) и невоспалительным (CD16⁺) макрофагам. Хотя постоянное количество моноцитов/макрофагов, обнаруженных в ткани молочной железы, происходит из периферической крови, кишечника или лимфоидной ткани, связанной с носоглоткой, часть из них локально образуется в ткани молочной железы. Макрофаги грудного молока способны спонтанно продуцировать гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF). В присутствии экзогенного интерлейкина-4 (IL-4) макрофаги грудного молока дифференцировались в CD1⁺ DC и демонстрировали способность стимулировать Т-клетки [67].

Таким образом, клетки грудного молока кормящей матери весьма успешно восполняют функциональную несостоятельность незрелой иммунной системы детей раннего возраста, находящихся на естественном вскармливании, участвуют в формировании активного иммунного ответа, который недостаточно сформирован, и

вносят определенных вклад в развитие органов и тканей младенцев [67].

Биологически активные компоненты, факторы роста, гормоны, цитокины, хемокины грудного молока

Грудное молоко обеспечивает детей, вскармливаемых грудью, не только иммунными клетками материнского происхождения, но и растворимыми биологически активными компонентами, факторами роста, гормонами, цитокинами, хемокинами [21, 34]. Цитокины, присутствующие в грудном молоке, представляют собой небольшие растворимые гликопротеины, которые действуют как аутокринно-паракринные факторы, связываясь со специфическими клеточными рецепторами, управляя развитием и функционированием иммунной системы. Они существуют как посредники для укрепления иммунной системы новорожденных, взаимодействуя с другими иммунными компонентами. В частности, в молозиве присутствует ряд воспалительных цитокинов, таких как интерлейкины IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12, фактор некроза опухоли TNF α , интерферон IFN γ и иммуносупрессивный цитокин IL-10, который уменьшает воспаление. Основным источником цитокинов является молочная железа и лейкоциты, выделенные из грудного молока. Экзосомы переносят цитокины (IL-1 β , IL-1 α , TNF, IL-6), фактор роста эндотелия сосудов (VEGF) и хемокины (IL-8) [8].

Грудное молоко содержит комплекс факторов роста, присутствующих в очень высоких концентрациях после рождения. Некоторые из этих факторов роста способствуют пролиферации и дифференцировке эпителиальных клеток и модулируют иммунный ответ слизистой оболочки — например, трансформирующий фактор роста TGF- β . TGF- β также является иммуносупрессивным цитокином, участвующим в регуляции иммунных клеток, таких как лимфоциты, макрофаги и дендритные клетки, которые могут вызывать чрезмерные воспалительные реакции [25].

Лактоферрин также является компонентом врожденной иммунной системы, присутствует в наибольших количествах в человеческом молозиве и материнском молоке во время лактации. Лактоферрин проявляет противовоспалительные свойства, отмечена высокая экспрессия рецептора лактоферрина во всех тканях организма, включая сердце и сосудистую систему [37]. Олигосахариды грудного молока участвуют в стимулировании NO-опосредованной вазодилатации, способствуя, таким образом, поддержанию гемодинамики и нормальному развитию и росту сердца и сосудов у младенцев [37].

Поскольку активные формы кислорода в организме недоношенных детей могут привести к повреждению основных макромолекулярных компонентов, включая ДНК, чтобы преодолеть эти негативные эффекты в грудном молоке присутствует эволюционно целесообразная система антиоксидантной защиты [50].

Экзосомы грудного молока

Исследованиями последних лет в области биологии экзосом установлено: внеклеточные пузырьки производятся всеми известными организмами, имеют важное значение для межклеточной коммуникации и физиологии, изменяя свой состав в зависимости от различных условий и факторов [81, 106]. Экзосомы включают в себя широкий спектр микрочастиц, могут быть классифицированы на три отдельных класса: микровезикулы, экзосомы и апоптотические тельца. Микровезикулы имеют диаметр от 50 нм до 1 мкм. Экзосомы представляют собой частицы

диаметром от 30 до 150 нм и выводятся из клеточного компартмента путем образования мультивезикулярных тел. Грудное молоко представляет собой биологическую жидкость, обогащенную экзосомами [81] (рис. 2). Содержащиеся в грудном молоке внеклеточные везикулы формируют иммунную систему ребенка, находящегося на естественном вскармливании [67, 93]. Экзосомы грудного молока могут впоследствии быть обнаружены в широком спектре различных органов, таких как сердце, селезенка, легкие и мозг ребенка [69, 112].

Различные клетки выделяют во внеклеточную среду внеклеточные пузырьки, включая иммунные клетки (Т-, В-лимфоциты, нейтрофилы) (в том числе, грудного молока кормящей женщины), реализуя таким образом иммунные функции (антигенпрезентацию, активацию, индукцию толерантности и подавление иммунных реакций) [13, 16, 85, 86, 114, 119]. Внеклеточные

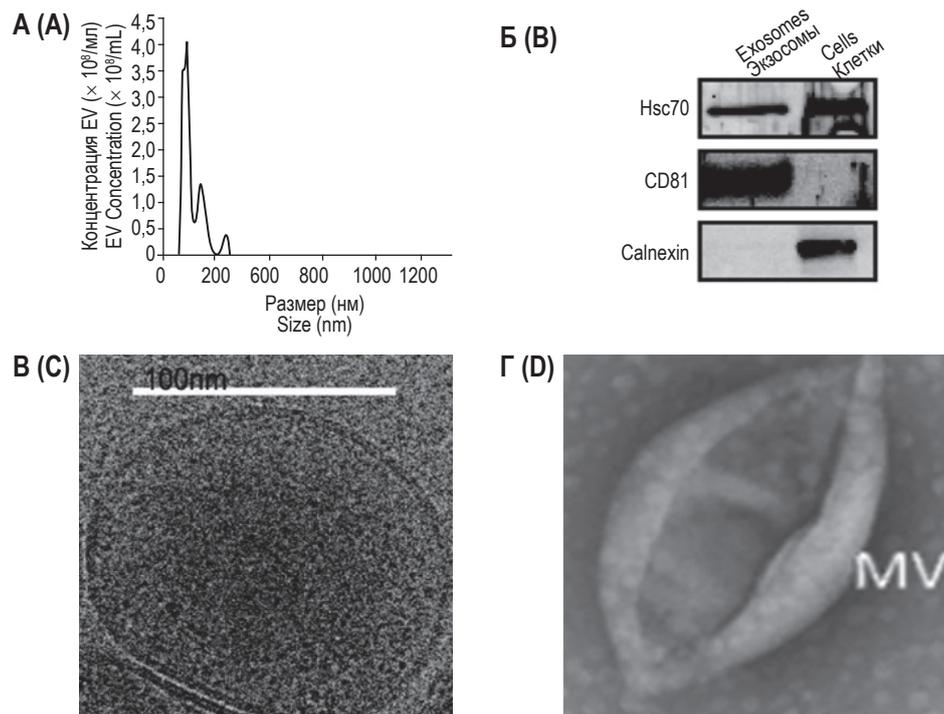


Рисунок 2. А – распределение экзосом грудного молока кормящей женщины по размеру и частоте обнаружения [93]. Б – экзосомы грудного молока положительны для Hsc70 и CD81, но отрицательны для белка эндоплазматического ретикулума (calnexin) [61]. В – экзосомы, выделенные из грудного молока кормящей женщины (данные трансмиссионной электронной микроскопии), содержатся в количестве $3-9 \times 10^8$ частиц в миллилитре [61, 70]. Г – по данным электронной микроскопии экзосомы имеют характерную «чашеобразную» морфологию – форму уплощенной сферы, ограниченной липидным бислоем [105]

Figure 2. A, Distribution of breast milk exosomes of a nursing woman by size and frequency of detection [93]. B, Breast milk exosomes are positive for Hsc70 and CD81, but negative for endoplasmic reticulum protein (calnexin) [61]. C, Exosomes isolated from breast milk of a nursing woman (transmission electron microscopy data) are contained in an amount of $3-9 \times 10^8$ particles per milliliter [61, 70]. D, According to electron microscopy data, exosomes have a characteristic "cup-shaped" morphology – the shape of a flattened sphere bounded by a lipid bilayer [105]

везикулы грудного молока, выделяемые лейкоцитами, играют важную роль в регуляции врожденного и приобретенного иммунитета новорожденного ребенка [131].

Доказано, что внеклеточные пузырьки, выделяемые мезенхимальными стволовыми клетками, также являются важными компонентами для реализации паракринной иммуносупрессивной функции [42, 80, 103]. Показаны иммуносупрессивные свойства мезенхимальных стволовых клеток, выражающиеся в способности оказывать антипролиферативное влияние на лимфоциты, ингибировать активацию и ответ Т-клеток и клеток памяти; понижать секрецию IFN γ и усиливать (либо не изменять) секрецию IL-4, способствуя переключению иммунного ответа с Th1-опосредованного (с выделением провоспалительных цитокинов) на Th2-опосредованный (с выделением противовоспалительных цитокинов) [1, 10, 92, 100].

Установлена циркуляция с кровотоком свободных внеклеточных нуклеиновых кислот экзогенного и эндогенного происхождения. Источником плазменной вкДНК могут быть процессы гибели клеток в организме и деградации их хроматина, например апоптоз лимфоцитов у новорожденных. Появление вкДНК в плазме крови возможно вследствие активной экскреции ДНК фибробластами, лимфоцитами (ДНК представлена высокомолекулярной хромосомной и экстрахромосомной фракциями, выделена митохондриальная ДНК, кольцевые ядерные ДНК) посредством секреции внеклеточных ловушек ДНК и везикулярного транспорта (виртосомы, экзосомы) [38]. Экзосомы грудного молока также содержат генетический материал (некодирующие РНК (lncRNAs), ДНК, мРНК, микроРНК (miRNAs/MIRS)) [81, 112], осуществляя регуляцию экспрессии генов, обладая биологической активностью и стабильностью в кислых условиях желудочно-кишечного тракта ребенка [35, 67].

Грудное молоко содержит широкий спектр «некодирующих» видов РНК, действующих как альтернативный путь, способствующий программированию иммунитета у младенцев [81, 112]. «Некодирующие» РНК грудного молока представлены соединениями — длинная некодирующая РНК (lncRNA), малая интерферирующая РНК (siRNA), piwi-взаимодействующая РНК (piRNA, piwi-interacting RNA), кольцевая РНК (Circular RNA (circRNA)). Каждый из вариантов нкРНК выполняет регуляторные функции, причем lncRNAs и circRNAs являются наиболее широко изученными. Регуляторному эффекту lncRNAs приписывают различные способы дей-

ствия — от стабилизации, поддержания и ремоделирования петель хроматина до связывания микроРНК [112]. Признается роль lncRNAs в регуляции генов, поскольку они могут взаимодействовать с белками, ДНК и РНК, влиять на экспрессию мРНК, функцию хроматина и сигнальные пути [81, 112]. Содержание lncRNA NORAD грудного молока (длинная некодирующая РНК (lncRNA)) [112] повышается при гипоксических условиях. lncRNA может участвовать в перинатальный период в борьбе новорожденных с высоким уровнем кислорода, которому недоношенные подвергаются после рождения. Наличие lncRNA NORAD в экзосомах грудного молока вместе с антиоксидантами грудного молока может помочь новорожденному адаптироваться к более высоким уровням окислительного стресса, который зафиксирован при искусственном вскармливании недоношенных детей. В то же время в грудном молоке матерей, родивших преждевременно детей с низкой, очень низкой и экстремально низкой массой тела, обнаружено снижение уровня lncRNA NORAD [81].

МикроРНК грудного молока и микроРНК клеток молочной железы, по-видимому, происходят из клеток, обеспечивающих иммунитет. МикроРНК представляют собой очень короткие молекулы РНК (длиной 20-24 нуклеотида) [81, 112]. Экзосомы, полученные из грудного молока, содержат в основном miR-148a-3p, miR-22-3p, miR-200a-3p, miR-146b-5p, miR-30d-5p, let-7a-5p, miR-30a-5p, let-7f-5p, let-7b-5p и miR-21-5p, которые формируют иммунную систему новорожденных. Ряд микроРНК ограничивает выработку цитокинов, ингибируя пролиферацию Т-клеток или активацию В-клеток. Другие микроРНК, полученные из экзосом грудного молока, индуцировали активацию, пролиферацию и дифференцировку В- и Т-клеток [35, 67].

Примечательно, что miRNA-22 и miRNA-148a содержатся в большом количестве в экзосомах грудного молока при вскармливании детей, рожденных с очень низкой и экстремально низкой массой тела. miRNA-22 определяется в высоких концентрациях в ткани сердца, играет важную роль в его ремоделировании, регулирует экспрессию генов, участвующих в гипертрофическом ответе, реорганизации саркомера и сдвиге метаболической программы во время ремоделирования сердца. miR-22-3p связана с дифференцировкой стволовых клеток в тканях человека, включая ткани сердца; ослабляет ишемически — реперфузионное повреждение миокарда посредством реализации противовоспалительного механизма. miR-148a-3p, определяющаяся в экзосомах груд-

ного молока при вскармливании недоношенного ребенка, аналогично связана со снижением воспалительной реакции в ткани сердца, играет существенную роль в дифференцировке эмбриональных клеток. Семейство miRNA (320a, 378a-3p, 30d-5p, 30a-5p), содержание представителей которого в грудном молоке женщины при вскармливании детей, рожденных крайне недоношенными, весьма существенно, бесспорно, играет важную роль в пролиферации и дифференцировке клеток [50, 55, 73].

Триста тридцать микроРНК идентифицированы в экзосомах грудного молока матерей, вскармливающих недоношенных детей [55]. МикроРНК экзосом грудного молока при вскармливании детей, рожденных недоношенными и доношенными, могут способствовать миграции клеток [130]. Сверхэкспрессия miRNA-22 в экзосомах грудного молока, получаемого при вскармливании детьми, рожденными с очень низкой и экстремально низкой массой тела, по-видимому, способствует росту, увеличению веса, созреванию тканей, ослаблению воспалительных реакций, определяя адаптивные функции для постнатального роста и созревания недоношенных детей [73].

В экзосомах также обнаружена ДНК — митохондриальная, однопочечная и двухпочечная [126]. Хотя точные молекулярные механизмы «загрузки» ДНК в везикулярные пузырьки до настоящего времени недостаточно хорошо известны, подтвержден эффект взаимодействия экзосом с клетками-реципиентами, проявляющийся в переносе генетической информации и влиянии на экспрессию белков в клетках [11, 54, 57, 61, 68, 95, 109]. Доказаны позитивные паракринные эффекты, оказываемые непосредственно кардиомиоцитами [100].

Экзосомы грудного молока кормящей женщины принято считать естественным средством передачи генетического материала младенцам. Установлен факт выживания и сохранения сложного состава экзосом человеческого молока при пищеварении в желудке у недоношенного ребенка и ребенка раннего возраста, при действии секретов поджелудочной железы [55, 66, 70]. «Выживая» в системе пищеварения у ребенка, экзосомы грудного молока кормящей женщины далее попадают путем эндоцитоза в клетки кишечника [55, 95, 111], а затем в систему циркуляции через этап эндоцитоза эндотелиальными клетками сосудов, осуществляя в последующем иммунопротекторные функции и способствуя развитию тканей ребенка [14, 15, 32, 82, 113]. Биологические функции экзосом по доставке РНК, белков и сигнальных молекул в различные

типы клеток обуславливают их высокий потенциал по применению в качестве терапевтических агентов [8].

Детские смеси, используемые для вскармливания детей первого года жизни, не только содержат недостаточное количество биологически активных микроРНК, поскольку экзосомы и микроРНК в детских формулах либо не обнаруживаются [64, 73], либо обнаруживаются в ничтожно малых концентрациях (например, miR-148a, miR-125b) [83, 102, 129], но и имеют совершенно иной профиль выделенных из смесей микроРНК по сравнению с грудным молоком, что потенциально пагубно сказывается на росте, развитии и защите ребенка [14, 15, 98]. При использовании соевых формул неблагоприятные эффекты вскармливания младенцев (вследствие (агглютинации) экзосом лектинами соевых смесей) усугубляются [84]. Следовательно, коррекция состава или обогащение детских формул микроРНК подобно составу грудного молока женщины, весьма актуальны [41].

Грудное вскармливание, недоношенность и детское сердце

В настоящее время хорошо известно, что, по сравнению с доношенными сверстниками, дети и взрослые, родившиеся преждевременно, подвергаются более высокому риску долгосрочных осложнений со здоровьем, затрагивающих различные системы органов. С точки зрения сердечно-сосудистого здоровья, крупнейшие популяционные исследования продемонстрировали более высокую частоту ишемической болезни сердца у взрослых, родившихся недоношенными, в то время как ряд отдельных когортных исследований и систематических обзоров выявили повышенную распространенность сердечно-метаболических факторов риска у детей и молодых людей, родившихся недоношенными. Молодые люди, родившиеся недоношенными, демонстрируют уникальный кардиальный фенотип, характеризующийся уменьшенным бивентрикулярным объемом, относительно более низкой систолической и диастолической функцией и непропорциональным увеличением мышечной массы, что может клинически проявляться повышенным риском сердечно-сосудистых заболеваний, гипертонии и снижением толерантности к физической нагрузке. Подобные последствия для сердца и сосудов, по-видимому, являются результатом раннего ремоделирования сердца из-за преждевременных родов и связанных с ними сопутствующих заболеваний [37].

Необходимо отметить, что установлено влияние используемых при изготовлении пластико-

вых медицинских устройств, приборов / потребительских товаров химических веществ (фталатов и бисфенолов), применяемых для осуществления лечебного процесса и ухода за детьми, рожденными преждевременно с низкой, очень низкой и экстремально низкой массой тела, в последующем могут способствовать неблагоприятным трансформациям сердечно-сосудистой системы недоношенных детей (в том числе снижению контрактильности детского сердца) [94]. Вышеупомянутые химических вещества оказывают биологическое действие посредством ряда механизмов: взаимодействия с ядерными рецепторами, рецепторами гормонов (нарушая гомеостаз гормонов), факторами транскрипции, с ионными каналами; повреждения внутриклеточных сигнальных путей; альтерации интеркалированных дисков с последующим нарушением эффективности межклеточной коммуникации [94].

В клинических исследованиях с применением неинвазивной ультразвуковой технологии диагностики «след пятна» (Speckle Tracking Imaging – 2D Strain), посвященных изучению становления ротационных механизмов ЛЖ, нами были описаны и классифицированы четыре модели вращательного движения ЛЖ, одновременно существующие у детей, рожденных недоношенными, включая ранее отмечавшееся только при патологии у взрослых добровольцев вращательное движение верхушки в систолу «по часовой стрелке» (названный «реверсивным» (четвертым) типом в оригинальной авторской классификации). Количество «реверсивных» типов (4-го типа) вращения ЛЖ оказалось существенно ниже у детей, рожденных недоношенными и получавших грудное молоко [6] (схема 1).

Пониманию выявленных закономерностей контрактильно-ротационных процессов способствуют фундаментальные знания по патофизиологии ремоделирования ЛЖ при недоношенности. В частности, в качестве особенностей и характера динамического изменения морфологии и физиологических функций в неонатальный период выделяет функциональную и гистологическую незрелость миокарда, гипертрофию, увеличенное отложение интерстициального коллагена и признаки фиброза миокарда, неблагоприятное влияние гипероксии (в том числе при респираторной поддержке) [31]. Среди важнейших факторов в условиях преждевременных родов в анамнезе, определяющих генез контрактильно-ротационных процессов, включая возникновение «реверсивного» варианта движения в систолу апикальных отделов, можно считать не только фиброз и гипертрофию ЛЖ [3,

125], но и хаотичность расположения мышечных волокон [3], уменьшение [125] и незавершенную дифференцировку кардиомиоцитов [3], сниженное количество сократительных миофибрилл, незрелость межклеточных связей [124]. При проведении исследования морфологии сердец детей, рожденных на 22-27-й неделе гестации, на «ультраструктурном уровне выявлены признаки незавершенной дифференцировки кардиомиоцитов в виде отсутствия миофибрилл в околядерной зоне с локализацией тонких миофибриллярных структур под сарколеммой; хаотичное расположение миофибрилл, окруженных единичными полисомами. Обнаружены нарушения цитоархитектоники митохондрий в виде очагового просветления матрикса, вакуолизации и деструкции крист с образованием электронно-плотных включений в саркоплазме, разрушений наружной мембраны. В ядрах кардиомиоцитов детей, рожденных с экстремально низкой массой тела, преобладал гетерохроматин, ядерная мембрана большинства кардиомиоцитов формировала инвагинаты. Отмечалось неравномерное расширение перинуклеарных пространств, истончение пучков миофибрилл с потерей их параллельной ориентации. Выявленные морфологические признаки в совокупности приводят к снижению сократительной способности миокарда и развитию сердечной недостаточности на фоне незавершенной гестационной дифференцировки кардиомиоцитов» (цит.) [5]. Степень недоношенности (более низкий гестационный возраст) в дальнейшем оказалась связана с повышенным диффузным фиброзом миокарда, нарушением диастолической функции сердца у молодых взрослых, рожденных преждевременно [65], ремоделированием и возрастающими рисками ранних дебютов сердечно-сосудистых заболеваний [44, 47, 78].

Зафиксированное повышение количества случаев «детских типов» скручивания ЛЖ при недоношенности в детском возрасте (движение на уровне митрального клапана и верхушки сердца в систолу «против часовой стрелки» – в норме не встречается у здоровых взрослых добровольцев) [6] обязывает обратить внимание исследователей на состояние и природу изменений фиброзного остова детского сердца, включая cardiac fulcrum [71, 115, 116, 117], принимая во внимание тот факт, что фиброзный скелет сердца человека состоит из нескольких частей, образованных в эмбриональный период из разных, главным образом, внесердечных источников [71, 120]. «В пренатальном периоде онтогенеза и у новорожденных в отдельных структурах мягкого остова сердца – фиброзных кольцах и треугольни-

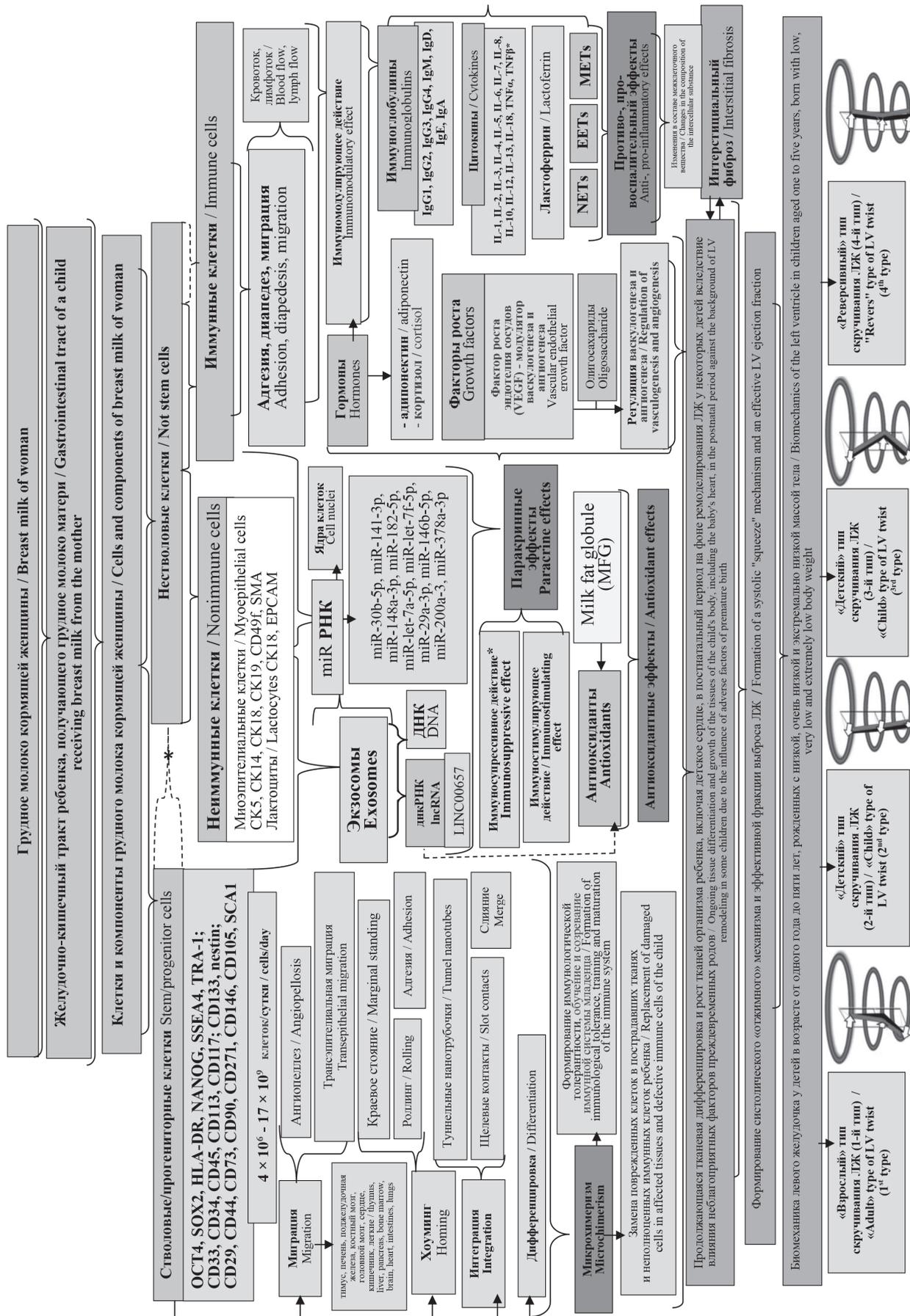


Схема 1. Реализация иммуномодулирующего и регенеративного потенциалов грудного молока при формировании контрактильно-ротационных механизмов ЛЖ у детей в возрасте от одного года до пяти лет, рожденных с низкой, очень низкой и экстремально низкой массой тела, в процессе постнатального онтогенеза (гипотеза)
 Scheme 1. Realization of immunomodulatory and regenerative potentials of breast milk in the formation of contractile-rotational LV mechanisms in children aged one to five years, born with low, very low and extremely low body weight; in the process of postnatal ontogenesis (hypothesis)

ках, центральном фиброзном теле – выявляется «хондроидная» ткань [116, 117], эмбриональная аваскулярная разновидность соединительной ткани с гистотопографическими особенностями качественного и количественного распределения клеточного и волокнистого состава. Процесс же формирования дефинитивного строения фиброзных треугольников, колец и центрального фиброзного тела к рождению не завершается» (цит.) [9].

Выявленный элемент фиброзного скелета сердца – cardiac fulcrum (точка опоры), расположенный у аорты и функционально предназначенный для структурного поддержания клапана, отделяющего левый желудочек сердца от аортальной артерии [71], имеет отличительные особенности строения у плодов и детей по сравнению со взрослыми [116, 117] и вполне может оказывать серьезное влияние на формирование многообразия контрактильно-ротационных механизмов ЛЖ (включая «детские» типы скручивания) [6].

Весьма настораживающе в контексте изложенной выше информации выглядят данные о уменьшении диаметра корня аорты, сегмента оттока левого желудочка, общего диаметра коронарных артерий у рожденных недоношенными детей-школьников [53]. Выявленная тенденция усугубляется тем фактом, что люди с меньшим диаметром коронарной артерии имеют высокую распространенность атеросклеротических поражений, и, вероятно, будут подвержены повышенному риску окклюзии просвета по мере прогрессирования атеросклеротического процесса [28, 45, 53, 63, 71, 123].

Необходимо отметить, что начальные атеросклеротические поражения коронарных артерий могут проявляться уже у плодов и в младенчестве до одного года [27, 45]. Образование жировых полосок, отмечаемое еще во внутриутробном периоде, изменения в аорте плода, определяют долгосрочную предрасположенность детей к последующему дебюту атеросклеротического процесса, в том числе индуцированного материнской гиперхолестеринемией [77]. К ранним морфологическим проявлениям атеросклеротического поражения у плодов и детей относятся: появление очагов, напоминающих преатеросклеротические изменения в коронарных артериях; утолщение интимы коронарных артерий вблизи мест бифуркации в передней нисходящей ветви левой коронарной артерии и в правой коронарной артерии; обнаружение макрофагов, заполненных каплями липидов и локализующихся в коронарных артериях; накопление пенистых клеток [107]; потеря полярности гладкомышечных клеток, инфильтрирующих субэндотелий, в

основном с разрывом внутренней эластической пластинки, неоангиогенез [17, 33, 45, 72, 75, 107, 122]. Изменения в сосудах у плодов и детей могут варьировать от очаговых бляшек с умеренным утолщением миоинтимальной зоны до ювенильных мягких бляшек, уменьшающих просвет артерий на 30-40% [72]. Обсуждается атерогенная роль детского питания в генезе найденных изменений [72].

Применение грудного вскармливания у человека приводит к уменьшению риска дебютов сердечно-сосудистых заболеваний у взрослых, что, весьма вероятно, обусловлено особенностями усвоения холестерина в раннем возрасте [99]. Снижение уровня холестерина при применении глобулярных мембран молочного жира, благоприятное воздействие на кишечную флору определены как благотворные эффекты в профилактике ишемической болезни сердца, поддержания метаболического здоровья. Установлено, что повышенное потребление молока и молочных продуктов приводит к снижению заболеваемости ожирением, инсулинорезистентностью, дислипидемией и сахарным диабетом 2-го типа, считающихся важными факторами риска сердечно-сосудистых заболеваний [99]. Младенцы, находящиеся на грудном вскармливании, подвергаются воздействию более высокой концентрации холестерина по сравнению с младенцами, находящимися на искусственном вскармливании [39]. Однако соединения MFGM (мембрана жировых глобул грудного молока), особенно полярные липиды и холестерин, обуславливают защитный эффект и метаболическое здоровье, поскольку полярные липиды и, в частности, сфингомиелин, присутствующие в MFGM, уменьшают всасывание холестерина в кишечнике [99]. Благодаря своей высокой степени насыщенности молочный сфингомиелин может образовывать комплекс с холестерином, достигая нижней части тонкой кишки и толстой кишки [26, 88]. В свою очередь, комплексообразование холестерина и сфингомиелина снижает мицеллообразование, перенос холестерина из мицеллярного матрикса в энтероцит и, как следствие, уменьшает последующее всасывание холестерина в тонком кишечнике [88, 104]. Включение холестерина в структурно сложную MFGM человека, богатую фосфолипидами, гликолипидами и гликопротеинами, а также длинноцепочечными полиненасыщенными жирными кислотами, вероятно, способствует метаболическому программированию гомеостаза холестерина в дальнейшем [39]. Новорожденные и дети раннего возраста, вскармливаемые детскими формулами (искусственное вскармливание), получают продукты с содержа-

нием жира в пятьдесят раз больше, чем молозиво человека в первые 48 ч, до шести раз больше через четыре дня и до двадцати восьми раз больше в последующие месяцы [76], что влияет на их метаболическое здоровье, а, соответственно, и здоровье сердечно-сосудистой системы.

Необходимо отметить, что установлено снижение ангиогенного потенциала и нарушение васкулогенеза у недоношенных детей, рожденных с очень низкой и экстремально низкой массой тела, связанное с изменением функциональных свойств циркулирующих эндотелиальных прогениторных клеток и эндотелиальных колониеобразующих клеток (ECFCs), обладающих высоким пролиферативным потенциалом [29]. В то же время исследование эндотелиальных колониеобразующих клеток у добровольцев от восемнадцати до двадцати девяти лет, рожденных недоношенными с низкой и очень низкой массой тела на сроках беременности менее двадцати девяти недель, показало: ECFC характеризовались сниженным пролиферативным потенциалом (васкулогенной способностью) и более медленным ростом колоний по сравнению с доношенными сверстниками. Особо выраженные изменения отмечены у молодых людей, рожденных недоношенными с низкой и очень низкой массой тела, при развитии у них бронхолегочной дисплазии [23]. Вышеизложенные заключения позволяют считать вероятным влияние нарушенного внутриутробно роста плода на структуру сердца в долгосрочной перспективе и на формирование повышенных рисков по развитию ишемической болезни сердца во взрослом возрасте, а массу тела при рождении ребенка — независимым предиктором уменьшения диаметра коронарных артерий [53] на фоне нарушения васкулогенеза [23, 29].

Постнатальное развитие сердца недоношенных детей продолжается в неблагоприятных условиях более высокой постнагрузки, когда отложение коллагена во внеклеточном матриксе миокарда повышается для сохранения целостности и прочности стенки желудочка. В ткани сердца плодов и новорожденных, перенесших хроническую внутриутробную гипоксию, присутствуют в большом количестве Т-лимфоциты, реализующие воспалительную реакцию, аналогичную классическим воспалительным изменениям [22, 51]. При недоношенности продолжают накапливаться, истощение и перестройка коллагенового матрикса (изменение размеров, количества, структуры коллагеновых волокон), трансформация функциональной роли коллагенов миокарда (I, II, III, IV, V, VII, XIV типов) [4, 43], изменение свойств экстрацеллюлярного матрикса [127]. В условиях дефицита кислорода

установлена дискоординация паракринных механизмов регуляции [105]. Итогом воздействия комплекса неблагоприятных факторов на детское и взрослое сердце при недоношенности может явиться его ремоделирование, потеря оптимальных контрактильных характеристик (в том числе увеличение «реверсивных» форм скручивания в систолу — движение апикальных отделов «по часовой стрелке»; в норме не встречающееся у здоровых взрослых добровольцев), раннее возникновение неблагоприятных сердечно-сосудистых событий [6, 37, 65].

Последние данные свидетельствуют о том, что раннее защитное действие грудного молока на сердечно-сосудистую систему недоношенного ребенка замедляет или даже останавливает описанные выше патологические изменения, тем самым смягчая долгосрочные неблагоприятные последствия преждевременных родов для сердечно-сосудистого здоровья [6, 37].

Заключение

Течение постнатального онтогенеза сердечно-сосудистой системы при отсутствии протективного (иммуномодулирующего и регенеративного) действия грудного молока кормящей женщины на спонтанное, некорректируемое воздействие неблагоприятных факторов недоношенности, приводит с высокой вероятностью к формированию ремоделирования и дисфункции сердца у детей и взрослых, рожденных недоношенными [6, 37, 65]. Грудное же молоко кормящей женщины имеет высокую биологическую активность, биодоступность факторов роста, ферментов, антител, стволовых, иммунных клеток, которые могут способствовать улучшению развития сердечно-сосудистой системы на этапе роста и развития детей в неонатальный и младенческий периоды [37]. Подобных компонентов нет в детских смесях, что ограничивает возможности искусственного вскармливания в плане реализации защитного, иммуномодулирующего и регенеративного потенциалов для сердца недоношенных детей [37].

Роль грудного молока, как целесообразного, эволюционно обусловленного механизма развития, защиты и нового иммунного органа недоношенных младенцев [87], бесспорно, важна в предотвращении ранних дебютов сердечно-сосудистых заболеваний в детском и взрослом возрастах у рожденных преждевременно. Естественное вскармливание играет жизненно важную роль в профилактике сердечно-сосудистых заболеваний у рожденных недоношенными детей и взрослых [6, 37, 65].

Список литературы / References

1. Владимирская Е.Б. Мезенхимальные стволовые клетки (МСК) в клеточной терапии // Онкогематология, 2007. № 1. С. 4-16. [Vladimirskaya E.B. Mesenchymal stem cells (MSCs) in cell therapy. *Onkogematologiya = Oncohematology*, 2007, no. 1, pp. 4-16. (In Russ.)]
2. Клиорин А.И. Некоторые возрастные особенности функций желудочно-кишечного тракта у детей. Справочник по детской диететике / Под ред. И.М. Воронцова, А.В. Мазурина. Л.: Медицина, 1977. С. 5-11. [Kliorin A.I. Some age-related features of gastrointestinal tract functions in children. Handbook of Children's dietetics / edited by I.M. Vorontsov, A.V. Mazurin]. Leningrad: Meditsina, 1977, pp. 5-11.
3. Кулида Л.В., Марченко М.В., Перетятко Л.П. Патоморфология гипоксически-ишемических поражений миокарда у новорождённых 22-27 недель гестации // Архив патологии, 2021. Т. 83, № 4. С. 2. [Kulida L.V., Marchenko M.V., Peretyatko L.P. Pathomorphology of hypoxic-ischemic myocardial lesions in newborns 22-27 weeks gestation. *Arkhiv patologii = Pathology Archive*, 2021, Vol. 83, no. 4, p. 2. (In Russ.)]
4. Максимьяк Л.А., Котлукова Н.П. Роль соединительной ткани сердца в обеспечении его структурных и функциональных свойств, ремоделирование на фоне патологии у детей // Педиатрия. Журнал им. Г.Н. Сперанского, 2016. Т. 95, № 3. С. 169-174. [Maksimyuk L.A., Kotlukova N.P. The role of connective tissue of the heart in ensuring its structural and functional properties, remodeling against the background of pathology in children. *Pediatriya. Zhurnal im. G.N. Speranskogo = Pediatrics. G. Speransky Journal*, 2016, Vol. 95, no. 3, pp. 169-174. (In Russ.)]
5. Малышева М.В., Кулида Л.В. Иммуногистохимические и ультраструктурные параметры гипоксических повреждений миокарда у новорождённых с экстремально низкой массой тела // Детская медицина Северо-Запада, 2020. Т. 8, № 1. С. 217. [Malysheva M.V., Kulida L.V. Immunohistochemical and ultrastructural parameters of hypoxic myocardial damage in newborns with extremely low body weight. *Detskaya meditsina Severo-Zapada = Children's Medicine of the North-West*, 2020, Vol. 8, no. 1, p. 217. (In Russ.)]
6. Павлюкова Е.Н., Колосова М.В., Неклюдова Г.В., Карпов Р.С. Механика левого желудочка у детей в возрасте от одного года до пяти лет, рождённых с очень низкой и экстремально низкой массой тела // Ультразвуковая и функциональная диагностика, 2020. № 3. С. 74-90. [Pavlyukova E.N., Kolosova M.V., Neklyudova G.V., Karpov R.S. Mechanics of the left ventricle in children aged one to five years, born with very low and extremely low body weight. *Ultrazvukovaya i funktsionalnaya diagnostika = Ultrasound and Functional Diagnostics*, 2020, no. 3, pp. 74-90. (In Russ.)]
7. Румянцев А.Г. Перспективы развития клинической иммунологии // Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии, 2021. Т. 19, № 4. С. 14-17. [Rumyantsev A.G. Prospects for the development of clinical immunology. *Voprosy gematologii/onkologii i immunopatologii v pediatrii = Issues of Hematology/Oncology and Immunopathology in Pediatrics*, 2021, Vol. 19, no. 4, pp. 14-17. (In Russ.)]
8. Самойлова Е.М., Кальсин В.А., Беспалова В.А., Девиченский В.М., Баклаушев В.П. Экзосомы: от биологии к клинике // Гены и клетки, 2017, № 4, С. 7-19. [Samoylova E.M., Kalsin V.A., Bepalova V.A., Devichensky V.M., Baklaushev V.P. Exosomes: from biology to clinic. *Geny i kletki = Genes and Cells*, 2017, no. 4, pp. 7-19. (In Russ.)]
9. Спирина Г.А. Морфология сердца и лёгких плодов человека в исследованиях на кафедре анатомии человека // Фундаментальные исследования, 2007. № 12. С. 173-174. [Spirina G.A. Morphology of the heart and lungs of human fetuses in research at the Department of Human Anatomy. *Fundamentalnye issledovaniya = Fundamental Research*, 2007, no. 12, pp. 173-174. (In Russ.)]
10. Татарина О.С., Осипова Е.Ю., Румянцев С.А. Биологические свойства и возможности клинического использования мезенхимальных стволовых клеток // Онкогематология, 2009. № 4. С. 33-44. [Tatarinova O.S., Osipova E.Yu., Rumyantsev S.A. Biological properties and possibilities of clinical use of mesenchymal stem cells. *Onkogematologiya = Oncohematology*, 2009, no. 4, pp. 33-44. (In Russ.)]
11. Abbaszadeh H., Ghorbani F., Derakhshani M., Movassaghpour A., Yousefi M. Human umbilical cord mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles: A novel therapeutic paradigm. *J. Cell. Physiol.*, 2020, Vol. 235, no. 2, pp. 706-717.
12. Abd Allah S.H., Shalaby S.M., El-Shal A.S., El Nabtety S.M., Khamis T., Abd El Rhman S.A., Kelani H.M. Breast milk MSCs: An explanation of tissue growth and maturation of offspring. *IUBMB Life*, 2016, Vol. 68, no. 12, pp. 935-942.
13. Ahmed W., Tariq S., Khan G. Tracking EBV-encoded RNAs (EBERs) from the nucleus to the excreted exosomes of B-lymphocytes. *Sci. Rep.*, 2018, Vol. 8, no. 1, pp. 1-11.
14. Alsaweed M., Hartmann P.E., Geddes D.T., Kakulas F. MicroRNAs in breastmilk and the lactating breast: potential immunoprotectors and developmental regulators for the infant and the mother. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 2015, Vol. 12, no. 11, pp. 13981-14020.

15. Alsaweed M., Lai C.T., Hartmann P.E., Geddes D.T., Kakulas F. Human milk miRNAs primarily originate from the mammary gland resulting in unique miRNA profiles of fractionated milk. *Sci. Rep.*, 2016, Vol. 6, no. 1, pp. 1-13.
16. Anel A., Gallego-Lleyda A., de Miguel D., Naval J., Martínez-Lostao L. Role of exosomes in the regulation of T-cell mediated immune responses and in autoimmune disease. *Cells*, 2019, Vol. 8, no. 2, 154. doi: 10.3390/cells8020154.
17. Angelini A., Thiene G., Frescura C., Baroldi G. Coronary arterial wall and atherosclerosis in youth (1-20 years): a histologic study in a northern Italian population. *Int. J. Cardiol.*, 1990, Vol. 28, no. 3, pp. 361-370.
18. Aydın M.Ş., Yiğit E.N., Vatandaşlar E., Erdoğan E., Öztürk G. Transfer and Integration of Breast Milk Stem Cells to the Brain of Suckling Pups. *Sci. Rep.*, 2018, no. 8, 14289. doi: 10.1038/s41598-018-32715-5.
19. Baban B., Malik A., Bhatia J., Jack C.Y. Presence and profile of innate lymphoid cells in human breast milk. *JAMA Pediatr.*, 2018, Vol. 172, no. 6, pp. 594-596.
20. Balle C., Armistead B., Kiravu A., Song X., Happel A.U., Hoffmann A.A., Kanaan S.B., Nelson J.L., Gray C.M., Jaspan H.B., Harrington W.E. Factors influencing maternal microchimerism throughout infancy and its impact on infant T cell immunity. *J. Clin. Invest.*, 2022 Vol. 132, no. 13, e148826. doi: 10.1172/JCI148826.
21. Bardanzellu F., Fanos V., Strigini F.A., Artini P.G., Peroni D.G. Human breast milk: exploring the linking ring among emerging components. *Front. Pediatr.*, 2018, Vol. 6, 215. doi: 10.3389/fped.2018.00215.
22. Bensley J.G., Stacy V.K., de Matteo R. Cardiac remodelling as a result of pre-term birth: implications for future cardiovascular disease. *Eur. Heart J.*, 2010, Vol. 31, no. 16, 2058. doi: 10.1093/eurheartj/ehq104.
23. Bertagnolli M., Xie L.F., Paquette K., He Y., Cloutier A., Fernandes R.O., Béland C., Sutherland M.R., Delfrate J., Curnier D., Bigras J.-L., Rivard A., Thébaud B., Luu T.M., Nuyt A.M. Endothelial colony-forming cells in young adults born preterm: a novel link between neonatal complications and adult risks for cardiovascular disease. *J. Am. Heart Assoc.*, 2018, Vol. 7, no. 14, e009720. doi: 10.1161/JAHA.118.009720.
24. Bianchi D.W., Khosrotehrani K., Way S.S., MacKenzie T.C., Bajema I., O'Donoghue K. Forever connected: the lifelong biological consequences of fetomaternal and maternofetal microchimerism. *Clin. Chem.*, 2021, Vol. 67, no. 2, pp. 351-362.
25. Boudry G., Charton E., le Huerou-Luron I., Ferret-Bernard S., le Gall S., Even S., Blat S. The relationship between breast milk components and the infant gut microbiota. *Front. Nutr.*, 2021, Vol. 8, 629740. doi: 10.3389/fnut.2021.629740.
26. Bourlieu C., Michalski M.C. Structure–function relationship of the milk fat globule. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care*, 2015, Vol. 18, no. 2, pp. 118-127.
27. Briana D.D., Malamitsi-Puchner A. Coronary intimal thickening begins in fetuses: proof of concept for the “fetal origins of adult disease” hypothesis. *Angiology*, 2020, Vol. 71, no. 1, pp. 89-89.
28. Carr H., Cnattingius S., Granath F., Ludvigsson J.F., Bonamy A.K.E. Preterm birth and risk of heart failure up to early adulthood. *J. Am. Coll. Cardiol.*, 2017, Vol. 69, no. 21, pp. 2634-2642.
29. Chehade H., Simeoni U., Guignard J.P., Boubred F. Preterm birth: long term cardiovascular and renal consequences. *Curr. Pediatr. Rev.*, 2018, Vol. 14, no. 4, pp. 219-226.
30. Collins A., Weitkamp J.H., Wynn J.L. Why are preterm newborns at increased risk of infection? *Arch. Dis. Child. Fetal Neonatal Ed.*, 2018, Vol. 103, no. 4, pp. F391-F394.
31. Cox D.J., Bai W., Price A.N., Edwards A.D., Rueckert D., Groves A.M. Ventricular remodeling in preterm infants: computational cardiac magnetic resonance atlasing shows significant early remodeling of the left ventricle. *Pediatr. Res.*, 2019, Vol. 85, no. 6, pp. 807-815.
32. Cui J., Zhou B., Ross S.A., Zemleni J. Nutrition, microRNAs, and human health. *Adv. Nutr.*, 2017, Vol. 8, no. 1, pp. 105-112.
33. Davies H. Atherogenesis and the coronary arteries of childhood. *Int. J. Cardiol.*, 1990, no. 28, pp. 283-291.
34. de Weerth C., Aatsinki A.K., Azad M.B., Bartol F.F., Bode L., Collado M.C., Dettmer A.M., Field C.J., Guilfoyle M., Hinde K., Korosi A., Lusterhans H., Shukri N.H.M., Moore S.E., Pundir S., Rodriguez J.M., Slupsky C.M., Turner S., van Goudoever J.B., Ziolkiewicz A., Beijers R. Human milk: From complex tailored nutrition to bioactive impact on child cognition and behavior. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 2022, pp. 1-38.
35. Duale A., Singh P., Al Khodor S. Breast milk: a meal worth having. *Front. Nutr.*, 2022, Vol. 8, 800927. doi: 10.3389 / fnut.2021.800927.
36. Dutta P., Burlingham W.J. Stem cell microchimerism and tolerance to non-inherited maternal antigens. *Chimerism*, 2010, Vol. 1, no. 1, pp. 2-10.
37. El-Khuffash A., Jain A., Lewandowski A.J., Levy P.T. Preventing disease in the 21st century: early breast milk exposure and later cardiovascular health in premature infants. *Pediatr. Res.*, 2020, Vol. 87, no. 2, pp. 385-390.
38. Fernández-Domínguez I.J., Manzo-Merino J., Taja-Chayeb L., Dueñas-González A., Pérez-Cárdenas E., Trejo-Becerril C. The role of extracellular DNA (exDNA) in cellular processes. *Cancer Biol. Ther.*, 2021, Vol. 22, no. 4, pp. 267-278.

39. Gallier S., Vocking K., Post J.A., van de Heijning B., Acton D., van Der Beek E.M., van Baalen T. A novel infant milk formula concept: Mimicking the human milk fat globule structure. *Colloids Surf. B Biointerfaces*, 2015, no. 136, pp. 329-339.
40. Gleeson J.P., Chaudhary N., Fein K.C., Doerfler R., Hredzak-Showalter P., Whitehead, K. A. Profiling of mature-stage human breast milk cells identifies six unique lactocyte subpopulations. *Sci. Adv.*, 2022, Vol. 8, no. 26, eabm6865. doi: 10.1126/sciadv.abm6865.
41. Golan Gerstl R., Elbaum Shiff Y., Moshayoff V., Schechter D., Leshkowitz D., Reif S. Characterization and biological function of milk-derived miRNAs. *Mol. Nutr. Food Res.*, 2017, Vol. 61, no. 10, 1700009. doi: 10.1002/mnfr.201700009.
42. Gomzikova M.O., Zhuravleva M.N., Vorobev V.V., Salafutdinov I.I., Laikov A.V., Kletukhina S.K., Martynova E.V., Tazetdinova L.G., Ntekim A.I., Khaiboullina S.F., Rizvanov A.A. Angiogenic activity of cytochalasin B-induced membrane vesicles of human mesenchymal stem cells. *Cells*, 2020, Vol. 9, no. 1, 95. doi: 10.3390/cells9010095.
43. González A., López B., Ravassa S., San José G., Díez J. The complex dynamics of myocardial interstitial fibrosis in heart failure. Focus on collagen cross-linking. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Res.*, 2019, Vol. 1866, no. 9, 1421. doi: 10.1016/j.bbamcr.2019.06.001.
44. Goss K.N., Haraldsdottir K., Beshish A.G., Barton G.P., Watson A.M., Palta M., Eldridge M.W. Association between preterm birth and arrested cardiac growth in adolescents and young adults. *JAMA Cardiol.*, 2020, Vol. 5, no. 8, pp. 910-919.
45. Guerri-Guttenberg R., Castilla R., Cao G., Azzato F., Ambrosio G., Milei J. Coronary intimal thickening begins in fetuses and progresses in pediatric population and adolescents to atherosclerosis. *Angiology*, 2020, Vol. 71, no. 1, pp. 62-69.
46. Hård A.L., Nilsson A.K., Lund A.M., Hansen-Pupp I., Smith L.E., Hellström A. Review shows that donor milk does not promote the growth and development of preterm infants as well as maternal milk. *Acta Paediatr.*, 2019, Vol. 108, no. 6, pp. 998-1007.
47. Harris S.L., Bray H., Troughton R., Elliott J., Frampton C., Horwood J., Darlow B.A. Cardiovascular outcomes in young adulthood in a population-based very low birth weight cohort. *J. Pediatr.*, 2020, no. 225, pp. 74-79.
48. Hassiotou F., Geddes D.T. Immune cell-mediated protection of the mammary gland and the infant during breastfeeding. *Adv. Nutr.*, 2015, Vol. 6, no. 3, pp. 267-275.
49. Hassiotou F., Geddes D.T., Hartmann P.E. Cells in human milk: state of the science. *J. Hum. Lact.*, 2013, Vol. 29, no. 2, pp. 171-182.
50. Hatmal M.M.M., Al-Hatamleh M.A., Olaimat A.N., Alshaer W., Hasan H., Albakri K.A., Alkhafaji E., Issa N.N., Al-Holy M.A., Abderrahman S.M., Abdallah A.M., Mohamud R. Immunomodulatory properties of human breast milk: microRNA contents and potential epigenetic effects. *Biomedicines*, 2022, Vol. 10, no. 6, 1219. doi: 10.3390/biomedicines10061219.
51. Humberg A., Fortmann I., Siller B., Kopp M.V., Herting E., Göpel W., Härtel C. Preterm birth and sustained inflammation: consequences for the neonate. *Semin. Immunopathol.*, 2020, no. 42, 451. doi: 10.1007/s00281-020-00803-2.
52. Jain N. The early life education of the immune system: Moms, microbes and (missed) opportunities. *Gut Microbes*, 2020, Vol. 12, no. 1, 1824564. doi: 10.1080/19490976.2020.1824564.
53. Jiang B., Godfrey K.M., Martyn C.N., Gale C.R. Birth weight and cardiac structure in children. *Pediatrics*, 2006, Vol. 117, no. 2, pp. e257-e261.
54. Joo H.S., Suh J.H., Lee H.J., Bang E.S., Lee J.M. Current knowledge and future perspectives on mesenchymal stem cell-derived exosomes as a new therapeutic agent. *Int. J. Mol. Sci.*, 2020, Vol. 21, no. 3, 727. doi: 10.3390/ijms2103072.
55. Kahn S., Liao Y., Du X., Xu W., Li J., Lönnerdal B. Exosomal microRNAs in milk from mothers delivering preterm infants survive in vitro digestion and are taken up by human intestinal cells. *Mol. Nutr. Food Res.*, 2018, Vol. 62, no. 11, 1701050. doi: 10.1002/mnfr.201701050.
56. Kakulas F. Breast milk: a source of stem cells and protective cells for the infant. *Infant*, 2015, Vol. 11, no. 6, pp. 187-191.
57. Kalluri R., LeBleu V.S. The biology, function, and biomedical applications of exosomes. *Science*, 2020, Vol. 367, no. 6478, eaau6977. doi: 10.1126/science.aau6977.
58. Kara R.J., Bolli P., Karakikes I., Matsunaga I. Fetal cells traffic to injured maternal myocardium and undergo cardiac differentiation. *Circ. Res.*, 2011, no. 111, 249037. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.111.249037.
59. Kinder J.M., Stelzer I.A., Arck P.C., Way S.S. Immunological implications of pregnancy-induced microchimerism. *Nat. Rev. Immunol.*, 2017, Vol. 17, no. 8, 483. doi: 10.1038/nri.2017.38.
60. Kuciel N., Mazurek J., Czosnykowska-Łukacka M., Królak-Olejnik B. Stem cells in breast milk. *Pediatrics Polska - Polish J. Paediatr.*, 2018, Vol. 93, no. 3, pp. 260-263.

61. Lässer C., Alikhani V.S., Ekström K., Eldh M., Paredes P.T., Bossios A., Sjöstrand M., Gabrielsson S., Lötval J., Valadi H. Human saliva, plasma and breast milk exosomes contain RNA: uptake by macrophages. *J. Transl. Med.*, 2011, Vol. 9, no. 1, 9. doi: 10.1186/1479-5876-9-9.
62. Lawrence R.M. Host-resistance factors and immunologic significance of human milk. *Breastfeeding. Elsevier*, 2022, pp. 145-192.
63. Leeson P., Lewandowski A.J. A new risk factor for early heart failure: preterm birth. *J. Am. Coll. Cardiol.*, 2017, Vol. 69, no. 21, pp. 2643-2645.
64. Leiferman A., Shu J., Upadhyaya B., Cui J., Zempeni J. Storage of extracellular vesicles in human milk, and microRNA profiles in human milk exosomes and infant formulas. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.*, 2019, Vol. 69, no. 2, 235. doi: 10.1097/MPG.0000000000002363.
65. Lewandowski A.J., Raman B., Bertagnolli M., Mohamed A., Williamson W., Pelado J.L., Leeson P. Association of preterm birth with myocardial fibrosis and diastolic dysfunction in young adulthood. *J. Am. Coll. Cardiol.*, 2021, Vol. 78, no. 7, pp. 683-692.
66. Liao Y., Du X., Li J., Lönnerdal B. Human milk exosomes and their microRNAs survive digestion in vitro and are taken up by human intestinal cells. *Mol. Nutr. Food Res.*, 2017, Vol. 61, no. 11, 1700082. doi: 10.1002/mnfr.201700082.
67. Lokossou G.A., Kouakanou L., Schumacher A., Zenclussen A.C. Human breast milk: from food to active immune response with disease protection in infants and mothers. *Front. Immunol.*, 2022, Vol. 13, 849012. doi: 10.3389/fimmu.2022.849012.
68. Macia L., Nanan R., Hosseini-Beheshti E., Grau G.E. Host-and microbiota-derived extracellular vesicles, immune function, and disease development. *Int. J. Mol. Sci.*, 2020, Vol. 21, no. 1, 107. doi: 10.3390/ijms21010107.
69. Manca S., Upadhyaya B., Mutai E., Desaulniers A.T., Cederberg R.A., White B.R. Milk exosomes are bioavailable and distinct microRNA cargos have unique tissue distribution patterns. *Sci. Rep.*, 2018, no. 8, 11. doi: 10.1038/s41598-018-29780-1.
70. Martin C., Patel M., Williams S., Arora H., Sims B. Human breast milk-derived exosomes attenuate cell death in intestinal epithelial cells. *Innate Immun.*, 2018, Vol. 24, pp. 278-284.
71. Massari C.H., Ferreira-Silva A., Riceti-Magalhães H.I., Souza-Silva D.R., Miglino M.A. Computed tomography examination of the os cordis in a lamb (*Ovis aries* Linnaeus, 1758). *Rev. MVZ Cordoba*, 2022, Vol. 27, no. 1, e2153.
72. Matturri L., Ottaviani G., Corti G., Lavezzi A.M. Pathogenesis of early atherosclerotic lesions in infants. *Pathol. Res. Pract.*, 2004, Vol. 200, no. 5, pp. 403-410.
73. Melnik B.C., Stremmel W., Weiskirchen R., John S.M., Schmitz G. Exosome-derived microRNAs of human milk and their effects on infant health and development. *Biomolecules*, 2021, Vol. 11, no. 6, 851. doi: 10.3390/biom11060851.
74. Melville J.M., Moss T.J.M. The immune consequences of preterm birth. *Front. Neurosci.*, 2013, Vol. 7, 79. doi: 10.3389/fnins.2013.00079.
75. Meyer W.W., Lind J., Yao A.C., Kauffman S.L. Early arterial lesions in infancy and childhood and ways of prevention. *Paediatrician*, 1982, no. 11, pp. 136-156.
76. Michalski M.C., Briard V., Michel F., Tasson F., Poulain P. Size distribution of fat globules in human colostrum, breast milk, and infant formula. *J. Dairy Sci.*, 2005, Vol. 88, no. 6, pp. 1927-1940.
77. Milei J., Grana D.R., Navari C., Azzato F., Guerri-Guttenberg R.A., Ambrosio G. Coronary intimal thickening in newborn babies and ≤ 1-year-old infants. *Angiology*, 2010, Vol. 61, no. 4, pp. 350-356.
78. Mohamed A., Lamata P., Williamson W., Alsharqi M., Tan C.M.J., Burchert H., Huckstep O.J., Suriano K., Francis J.M., Pelado J.L., Monteiro C., Neubauer S., Levy P.T., Leeson P., Lewandowski A.J. Multimodality imaging demonstrates reduced right-ventricular function independent of pulmonary physiology in moderately preterm-born adults. *JACC Cardiovasc. Imaging*, 2020, Vol. 13, no. 9, pp. 2046-2048.
79. Molès J.P., Tuillon E., Kankasa C., Bedin A.S., Nagot N., Marchant A., McDermid J.M., van de Perre P. Breastmilk cell trafficking induces microchimerism-mediated immune system maturation in the infant. *Pediatr. Allergy Immunol.*, 2018, Vol. 29, no. 2, pp. 133-143.
80. Monguio-Tortajada M., Roura S., Galvez-Monton C., Pujal J. M., Aran G., Sanjurjo L. Nanosized UCMSC-derived extracellular vesicles but not conditioned medium exclusively inhibit the inflammatory response of stimulated T cells: implications for nanomedicine. *Theranostics*, 2017, Vol. 7, no. 2, pp. 270-284. doi: 10.7150/thno.16154.
81. Mourtzi N., Sihanidou T., Tsifintaris M., Karamichali E., Tasiopoulou A., Sertedaki A., Pesmatzoglou M., Kapetanaki A., Liosis G., Baltatzis G., Vlachakis D., Chrousos G.P., Giannakakis A. 3lncRNA NORAD is consistently detected in breastmilk exosomes and its expression is downregulated in mothers of preterm infants. *Int. J. Mol. Med.*, 2021, Vol. 48, no. 6, pp. 1-10.
82. Mulcahy L.A., Pink R.C., Carter D.R.F. Routes and mechanisms of extracellular vesicle uptake. *J. Extracell. Vesicles*, 2014, Vol. 3, no. 1, 24641. doi: 10.3402/jev.v3.24641.

83. Munir J., Lee M., Ryu S. Exosomes in food: Health benefits and clinical relevance in diseases. *Adv. Nutr.*, 2020, Vol. 11, no. 3, pp. 687-696.
84. Mutai E., Ngu A.K.H., Zempleni J. Preliminary evidence that lectins in infant soy formula apparently bind bovine milk exosomes and prevent their absorption in healthy adults. *BMC Nutr.*, 2022, Vol. 8, no. 1, pp. 1-6.
85. Nanou A., Crespo M., Flohr P., de Bono J.S., Terstappen L.W. Scanning electron microscopy of circulating tumor cells and tumor-derived extracellular vesicles. *Cancers*, 2018, Vol. 10, no. 11, 416. doi: 10.3390/cancers10110416.
86. Nanou A., Zeune L.L., Terstappen L.W.M.M. Leukocyte-derived extracellular vesicles in blood with and without EpCAM enrichment. *Cells*, 2019, Vol. 8, no. 8, 937. doi: 10.3390/cells8080937.
87. Ninkina N., Kukharsky M.S., Hewitt M.V., Lysikova E.A., Skuratovska L.N., Deykin A.V., Buchman V.L. Stem cells in human breast milk. *Hum. Cell*, 2019, pp. 1-8.
88. Noh S.K., Koo S.I. Milk sphingomyelin is more effective than egg sphingomyelin in inhibiting intestinal absorption of cholesterol and fat in rats. *J. Nutr.*, 2004, Vol. 134, no. 10, pp. 2611-2616.
89. Ortmann W., Kolaczowska E. Age is the work of art? Impact of neutrophil and organism age on neutrophil extracellular trap formation. *Cell Tissue Res.*, 2018, Vol. 371, no. 3, pp. 473-488.
90. Palmeira P., Carneiro-Sampaio M. Immunology of breast milk. *Rev. Assoc. Med. Bras.*, 2016, Vol. 62, no. 6, pp. 584-593.
91. Panova N.A., Skopichev V.G. A role for cellular immunity in early postpartum period. *Medical Immunology (Russia)*, 2021, Vol. 23, no. 4, pp. 853-858. doi: 10.15789/1563-0625-ARF-2275.
92. Peyman G., Shraddha R., Afsoon G., Hashem B.M., Nasibeh D. Biology, properties and clinical application of Mesenchymal stem cells. *Russian Open Medical Journal*, 2014, Vol. 3, no. 2. doi: 10.15275/rusomj.2014.0202.
93. Pisano C., Galley J., Elbahrawy M., Wang Y., Farrell A., Brigstock D., Besner G.E. Human breast milk-derived extracellular vesicles in the protection against experimental necrotizing enterocolitis. *J. Pediatr. Surg.*, 2020, Vol. 55, no. 1, pp. 54-58.
94. Ramadan M., Cooper B., Posnack N. G. Bisphenols and phthalates: Plastic chemical exposures can contribute to adverse cardiovascular health outcomes. *Birth Defects Res.*, 2020, Vol. 112, no. 17, pp. 1362-1385.
95. Reif S., Shiff Y.E., Golan-Gerstl R. Milk-derived exosomes (MDEs) have a different biological effect on normal fetal colon epithelial cells compared to colon tumor cells in a miRNA-dependent manner. *J. Transl. Med.*, 2019, Vol. 17, no. 1, 325. doi: 10.1186/s12967-019-2072-3.
96. Riskin A., Almog M., Peri R., Halasz K., Srugo I., Kessel A. Changes in immunomodulatory constituents of human milk in response to active infection in the nursing infant. *Pediatr. Res.*, 2012, Vol. 71, no. 2, pp. 220-225.
97. Rodríguez J.M., Fernández L., Verhasselt V. The gut-breast axis: programming health for life. *Nutrients*, 2021, Vol. 13, no. 2, 606. doi: 10.3390/nu13020606.
98. Rubio M., Bustamante M., Hernandez-Ferrer C., Fernandez-Orth D., Pantano L., Sarria Y., Estivill X. Circulating miRNAs, isomiRs and small RNA clusters in human plasma and breast milk. *PLoS One*, 2018, Vol. 13, no. 3, e0193527. doi: 10.1371/journal.pone.0193527.
99. Rueda R. The role of complex lipids in attaining metabolic health. *Curr. Cardiovasc. Risk Rep.*, 2014, no. 8, 371. doi: 10.1007/s12170-013-0371-4.
100. Samsonraj R.M., Raghunath M., Nurcombe V., Hui J.H., Cool S.M. Concise Review: Multifaceted Characterization of Human Mesenchymal Stem Cells for Use in Regenerative Medicine. *Stem Cells Transl. Med.*, 2017, Vol. 6, no. 12, pp. 2173-2185.
101. Sani M., Hosseini S.M., Salmannejad M., Aleahmad F., Ebrahimi S., Jahanshahi S., Talaie-Khozani T. Origins of the breast milk-derived cells; an endeavor to find the cell sources. *Cell Biol. Int.*, 2015, Vol. 39, no. 5, pp. 611-618.
102. Sedykh S.E., Burkova E.E., Purvinsh L.V., Klemeshova D.A., Ryabchikova E.I., Nevinsky G.A. Milk exosomes: Isolation, biochemistry, morphology and perspectives of use. *Extracellular Vesicles and Their Importance in Human Health*, 2020, pp. 1-28.
103. Sizzo C.L., Reverberi D., Balbi C., Ulivi V., Principi E., Pascucci L., Becherini P., Bosco M.C., Varesio L., Franzin C., Pozzobon M., Cancedda R., Tasso R. Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles as mediators of anti-inflammatory effects: Endorsement of macrophage polarization. *Stem Cells Transl. Med.*, 2017, Vol. 6, no. 3, pp. 1018-1028.
104. Singh H. Symposium review: Fat globules in milk and their structural modifications during gastrointestinal digestion. *J. Dairy Sci.*, 2019, Vol. 102, no. 3, pp. 2749-2759.
105. Sluijter J.P.G., Davidson S.M., Boulanger C.M., Buzas E.I., de Kleijn D.P.V., Engel F.B., Giricz Z., Hausenloy D.J., Kishore R., Lecour S., Leor J., Madonna R., Perrino C., Prunier F., Sahoo S., Schifflers R.M., Schulz R., van Laake L.W., Ytrehus K., Ferdinandy P. Extracellular vesicles in diagnostics and therapy of the ischaemic heart: Position Paper from the Working Group on Cellular Biology of the Heart of the European Society of Cardiology. *Cardiovasc. Res.*, 2018, Vol. 114, no. 1, pp. 19-34.

106. Sokolova V., Ludwig A.K., Hornung S., Rotan O., Horn P.A., Epple M., Giebel B. Characterisation of exosomes derived from human cells by nanoparticle tracking analysis and scanning electron microscopy. *Colloids Surf. B Biointerfaces*, 2011, Vol. 87, no. 1, pp. 146-150.
107. Stary H.C. Macrophages, macrophage foam cells, and eccentric intimal thickening in the coronary arteries of young children. *Atherosclerosis*, 1987, Vol. 64, no. 2-3, pp. 91-108.
108. Stevens A.M., Hermes H.M., Rutledge J.C., Buyon J.P., Nelson J.L. Myocardial-tissue-specific phenotype of maternal microchimerism in neonatal lupus congenital heart block. *Lancet*, 2003, Vol. 362, no. 9396, pp. 1617-1623.
109. Szabo G., Momen-Heravi F. Extracellular vesicles and exosomes: biology and pathobiology. *The Liver. Biology and Pathobiology*, 2020, pp. 1022-1027.
110. Tachibana A., Santoso M.R., Mahmoudi M., Shukla P., Wang L., Bennett M., Goldstone A.B., Wang M., Fukushi M., Ebert A.D., Woo Y.J., Rulifson E., Yang P.C. Paracrine effects of the pluripotent stem cell-derived cardiac myocytes salvage the injured myocardium. *Circ. Res.*, 2017, Vol. 121, no. 6, e22. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.117.310803.
111. Tian T., Wang Y., Wang H., Zhu Z., Xiao Z. Visualizing of the cellular uptake and intracellular trafficking of exosomes by live-cell microscopy. *J. Cell. Biochem.*, 2010, Vol. 111, no. 2, pp. 488-496.
112. Tingö L., Ahlberg E., Johansson L., Pedersen S.A., Chawla K., Sætrum P., Cione E., Simpson M.R. Non-coding RNAs in human breast milk: a systematic review. *Front. Immunol.*, 2021, Vol. 12, 725323. doi: 10.3389/fimmu.2021.725323.
113. Tomé-Carneiro J., Fernández-Alonso N., Tomás-Zapico C., Visioli F., Iglesias-Gutierrez E., Dávalos A. Breast milk microRNAs harsh journey towards potential effects in infant development and maturation. Lipid encapsulation can help. *Pharmacol. Res.*, 2018, no. 32, pp. 21-32.
114. Torralba D., Baixauli F., Villarroya-Beltri C., Fernández-Delgado I., Latorre-Pellicer A., Acín-Pérez R., Martín-Cófreces N.B., Jaso-Tamame Á.L., Iborra S., Jorge I., González-Aseguinolaza G., Garaude J., Vicente-Manzanares M., Enríquez J.A., Mittelbrunn M., Sánchez-Madrid F. Priming of dendritic cells by DNA-containing extracellular vesicles from activated T cells through antigen-driven contacts. *Nat. Commun.*, 2018, Vol. 9, no. 1, pp. 1-17.
115. Trainini J.C. Cardiac helical function. Fulcrum and torsion. *Japan J. Clin. Med. Res., SRC/JJCMR-139*, 2022, 136.
116. Trainini J., Beraudo M., Wernicke M. Physiology of the helical heart. *Int. J. Anat. Appl. Physiol.*, 2021, Vol. 7, no. 5, 195.
117. Trainini J., Lowenstein J., Beraudo M., Wernicke M., Trainini A., Llabata V. M., Carreras C.F. Myocardial torsion and cardiac fulcrum. *Morphologie*, 2021, Vol. 105, no. 348, pp. 15-23.
118. Tripathy S., Singh S., Das S.K. Potential of breastmilk in stem cell research. *Cell Tissue Bank.*, 2019, Vol. 20, no. 4, pp. 467-488.
119. Turchinovich A., Drapkina O., Tonevitsky A. Transcriptome of extracellular vesicles: State-of-the-art. *Front. Immunol.*, 2019, Vol. 10, 202. doi: 10.3389/fimmu.2019.00202.
120. van Gils F.A. The fibrous skeleton in the human heart: embryological and pathogenetic considerations. *Virchows Arch. A Pathol. Anat. Histol.*, 1981, Vol. 393, no. 1, 61-73.
121. van Zyl B., Planas R., Ye Y., Foulis A., de Krijger R.R., Vives-Pi M., Gillespie K.M. Why are levels of maternal microchimerism higher in type 1 diabetes pancreas?. *Chimerism*, 2010, Vol. 1, no. 2, pp. 45-50.
122. Velican C., Velican D. Coronary arteries in children up to the age of ten years II. Intimal thickening and its role in atherosclerotic involvement. *Med. Interne*, 1976, Vol. 14, no. 1, pp. 17-24.
123. Vijayakumar M., Fall C.H., Osmond C., Barker D.J. Birth weight, weight at one year, and left ventricular mass in adult life. *Heart*, 1995, Vol. 73, no. 4, pp. 363-367.
124. Vrancken S.L., van Heijst A.F., de Boode W.P. Neonatal hemodynamics: from developmental physiology to comprehensive monitoring. *Front. Pediatr.*, 2018, Vol. 6, 87. doi: 10.3389/fped.2018.00087.
125. Vrselja A., Pillow J.J., Bensley J.G., Ellery S.J., Ahmadi-Noorbakhsh S., Moss T.J., Black M.J. Intrauterine inflammation exacerbates maladaptive remodeling of the immature myocardium after preterm birth in lambs. *Pediatr. Res.*, 2022, Vol. 92, no. 6, pp. 1555-1565.
126. Waldenstrom A., Genneback N., Hellman U. Cardiomyocyte microvesicles contain DNA/RNA and convey biological messages to target cells. *PLoS One*, 2012, Vol. 7, no. 4, e34653. doi: 10.1371/journal.pone.0034653.
127. Wang Z., Lon, D.W., Huan, Y., Che W.C., Ki K., Wang Y. Decellularized neonatal cardiac extracellular matrix prevents widespread ventricular remodeling in adult mammals after myocardial infarction. *Acta Biomater.*, 2019, Vol. 87, pp. 140-151.
128. Witkowska-Zimny M., Kaminska-El-Hassan E. Cells of human breast milk. *Cell. Mol. Biol. Lett.*, 2017, Vol. 22, 11. doi: 10.1186/s11658-017-0042-4.

129. Zempleni J., Aguilar-Lozano A., Sadri M., Sukreet S., Manca S., Wu D., Mutai E. Biological activities of extracellular vesicles and their cargos from bovine and human milk in humans and implications for infants. *J. Nutr.*, 2017, Vol. 147, no. 1, pp. 3-10.

130. Zhou Y., Yu Z., Wang X., Chen W., Liu Y., Zhang Y., Han S. Exosomal circRNAs contribute to intestinal development via the VEGF signalling pathway in human term and preterm colostrum. *Aging (Albany NY)*, 2021, Vol. 13, no. 8, pp. 11218-11233.

131. Zonneveld M.I., Brisson A.R., van Herwijnen M.J., Tan S., van de Lest C.H., Redegeld F.A., Garssen J., Wauben M.H., Nolte-'t Hoen E.N. Recovery of extracellular vesicles from human breast milk is influenced by sample collection and vesicle isolation procedures. *J. Extracell. Vesicles*, 2014, Vol. 3, 10.3402/jev.v3.24215. doi: 10.3402/jev.v3.24215.

Авторы:

Павлюкова Е.Н. — д.м.н., профессор, заведующая отделением атеросклероза и хронической ишемической болезни сердца, Научно-исследовательский институт кардиологии ФГБНУ «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук», г. Томск, Россия

Колосова М.В. — д.м.н., профессор кафедры детских болезней ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Томск, Россия

Неклюдова Г.В. — аспирант Научно-исследовательского института кардиологии ФГБНУ «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук», г. Томск, Россия

Карпов Р.С. — д.м.н., академик РАН, научный руководитель Научно-исследовательского института кардиологии ФГБНУ «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук», г. Томск, Россия

Authors:

Pavlyukova E.N., PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Department of Atherosclerosis and Chronic Coronary Heart Disease, Research Institute of Cardiology, Tomsk National Research Medical Center, Tomsk, Russian Federation

Kolosova M.V., PhD, MD (Medicine), Professor, Department of Pediatric Diseases, Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation

Neklyudova G.V., Postgraduate Student, Research Institute of Cardiology, Tomsk National Research Medical Center, Tomsk, Russian Federation

Karpov R.S., PhD, MD (Medicine), Full Member, Russian Academy of Sciences, Scientific Supervisor, Research Institute of Cardiology, Tomsk National Research Medical Center, Tomsk, Russian Federation

Поступила 30.11.2022
Отправлена на доработку 28.12.2022
Принята к печати 24.02.2023

Received 30.11.2022
Revision received 28.12.2022
Accepted 24.02.2023

ТРУДНОСТИ В ПРИМЕНЕНИИ МАРКЕРОВ ВОСПАЛЕНИЯ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ АНЕМИИ ХРОНИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ У ПАЦИЕНТОВ С САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ 1-ГО И 2-ГО ТИПА

Мусина Н.Н.¹, Прохоренко Т.С.², Саприна Т.В.¹, Зима А.П.¹

¹ ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ,
г. Томск, Россия

² ОГБУЗ «Томский региональный центр крови», г. Томск, Россия

Резюме. Цель исследования – оценить выраженность изменений значений маркеров-кандидатов дифференциальной диагностики анемии хронических заболеваний у пациентов с сахарным диабетом 1-го и 2-го типа. Оценивали: общее количество лейкоцитов, скорость оседания эритроцитов, содержание С-реактивного белка, TNF α , ферритина и гепсидина. Проведено обследование 50 человек с сахарным диабетом 1-го типа и 81 человек с сахарным диабетом 2-го типа. Диагноз «анемия» устанавливался на основании данных об уровне гемоглобина, содержании эритроцитов в крови, ферритина и железа сыворотки. Далее определялся вид анемического синдрома. Пациенты были разделены на группы: 14 пациентов с сахарным диабетом и анемией хронических заболеваний, 15 человек с сахарным диабетом и железодефицитной анемией, 38 больных диабетом с латентным дефицитом железа и 64 пациента с сахарным диабетом без анемии. Группу сравнения составили 17 здоровых добровольцев. Показано, что в общей выборке пациентов с сахарным диабетом анемию хронических заболеваний отличала лишь скорость оседания эритроцитов, которая была выше, чем при железодефицитной анемии, латентном дефиците железа и у больных без анемии. Была проанализирована выраженность воспаления у больных сахарным диабетом в зависимости от его типа. Концентрация гепсидина в крови больных диабетом, независимо от типа, превышала его содержание в крови у здоровых лиц. Характерным для воспаления при сахарном диабете 1-го типа оказалась повышенная концентрация в сыворотке крови TNF α . Сахарный диабет 2-го типа характеризовался повышением: скорости оседания эритроцитов – относительно здоровых лиц; концентрации С-реактивного белка – в сравнении со здоровыми добровольцами и пациентами с сахарным диабетом 1-го типа; уровня ферритина – по сравнению с больными сахарным диабетом 1-го типа. Учитывая тип диабета и вид нарушения метаболизма железа установлено, что при сахарном диабете 1-го и 2-го типов только скорость оседания эритроцитов у больных с анемией хронических заболе-

Адрес для переписки:

Зима Анастасия Павловна
ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский
университет» Министерства здравоохранения РФ
634050, Россия, г. Томск, Московский тракт, 2.
Тел.: 8 (3822) 90-11-01 (доб. 1661).
E-mail: mmikld.ssmu@gmail.com

Address for correspondence:

Anastasia P. Zima
Siberian State Medical University
2 Moskovsky Rd
Tomsk
634050 Russian Federation
Phone: +7 (3822) 90-11-01 (acc. 1661).
E-mail: mmikld.ssmu@gmail.com

Образец цитирования:

Н.Н. Мусина, Т.С. Прохоренко, Т.В. Саприна, А.П. Зима
«Трудности в применении маркеров воспаления
для диагностики анемии хронических заболеваний
у пациентов с сахарным диабетом 1-го и 2-го типа»
// Медицинская иммунология, 2024. Т. 26, № 1. С. 57-66.
doi: 10.15789/1563-0625-POA-2623

© Мусина Н.Н. и соавт., 2024
Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

N.N. Musina, T.S. Prokhorenko, T.V. Saprina, A.P. Zima
“Problems of applying inflammatory markers to diagnostics
of anemia of chronic disease in patients with type 1 and type
2 diabetes”, Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya
Immunologiya, 2024, Vol. 26, no. 1, pp. 57-66.
doi: 10.15789/1563-0625-POA-2623

© Musina N.N. et al., 2024
The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License
DOI: 10.15789/1563-0625-POA-2623

ваний была достоверно выше, чем у пациентов с железодефицитной анемией и без анемии. В статье обсуждаются причины сложностей применения маркеров воспаления (ферритина и гепсидина) в качестве параметров верификации анемии хронических заболеваний у больных сахарным диабетом. Указывается на необходимость учета различий в механизмах развития воспаления при сахарном диабете 1-го или 2-го типа при попытке применения на практике в качестве дополнительных диагностических маркеров цитокинов и С-реактивного белка. Дается обоснование перспективности определения скорости оседания эритроцитов, с рекомендацией определенного порогового значения, для выявления анемии хронических заболеваний у пациентов с сахарным диабетом 1-го и 2-го типа.

Ключевые слова: анемия хронических заболеваний, сахарный диабет, маркеры воспаления, дифференциальная диагностика, анемии, гепсидин, скорость оседания эритроцитов

PROBLEMS OF APPLYING INFLAMMATORY MARKERS TO DIAGNOSTICS OF ANEMIA OF CHRONIC DISEASE IN PATIENTS WITH TYPE 1 AND TYPE 2 DIABETES

Musina N.N.^a, Prokhorenko T.S.^b, Saprina T.V.^a, Zima A.P.^a

^a Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation

^b Tomsk Regional Blood Center, Tomsk, Russian Federation

Abstract. The purpose of our study was to evaluate the severity of changes in the values of candidate markers for differential diagnosis of anemia of chronic diseases in patients with type 1 and type 2 diabetes mellitus. Total leukocyte counts, erythrocyte sedimentation rate (ESR), content of C-reactive protein, TNF α , ferritin and hepcidin were evaluated. We examined 50 persons with type 1 diabetes mellitus and 81 subjects with type 2 diabetes mellitus. The diagnosis of anemia was established on the basis of hemoglobin levels, blood erythrocyte counts, ferritin and iron in blood serum. Further on, the types of anemic syndrome were specified. The patients were divided into distinct groups: 14 patients with diabetes mellitus and anemia of chronic diseases, 15 people with diabetes mellitus and iron deficiency anemia, 38 patients with diabetes and latent iron deficiency, and 64 patients with diabetes mellitus without anemia. The comparison group consisted of 17 healthy volunteers. The sub-groups of patients with diabetes mellitus anemia of chronic diseases could be distinguished only by the ESR, which was higher than in iron deficiency anemia, latent iron deficiency or among patients without anemia. The severity of inflammation in diabetic patients was analyzed, depending on its type. Blood hepcidin concentration in diabetic patients, regardless of its type, exceeded its content in healthy individuals. Inflammation in type 1 diabetes mellitus was accompanied by elevated serum concentrations of TNF α . Diabetes mellitus type 2 was characterized by an increase in ESR versus relatively healthy individuals; higher concentrations of C-reactive protein compared to healthy volunteers and patients with type 1 diabetes mellitus; ferritin levels were increased against the group with type 1 diabetes mellitus. With respect to the type of diabetes and pattern of altered iron, we have found that, in type 1 and type 2 diabetes mellitus, only the ESR values in patients with anemia of chronic diseases were significantly higher than in patients with iron deficiency anemia and without anemia. The article discusses potential reasons for the problems occurring upon usage of inflammatory markers (ferritin and hepcidin) when verifying anemia of chronic diseases in patients with diabetes mellitus. It is specified that the different mechanisms of inflammation in type 1 or type 2 diabetes mellitus should be taken into accounts when trying to use cytokines and C-reactive protein as additional diagnostic markers in clinical practice. The rationale is provided for determining the ESR parameter, giving recommendations for a certain threshold value for detecting anemia of chronic diseases in patients with type 1 and type 2 diabetes mellitus.

Keywords: anemia of chronic diseases, diabetes mellitus, inflammation markers, differential diagnosis, anemia, hepcidin, erythrocyte sedimentation rate

Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта РФФИ Аспиранты №19-315-90061 «Взаимосвязь нарушений феррокинетики и метаболических изменений при сахарном диабете».

Введение

Поиск диагностических подходов и маркеров, позволяющих надежно дифференцировать различные виды анемии и, главным образом, отличать железодефицитную анемию (ЖДА) от анемии хронических заболеваний (АХЗ) при различных заболеваниях связан с пониманием важности правильного назначения терапии для коррекции анемического синдрома. Неоправданное назначение препаратов железа при анемии, ведущим механизмом развития которой является накопление и удержание железа внутри клеток, усугубляет нарушение феррокинетики и усиливает окислительный стресс [9, 13]. Попытки оптимизировать существующие диагностические алгоритмы, применение которых на практике часто затруднительно, отражены в различных исследованиях для заболеваний с выраженной воспалительной реакцией (например, инфекционных и аутоиммунных [4, 5]), а также при состояниях, ассоциированных с субклиническим, низкоактивным воспалением [2]. Выделив наиболее часто упоминаемые, связанные с воспалением маркеры-кандидаты для верификации АХЗ (общее количество лейкоцитов, скорость оседания эритроцитов, С-реактивный белок, TNF α , ферритин и гепсидин), мы провели их сравнительный анализ у больных сахарным диабетом с различными видами нарушения метаболизма железа.

Цель исследования – оценить выраженность изменений значений маркеров-кандидатов дифференциальной диагностики анемии хронических заболеваний у пациентов с сахарным диабетом 1-го и 2-го типа.

Материалы и методы

Проведено обследование 131 пациента с сахарным диабетом (СД), проходившим лечение на базе эндокринологической клиники ФГБОУ ВО «Сибирского государственного медицинского университета» Минздрава России (СибГМУ) г. Томска, лабораторный блок исследования проводился на базе Централизованной клинко-диагностической лаборатории СибГМУ. Пациенты были разделены на группы в зависимости от типа диабета: 50 человек с сахарным диабетом 1-го типа (СД1) и 81 человек с сахарным диабетом 2-го типа (СД2). У данных пациентов устанавли-

вался диагноз «анемия» на основании базовых диагностических критериев – уровня гемоглобина, содержания эритроцитов в крови, ферритина и железа сыворотки. Далее для решения поставленной цели было необходимо предположить конкретный вид нарушения феррокинетики у пациентов с СД1 и СД2 – латентный дефицит железа, железодефицитная или анемия хронических заболеваний. Для этого были использованы диагностические критерии в соответствии с Федеральными клиническими рекомендациями по диагностике и лечению железодефицитной анемии (2015) и Федеральными клиническими рекомендациями по диагностике и лечению анемии хронических болезней (2014). Таким образом, пациенты были стратифицированы на 4 группы: 14 пациентов с СД и анемией хронических заболеваний (АХЗ), 15 человек с СД и железодефицитной анемией (ЖДА), 38 больных диабетом с латентным дефицитом железа и 64 пациента с СД без анемии. Группу сравнения составили 17 здоровых добровольцев, сопоставимого группам обследования возраста.

Критериями исключения из программы исследования являлись: декомпенсация сахарного диабета с кетоацидозом и/или осмотической дегидратацией; хроническая болезнь почек стадии С5, нефропатия стадии протеинурии; прием препаратов железа; инфекционные заболевания в стадии обострения и специфические инфекционные заболевания (ВИЧ/СПИД, вирусные гепатиты любой степени активности, туберкулез), цирроз печени вирусной и аутоиммунной этиологии; онкологические заболевания; хроническая обструктивная болезнь легких и бронхиальная астма; гемотрансфузии в период одного месяца до включения в исследование и на момент включения; острая почечная, печеночная и сердечная недостаточность; предоперационный и постоперационный период; курение на момент включения в исследование; отказ пациента от участия в исследовании, не подписанное информированное согласие.

Материалом исследования явилась сыворотка венозной крови, взятая утром до приема пищи из локтевой вены в количестве 6 мл в вакуумную пробирку с активатором свертывания диоксидом кремния, и цельная стабилизированная венозная кровь, взятая в объеме 4 мл (наполнитель вакуумной пробирки – K₂ЭДТА).

Оценка скорости оседания эритроцитов (мм/ч) и количества лейкоцитов ($\times 10^9$ /л) в крови проводилась на гематологическом анализаторе XN1000 (Sysmex, Япония), концентрация ферритина (нг/мл) исследовалась с помощью анализа-

тора Architect i2000SR (Abbott, США). Методом твердофазного иммуноферментного анализа в сыворотке крови определялись концентрации высокочувствительного С-реактивного белка (СРБ) (нг/мл), TNF α (пг/мл) (АО «Вектор-Бест», Россия) и гепсидина (нг/мл) (Cloud Clone, США), согласно инструкциям фирм-производителей наборов реагентов. Считывание результатов производилось с помощью автоматического фотометра для микропланшет Sunrise (Tecan, Австрия) при длине волны 450 нм. Концентрацию исследуемых маркеров определяли по стандартной калибровочной кривой.

Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью пакета программ SPSS Statistics 23. Проверка нормальности распределения проводилась по критерию Колмагорова–Смирнова. Пороговый уровень значимости (p) был принят равным 0,05. Полученные данные не подчинялись нормальному закону распределения и были представлены в виде медианы и интерквартильного размаха – Me (Q_{0,25}-Q_{0,75}). В целях установления значимости различий зна-

чений показателей между независимыми группами сравнения была проведена статистическая обработка с помощью критериев Краскела–Уоллиса с учетом поправки Бонферрони для трех и четырех групп исследования, Манн–Уитни – для двух групп (пороговый уровень значимости был принят равным p < 0,017, p < 0,013 и p < 0,05 соответственно).

Результаты

В общей выборке пациентов с сахарным диабетом анализ содержания маркеров воспаления в крови показал, что отличительной чертой АХЗ явилась лишь скорость оседания эритроцитов (СОЭ), которая была кратно выше, чем при ЖДА, латентном дефиците железа и у больных без анемии. Количество лейкоцитов в крови, концентрация в сыворотке крови СРБ и TNF α имели сопоставимые значения у больных с АХЗ и ЖДА, страдающих сахарным диабетом. Ожидается, при ЖДА было снижено содержание ферритина, относительно его значений в крови у лиц с АХЗ, латентным дефицитом железа и больных без ане-

ТАБЛИЦА 1. СОДЕРЖАНИЕ МАРКЕРОВ ВОСПАЛЕНИЯ В КРОВИ ПАЦИЕНТОВ С САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ НАЛИЧИЯ И ВИДА АНЕМИИ, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

TABLE 1. CONTENT OF INFLAMMATION MARKERS IN THE BLOOD OF PATIENTS WITH DIABETES MELLITUS DEPENDING ON THE PRESENCE AND TYPE OF ANEMIA, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

Показатель Parameter	Анемия хронических заболеваний Anemia of chronic diseases (n = 14)	Железо- дефицитная анемия Iron deficiency anemia (n = 15)	Латентный дефицит железа Latent iron deficiency (n = 38)	Без анемии Without anemia (n = 64)
Лейкоциты ($\times 10^9/\text{л}$) White blood cells ($\times 10^9/\text{L}$)	8,96 (6,58-10,76)	7,58 (5,18-8,58)	7,27 (6,22-8,38)	6,74 (5,45-7,78)*
Скорость оседания эритроцитов (СОЭ) (мм/час) Erythrocytes sedimentation rate (ESR) (mm/hr)	40,00 (34,00-56,50)	18,00 (7,00-26,00)*	15,50 (8,25-26,00)*	10,50 (5,00-20,00)*
С-реактивный белок (нг/мл) C-reactive protein (ng/mL)	1,92 (1,22-3,02)	4,64 (3,40-12,06)	8,65 (3,59-16,46)*	4,00 (2,00-10,20)
TNF α (пг/мл) TNF α (pg/mL)	13,99 (9,78-16,57)	13,07 (10,90-15,28)	13,07 (7,69-24,02)	11,40 (7,49-17,26)
Ферритин (нг/мл) Ferritin (ng/mL)	81,42 (41,93-251,38)	11,75 (6,39-15,39)*	103,20 (23,04-193,00)#	88,22 (39,25-149,70)#
Гепсидин (нг/мл) Hepcidin (ng/mL)	10,05 (8,08-10,98)	12,37 (5,20-12,89)	9,28 (3,20-13,55)	5,50 (3,15-9,29)*

Примечание. * – достоверность различий по сравнению с аналогичными показателями у пациентов с анемией хронических заболеваний (p < 0,013); # – достоверность различий по сравнению с аналогичными показателями у пациентов с железодефицитной анемией (p < 0,013).

Note. *, the differences are significant against similar indexes of patients with anemia of chronic disease (p < 0.013); #, the differences are significant against similar indexes of patients with iron deficiency anemia (p < 0.013).

ТАБЛИЦА 2. СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ПАРАМЕТРОВ ВОСПАЛЕНИЯ У ПАЦИЕНТОВ С САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

TABLE 2. COMPARATIVE CHARACTERISTICS OF INFLAMMATION PARAMETERS IN PATIENTS WITH DIABETES MELLITUS, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

Показатель Parameter	Обследованные лица Subjects under study		
	Сахарный диабет 1-го типа Diabetes mellitus type 1 (n = 50)	Сахарный диабет 2-го типа Diabetes mellitus type 2 (n = 81)	Здоровые добровольцы Healthy volunteers (n = 17)
Лейкоциты (× 10 ⁹ /л) White blood cells (× 10 ⁹ /L)	6,55 (5,30-7,83)	7,38 (6,08-8,74)	6,08 (5,25-7,53)
Скорость оседания эритроцитов (СОЭ) (мм/час) Erythrocytes sedimentation rate (ESR) (mm/hr)	14,00 (5,00-21,25)	18,00 (9,00-27,00)	7,00 (5,00-9,00) [#]
С-реактивный белок (нг/мл) C-reactive protein (ng/mL)	2,00 (1,05-4,05)	7,00 (3,00-11,85)*	1,32 (1,00-1,65) [#]
TNFα (пг/мл) TNFα (pg/mL)	15,28 (12,41-24,41)	8,54 (6,27-11,60)*	9,68 (5,68-15,38)*
Ферритин (нг/мл) Ferritin (ng/mL)	44,48 (18,35-148,50)	96,52 (42,93-189,70)*	72,05 (43,23-148,60)
Гепсидин (нг/мл) Hepcidin (ng/mL)	9,80 (3,74-12,67)	7,70 (3,44-11,46)	3,78 (2,48-5,01)* #

Примечание. * – достоверность различий по сравнению с аналогичными показателями у пациентов с сахарным диабетом 1-го типа (p < 0,017); # – достоверность различий по сравнению с аналогичными показателями у пациентов с СД2 (p < 0,017).

Note. *, the differences are significant against similar indexes of patients with diabetes mellitus type 1 (p < 0.017); #, the differences are significant against similar indexes of patients with diabetes mellitus type 2 (p < 0.017).

мии. Но его концентрация в крови пациентов с АХЗ не отличалась от результатов, полученных в группах больных без анемии или с латентным дефицитом железа. Важно отметить, что основной, по данным литературы, для АХЗ маркер-кандидат – гепсидин при всех представленных видах нарушения метаболизма железа у пациентов с СД достоверных отличий концентрации в крови не показал. Однако отмечено повышенное содержание гепсидина в крови у пациентов с СД и АХЗ относительно больных СД без анемического синдрома (табл. 1).

Для лучшего понимания полученных результатов была оценена выраженность воспаления у больных СД в зависимости от его типа, без учета наличия анемии. Концентрация гепсидина в крови больных СД, независимо от типа, превышала его содержание в крови у здоровых лиц. Дополнительно к этому, характерным для воспаления при СД1 оказалась повышенная концентрация в сыворотке крови TNFα. Сахарный диабет 2-го типа, в свою очередь, характеризовался повышением: СОЭ – относительно здо-

ровых лиц; концентрации СРБ – в сравнении со здоровыми добровольцами и пациентами с СД1; уровня ферритина – по сравнению с больными СД1 (табл. 2). Проведенный анализ подчеркнул существующие различия в патогенезе воспаления при СД1 и СД2 и указал на возможную необходимость учета различий данных механизмов при выборе дифференциально-диагностических маркеров анемического синдрома.

В связи с этим была проведена дополнительная стратификация групп пациентов, включающая как тип СД, так и вид нарушения метаболизма железа. Среди пациентов с СД1 АХЗ от ЖДА отличали повышенное СОЭ и уровень ферритина в крови. У лиц с АХЗ СОЭ достоверно превышало его значение у пациентов с СД1 без анемии. Похожая картина складывалась и для пациентов с СД2. При АХЗ были выше СОЭ и концентрация ферритина в сыворотке крови, по сравнению с их значениями при ЖДА. Но, как и при СД1, только СОЭ у больных СД2 с АХЗ была значимо выше, чем у пациентов с СД2 без анемии. Достоверный уровень статистической значимости различий

ТАБЛИЦА 3. СОДЕРЖАНИЕ МАРКЕРОВ ВОСПАЛЕНИЯ В КРОВИ ПАЦИЕНТОВ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ТИПА САХАРНОГО ДИАБЕТА С УЧЕТОМ НАЛИЧИЯ И ВИДА АНЕМИЧЕСКОГО СИНДРОМА, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

TABLE 3. CONTENT OF INFLAMMATION MARKERS IN THE BLOOD OF PATIENTS DEPENDING ON THE TYPE OF DIABETES MELLITUS, TAKING INTO ACCOUNT THE PRESENCE AND TYPE OF ANEMIC SYNDROME, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

Показатель Parameter	Пациенты с сахарным диабетом 1 типа Patients with diabetes mellitus type 1				Пациенты с сахарным диабетом 2 типа Patients with diabetes mellitus type 2			
	Анемия хронических заболеваний Anemia of chronic diseases (n = 6)	Железо-дефицитная анемия Iron deficiency anemia (n = 8)	Латентный дефицит железа Latent iron deficiency (n = 13)	Без анемии Without anemia (n = 23)	Анемия хронических заболеваний Anemia of chronic diseases (n = 8)	Железодефицитная анемия Iron deficiency anemia (n = 7)	Латентный дефицит железа Latent iron deficiency (n = 25)	Без анемии Without anemia (n = 41)
Лейкоциты ($\times 10^9/\text{л}$) White blood cells ($\times 10^9/\text{L}$)	9,67 (8,05-10,90)	6,55 (4,94-8,37)	6,64 (4,73-7,17)*	6,13 (5,29-7,41)*	7,51 (6,50-11,03)	7,58 (5,80-10,56)	7,85 (6,89-9,45)*	7,00 (5,90-7,89)
Скорость оседания эритроцитов (СОЭ) (мм/час) Erythrocytes sedimentation rate (ESR) (mm/hr)	48,00 (34,50-63,50)	16,00 (6,25-20,25)*	8,50 (3,50-18,50)*	6,00 (5,00-20,00)*	38,00 (31,00-52,00)	26,00 (12,00-28,00)*	20,00 (12,00-29,25)**	11,00 (6,00-21,00)*
С-реактивный белок (нг/мл) C-reactive protein (ng/mL)	1,20 (0,60-1,80)	3,00 (1,00-5,00)	2,00 (1,38-19,48)	2,00 (1,00-3,00)	2,45 (1,90-11,78)	9,50 (5,20-15,08)*	8,70 (5,50-16,00)	7,00 (2,90-10,80)*
TNF α (пг/мл) TNF α (pg/mL)	15,99 (9,78-22,20)	14,26 (11,99-19,85)	19,20 (13,07-25,21)	16,38 (10,90-24,95)	12,20 (8,18-15,93)	10,30 (9,51-11,09)	6,98 (5,15-8,73)*	8,18 (6,05-12,31)*
Ферритин (нг/мл) Ferritin (ng/mL)	93,30 (38,03-182,08)	6,99 (5,43-13,85)*	19,58 (17,30-103,60)	110,80 (30,33-182,70)	81,43 (44,08-291,68)	12,59 (11,89-17,69)*	125,60 (83,93-195,55)*	87,94 (43,90-136,90)
Гепсидин (нг/мл) Hepcidin (ng/mL)	9,84 (8,18-11,49)	9,74 (6,81-12,67)	9,62 (0,60-13,91)	5,13 (3,45-10,24)	11,45 (5,84-11,95)	12,38 (3,26-13,22)	8,99 (3,42-13,36)	5,47 (2,25-8,73)

Примечание. * – достоверность различий по сравнению с аналогичными показателями у пациентов с АХЗ в подгруппе с идентичным типом СД (p < 0,05). * – достоверность различий по сравнению с аналогичными показателями у пациентов с сахарным диабетом 1 типа в подгруппе с идентичным видом анемии либо ее отсутствием (p < 0,05).

Note. * – significance of differences compared with similar indicators in patients with type 1 diabetes mellitus in a subgroup with an identical type of anemia or without anemia (p < 0.05). * – significance of differences compared with similar indicators in patients with anemia of chronic disease in a subgroup with an identical diabetes mellitus type (p < 0.05).

между содержанием гепсидина в крови больных СД с ЖДА и АХЗ, независимо от типа диабета, не был достигнут (табл. 3).

Анализ различий между значениями показателей у пациентов с СД1 и СД2 и идентичным видом анемии (либо ее отсутствием) повторил закономерности, связанные с особенностями воспалительного ответа определенного типа диабета и описанные в таблице 2. У пациентов с СД1 и латентным дефицитом железа или без анемии концентрация TNF α в крови превышала таковую у больных СД2 в соответствующих подгруппах. Больные СД2 с ЖДА или без анемии имели в крови концентрацию СРБ, превышающую таковую при СД1 у лиц с ЖДА или без анемии. Группу пациентов с СД2 и латентным дефицитом железа характеризовали повышенная СОЭ, количество лейкоцитов в крови и концентрация ферритина относительно данных параметров у больных СД1 с латентным дефицитом железа (табл. 3).

Обсуждение

Анемия является распространенным и не всегда своевременно диагностируемым синдромом, сопутствующим сахарному диабету 1-го или 2-го типа. В случае ее выявления, перед клиническим специалистом встает задача определения конкретного вида анемического синдрома, необходимость дифференцировать ЖДА от АХЗ. В качестве отправной точки для верификации АХЗ используются Федеральные клинические рекомендации по диагностике и лечению анемии хронических болезней, однако их применение для пациентов с СД имеет некоторые ограничения. Во-первых, разработаны данные клинические рекомендации для педиатрической практики, во-вторых, в диагностическом комплексе маркеров метаболизма железа особое значение уделяется ферритину, который, в свою очередь, не только отражает уровень запаса железа в организме, но и относится к белкам острой фазы. Снижение содержания ферритина в сыворотке крови объективно указывает на железодефицитную анемию, но при условии отсутствия сопутствующего воспаления [14]. Также опубликованы исследования, показывающие связь повышенного уровня ферритина с развитием инсулинорезистентности при сахарном диабете [10, 11]. Данные факторы ограничивают информативность существующего алгоритма применительно к больным СД, ведь воспаление и инсулинорезистентность являются неотъемлемыми звеньями патогенеза диабета. В связи с этим возникает необходимость поиска дополнительных маркеров дифференциальной

диагностики анемии хронических заболеваний у пациентов с сахарным диабетом 1-го и 2-го типа.

Известно, что сахарный диабет характеризуется повышением уровня циркулирующих цитокинов и других медиаторов воспаления и острофазных белков. При этом в основе патогенеза сахарного диабета 1-го типа лежит аутоиммунное, органоспецифическое воспаление [16, 17], а при сахарном диабете 2-го типа наличие хронического субклинического воспаления является вторичным и, как правило, рассматривается с точки зрения провоспалительной активности жировой ткани [1, 8, 18, 19]. Выявленные в нашем исследовании отклонения содержания в крови TNF α при СД1 и СРБ при СД2 отражают именно различия патогенеза воспалительного ответа для разных типов диабета, а данные маркеры вряд ли подойдут в качестве дифференциальных для АХЗ и ЖДА у пациентов с сахарным диабетом 1-го и 2-го типа. С позиции выявления АХЗ, подобные отличия механизмов развития воспаления при СД1 и СД2, вероятно, станут существенным ограничением применения на практике других цитокинов, активно продуцируемых иммунокомпетентными клетками при СД1 или жировой тканью при СД2. Либо для разных типов диабета потребуются разработка отдельных диагностических алгоритмов верификации анемического синдрома.

В нашем исследовании как перспективный диагностический параметр проявилась скорость оседания эритроцитов. Повышенные значения СОЭ у пациентов с АХЗ относительно лиц с ЖДА прослеживались как при СД1, так и при СД2. Положительным моментом в данном случае является то, что определение СОЭ относится к категории общедоступных тестов, входящих в состав базового общего анализа крови, а его интеграция в алгоритм дифференциальной диагностики анемического синдрома с рекомендацией определенного порогового значения не повлечет за собой увеличения финансовых или трудовых затрат.

Весомая роль гепсидина в нормальном метаболизме железа и его вклад в механизмы нарушения феррокинетики и развитие анемии хронических заболеваний является неоспоримой [9, 13]. Вовлеченность гепсидина в формирование анемического синдрома у пациентов с СД прослеживается и в настоящем исследовании. Однако возможность использования гепсидина в диагностике нарушений феррокинетики у пациентов с сахарным диабетом и установление референсных значений осложняется необходимостью учета различных сопутствующих патологий органов – печени, почек, жировой ткани,

поскольку они участвуют в продукции и обмене гепсидина [6, 9, 12]. Более того, механизм регуляции и направленность изменения продукции гепсидина достаточно сложны [6, 7, 9, 12, 15] и, вероятно, зависимы от длительности заболевания, наличия и степени прогрессирования его осложнений. Данное направление требует дополнительных исследований, а внедрение гепсидина в клинико-диагностическую практику для больных сахарным диабетом 1-го или 2-го типа пока не представляется возможным.

В настоящее время практическая медицина стремится к расширению персонализированных подходов в диагностике, лечению и прогнозу течения различных заболеваний. Именно сахарный диабет можно отнести к патологии, для которой данный подход реализуется давно и успешно. Показатели контроля углеводного обмена, целевые уровни параметров липидного обмена, мониторинг состояния пациента с учетом осложнений, рекомендуемый темп интенсивности лечения и

выбор препарата для лечения в алгоритме специализированной помощи больным сахарным диабетом уже представлены с позиции персонализации и индивидуализированного выбора. Очевидно, что данный подход необходимо транслировать и на поиск оптимального метода установления определенного вида анемического синдрома, сопутствующего сахарному диабету, учитывая широкий спектр факторов, влияющий на информативность диагностических критериев.

Осознавая всю многогранность сахарного диабета с точки зрения механизмов формирования и поддержания воспалительных реакций, значимость наличия и степени прогрессирования его осложнений, нашим коллективом в период с 2017-2020 гг. было проведено комплексное исследование, результатом которого стал патент № 2770744 от 21.04.2022 г., предлагающий алгоритм дифференциальной диагностики анемического синдрома при сахарном диабете 1-го и 2-го типа [3].

Список литературы / References

1. Климонтов В.В., Тян Н.В., Фазуллина О.Н., Мякина Н.Е., Лыков А.П., Коненков В.И. Клинические и метаболические факторы, ассоциированные с хроническим воспалением низкой интенсивности, у больных сахарным диабетом 2 типа // Сахарный диабет, 2016. Т. 19, № 4. С. 295-302. [Klimontov V.V., Tyan N.V., Fazullina O.N., Myakina N.E., Lykov A.P., Konenkov V.I. Clinical and metabolic factors associated with chronic low-grade inflammation in type 2 diabetic patients. *Sakharnyy diabet = Diabetes Mellitus*, 2016, Vol. 19, no. 4, pp. 295-302. (In Russ.)]
2. Прохоренко Т.С., Зима А.П., Саприна Т.В., Мусина Н.Н., Шахманова Н.С., Васильева О.А., Новицкий В.В. Значение определения маркеров воспаления у беременных с анемическим синдромом и ожирением // Медицинская иммунология, 2018. Т. 20, № 5. С. 639-646. [Prokhorenko T.S., Zima A.P., Saprina T.V., Musina N.N., Shakhmanova N.S., Vasilyeva O.A., Novitsky V.V. Significance of inflammation markers determined in pregnant women with anemic syndrome and obesity. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2018, Vol. 20, no. 5, pp. 639-646. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2018-5-639-646.
3. Саприна Т.В., Мусина Н.Н., Прохоренко Т.С., Зима А.П. Способ дифференциальной диагностики анемического синдрома при сахарном диабете 1 и 2 типа // Патент РФ на изобретение № 2770744 С1 Российская Федерация / 21.04.2022. МПК G01N 33/49. [Saprina T.V., Musina N.N., Prokhorenko T.S., Zima A.P. Method for differential diagnosis of anemia syndrome in type 1 and type 2 diabetes mellitus. Patent RUS No. 2770744 C1 / 21.04.2022].
4. Сахин В.Т., Григорьев М.А., Крюков Е.В., Казаков С.П., Рукавицын О.А. Влияние гепсидина и растворимого рецептора трансферрина на развитие анемии хронических заболеваний у ревматических пациентов // Гематология. Трансфузиология. Восточная Европа, 2020. Т. 6, № 3. С. 311-318. [Sakhin V., Grigoriev M., Kryukov E., Kazakov S., Rukavitsyn O. Influence of Hepsidin and Soluble Transferrin Receptor on the Development of Anemia of Chronic Diseases in Rheumatic Patients. *Gematologiya. Transfuziologiya. Vostochnaya Evropa = Hematology. Transfusiology. Eastern Europe*, 2020, Vol. 6, no. 3, pp. 311-318. (In Russ.)]
5. Суржикова Г.С., Ключкова-Абельянц С.А. Гепсидин-25: новые возможности в диагностике железодефицитных анемий и анемий хронических заболеваний // Клиническая лабораторная диагностика, 2017. Т. 62, № 7. С. 414-417. [Surzhikova G.S., Klochkova-Abelyants S.A. The Gepsidin-25: new possibilities in diagnostic of iron-deficiency anemias and anemias of chronic diseases. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika = Russian Clinical Laboratory Diagnostics*, 2017, Vol. 62, no. 7, pp. 414-417. (In Russ.)]
6. Addo L., Ikuta K., Tanaka H., Toki Y., Hatayama M., Yamamoto M., Ito S., Shindo M., Sasaki Y., Shimonaka Y., Fujiya M., Kohgo Y. The three isoforms of hepcidin in human serum and their processing determined by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-tandem MS). *Int. J. Hematol.*, 2016, Vol. 103, no. 1, pp. 34-43.

7. de Domenico I., Zhang T.Y., Koenig C.L., Branch R.W., London N., Lo E., Daynes R.A., Kushner J.P., Li D., Ward D.M., Kaplan J. Hecpudin mediates transcriptional changes that modulate acute cytokine-induced inflammatory responses in mice. *J. Clin. Invest.*, 2010, Vol. 120, no. 7, pp. 2395-2405.
8. Esser N., Legrand-Poels S., Piette J., Scheen A.J., Paquot N. Inflammation as a link between obesity, metabolic syndrome and type 2 diabetes. *Diabetes Res. Clin. Pract.*, 2014, Vol. 105, no. 2, pp. 141-150.
9. Ganz T., Nemeth E. Hecpudin and iron homeostasis. *Biochim. Biophys. Acta*, 2012, no. 1823, pp. 1434-1443.
10. Huang J., Karnchanasorn R., Ou H.Y., Feng W., Chuang L.M., Chiu K.C., Samoa R. Association of insulin resistance with serum ferritin and aminotransferases-iron hypothesis. *World J. Exp. Med.*, 2015, Vol. 5, no. 4, pp. 232-243.
11. Huth C., Beuerle S., Zierer A., Heier M., Herder C., Kaiser T., Koenig W., Kronenberg F., Oexle K., Rathmann W., Roden M., Schwab S., Seissler J., Stöckl D., Meisinger C., Peters A., Thorand B. Biomarkers of iron metabolism are independently associated with impaired glucose metabolism and type 2 diabetes: the KORA F4 study. *Eur. J. Endocrinol.*, 2015, Vol. 173, no. 5, pp. 643-653.
12. Kulaksiz H., Fein E., Redecker P., Stremmel W., Adler G., Cetin Y. Pancreatic beta-cells express hecpudin, an iron-uptake regulatory peptide. *J. Endocrinol.*, 2008, Vol. 197, no. 2, pp. 241-249.
13. Nemeth E., Ganz T. The Role of hecpudin in iron metabolism. *Acta Haematol.*, 2009, no. 122, pp. 78-86.
14. Pasricha S.R., Drakesmith H. Iron deficiency anemia: problems in diagnosis and prevention at the population level. *Hematol. Oncol. Clin. North. Am.*, 2016, Vol. 30, no. 2, pp. 309-325.
15. Pechlaner R., Weiss G., Bansal S., Mayr M., Santer P., Pallhuber B., Notdurfter M., Bonora E., Willeit J., Kiechl S. Inadequate hecpudin serum concentrations predict incident type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Metab. Res. Rev.*, 2016, Vol. 32, no. 2, pp. 187-192.
16. Rabinovitch A., Suarez-Pinzon W.L. Roles of cytokines in the pathogenesis and therapy of type 1 diabetes. *Cell Biochem. Biophys.*, 2007, Vol. 48, no. 2-3, pp. 159-163.
17. Uno S., Imagawa A., Okita K., Sayama K., Moriwaki M., Iwahashi H., Yamagata K., Tamura S., Matsuzawa Y., Hanafusa T., Miyagawa J., Shimomura I. Macrophages and dendritic cells infiltrating islets with or without beta cells produce tumour necrosis factor-alpha in patients with recent-onset type 1 diabetes. *Diabetologia*, 2007, Vol. 50, no. 3, pp. 596-601.
18. Wang Z., Shen X.-H., Feng W.-M., Ye G.-F., Qiu W., Li B. Analysis of inflammatory mediators in prediabetes and newly diagnosed type 2 diabetes patients. *J. Diabetes Res.*, 2016, Vol. 2016, no. 4, pp. 1-10.
19. Yamamoto Y., Yamamoto H. RAGE-Mediated inflammation, type 2 diabetes, and diabetic vascular complication. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*, 2013, Vol. 4, no. 4, pp. 1-10.

Авторы:

Мусина Н.Н. — к.м.н., врач-эндокринолог эндокринологической клиники, ассистент кафедры факультетской терапии с курсом клинической фармакологии ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Томск, Россия

Прохоренко Т.С. — к.м.н., врач клинической лабораторной диагностики ОГБУЗ «Томский региональный центр крови», г. Томск, Россия

Authors:

Musina N.N., PhD (Medicine), Endocrinologist, Clinics of Endocrinology, Assistant Professor, Department of Faculty Therapy with a course of Clinical Pharmacology, Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation

Prokhorenko T.S., PhD (Medicine), Doctor of Clinical Laboratory Diagnostics, Tomsk Regional Blood Center, Tomsk, Russian Federation

Саприна Т.В. — д.м.н., доцент, заведующая эндокринологической клиникой, врач-эндокринолог, профессор кафедры факультетской терапии с курсом клинической фармакологии ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Томск, Россия

Зима А.П. — д.м.н., руководитель Центра молекулярной медицины, заведующая централизованной клинико-диагностической лабораторией, профессор кафедры патофизиологии ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Томск, Россия

Saprina T.V., PhD, MD (Medicine), Head, Clinics of Endocrinology, Professor, Department of Faculty Therapy with a course of Clinical Pharmacology, Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation

Zima A.P., PhD, MD (Medicine), Head, Center for Molecular Medicine, Head, Centralized Clinical Diagnostic Laboratory, Professor, Department of Pathophysiology, Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation

Поступила 08.12.2022

Отправлена на доработку 19.12.2022

Принята к печати 24.02.2023

Received 08.12.2022

Revision received 19.12.2022

Accepted 24.02.2023

ЦИТОКИНОВЫЙ ПРОФИЛЬ СЛЮНЫ ПРИ ПИЩЕВОЙ АЛЛЕРГИИ У БОЛЬНЫХ АТОПИЧЕСКИМ ДЕРМАТИТОМ И ПСОРИАЗОМ

Барило А.А., Смирнова С.В., Перетьячко О.В.

Научно-исследовательский институт медицинских проблем Севера – обособленное подразделение ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр “Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук”», г. Красноярск, Россия

Резюме. В мире отмечается стремительный рост распространенности аллергических и аутоиммунных заболеваний. Известно, что аллергическое воспаление чаще всего носит системный характер с вовлечением в патологический процесс различных органов и систем, таких как кожа, респираторный и желудочно-кишечный тракт с развитием дермато-респираторных, дермато-интестинальных и других проявлений. Особого внимания заслуживает изучение особенностей цитокинового профиля в слюне, поскольку данные характеристики отражают не только местные, но и системные нарушения. Особую актуальность представляет изучение местной цитокиновой регуляции межклеточных взаимодействий при пищевой аллергии.

Цель исследования – изучить концентрацию IL-4, IL-10, IFN γ , секреторного IgA в слюнной жидкости, концентрацию общего иммуноглобулина E и эозинофильного катионного протеина в сыворотке крови у больных атопическим дерматитом и псориазом с сопутствующей пищевой аллергией.

В исследование включены больные атопическим дерматитом (АтД, 1-я группа, n = 20), псориазом с сопутствующей пищевой аллергией (ПС, 2-я группа, n = 27), псориазом без сопутствующей аллергии (ПС, 3-я группа сравнения, n = 23). Количественная оценка концентрации цитокинов (IL-4, IL-10, IFN γ , sIgA) в слюнной жидкости проводилась методом твердофазного иммуноферментного анализа. Концентрации общего иммуноглобулина E и эозинофильного катионного протеина в сыворотке крови определяли методом непрямого иммунофлуоресцентного анализа. Статистическую обработку полученных результатов проводили с помощью прикладных программ Statistica 8.0.

В группах больных атопическим дерматитом (1-я группа) и псориазом с сопутствующей пищевой аллергией (2-я группа) отмечено статистически значимое повышение концентрации IL-4 и IL-10 в слюне, а также общего иммуноглобулина E в сыворотке крови в сравнении с группой больных псориазом без сопутствующей аллергии (3-я группа) и контрольной группой. При исследовании концентрации IFN γ в слюне статистически значимых межгрупповых различий выявлено не было.

Концентрация sIgA в слюне была статистически значимо выше в группах больных атопическим дерматитом и псориазом с сопутствующей пищевой аллергией в сравнении с контрольной группой и группой больных ПС без аллергии (3-я группа).

Адрес для переписки:

Барило Анна Александровна
Научно-исследовательский институт медицинских проблем Севера
660022, Россия, г. Красноярск,
ул. Партизана Железняка, 3г.
Тел.: 8 (913) 158-40-20.
E-mail: anntomsk@yandex.ru

Address for correspondence:

Anna A. Barilo
Research Institute of Medical Problems of the North
3g Partizan Zheleznyak St
Krasnoyarsk
660022 Russian Federation
Phone: +7 (913) 158-40-20.
E-mail: anntomsk@yandex.ru

Образец цитирования:

А.А. Барило, С.В. Смирнова, О.В. Перетьячко
«Цитокиновый профиль слюны при пищевой аллергии у больных атопическим дерматитом и псориазом»
// Медицинская иммунология, 2024. Т. 26, № 1.
С. 67-74. doi: 10.15789/1563-0625-CPO-2638

© Барило А.А. и соавт., 2024
Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

A.A. Barilo, S.V. Smirnova, O.V. Peretyatko “Cytokine profile of oral fluid in patients with food allergy associated with atopic dermatitis and psoriasis”, *Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2024, Vol. 26, no. 1, pp. 67-74.
doi: 10.15789/1563-0625-CPO-2638

© Barilo A.A. et al., 2024
The article can be used under the Creative Commons Attribution 4.0 License
DOI: 10.15789/1563-0625-CPO-2638

Таким образом, цитокиновый профиль слюны характеризуется однонаправленными изменениями при пищевой аллергии, шоквым органом которой является кожа, независимо от нозологической формы заболевания (атопический дерматит, псориаз). Слюнная жидкость является легко доступным материалом для оценки состояния мукозального иммунитета при пищевой аллергии.

Ключевые слова: псориаз, atopический дерматит, цитокины, интерлейкины, секреторный иммуноглобулин А, эозинофильный катионный протеин

CYTOKINE PROFILE OF ORAL FLUID IN PATIENTS WITH FOOD ALLERGY ASSOCIATED WITH ATOPIC DERMATITIS AND PSORIASIS

Barilo A.A., Smirnova S.V., Peretyatko O.V.

Research Institute of Medical Problems of the North, Krasnoyarsk Research Center, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Krasnoyarsk, Russian Federation

Abstract. The world is experiencing a rapid increase in the prevalence of allergic and autoimmune diseases. It is known that allergic inflammation is most often systemic, involving various organs and systems in the pathological process, such as the skin, respiratory and gastrointestinal tract with the development of dermatorespiratory, dermato-intestinal and other manifestations. The study of the features of the cytokine profile in oral fluid (saliva) deserves special attention, since these characteristics reflect not only local, but also systemic disorders. Of particular relevance is the study of local cytokine regulation of intercellular interactions in food allergies. Our objective was to study the concentration of IL-4, IL-10, IFN γ , secretory IgA in salivary fluid, the concentrations of total immunoglobulin E and eosinophilic cationic protein in blood serum of the patients with atopic dermatitis and psoriasis with concomitant food allergies.

The study included patients with atopic dermatitis (AD, group 1, n = 20), psoriasis with concomitant food allergy (PS, group 2, n = 27), psoriasis without concomitant allergies (PS, comparison group 3, n = 23). Quantitative assessment of the cytokine concentrations (IL-4, IL-10, IFN γ , sIgA) in salivary fluid was carried out by enzyme-linked immunosorbent assay. Concentrations of total immunoglobulin E and eosinophilic cationic protein in blood serum were determined by indirect immunofluorescence. The obtained results were processed using the Statistica 8.0 applied software.

In groups of patients with atopic dermatitis (Group 1) and psoriasis with concomitant food allergy (Group 2), we have noted a statistically significant increase of salivary IL-4 and IL-10, as well as of total immunoglobulin E concentrations in blood serum as compared with a group of patients with psoriasis without concomitant allergies (group 3), and with control group. When studying concentrations of IFN γ in saliva, no statistically significant intergroup differences were found. The concentration of sIgA in saliva was significantly higher in the groups of patients with atopic dermatitis and psoriasis accompanied by food allergies in comparison with control group and the group of psoriatic patients without food allergies (group 3).

The cytokine profile of saliva is characterized by unidirectional changes in food allergy. Skin seems to be the shock organ in this condition, regardless of nosological form of the disease (atopic dermatitis or psoriasis). Salivary fluid is an easily accessible material when assessing the state of mucosal immunity in food allergies.

Keywords: psoriasis, atopic dermatitis, cytokines, interleukins, secretory immunoglobulin A, eosinophilic cationic protein

Введение

В мире отмечается стремительный рост распространенности аллергических и аутоиммунных заболеваний [17]. Известно, что аллергическое воспаление чаще всего носит системный характер с вовлечением в патологический процесс различных органов и систем, таких как кожа, респираторный и желудочно-кишечный тракт с развитием дермато-респираторных, дер-

мато-интестинальных и других проявлений [27]. Аллергические и аутоиммунные заболевания являются многофакториальными патологиями, чаще всего генетически детерминированными, в этиопатогенезе которых важная роль принадлежит факторам окружающей среды [17, 27]. Несмотря на различия в клинических проявлениях аллергических и аутоиммунных заболеваний в основе их иммунопатогенеза лежит дисбаланс сложной сети цитокинов [8]. Так, основными

факторами, способствующими развитию аллергического (атопического) воспаления, являются цитокины Th2-профиля [20]. Псориаз (ПС) – классическое аутоиммунное заболевание, сопровождающееся неконтролируемой пролиферацией кератиноцитов, и его иммунопатогенез в значительной степени связан с цитокинами Th1/Th17-профиля [4, 5]. Шоковым органом развития воспаления при atopическом дерматите (АтД) и псориазе является кожа. Эпидермальные кератиноциты реагируют на цитокины Т-лимфоцитов, изменяя их рост и дифференцировку, что составляет основную часть общего фенотипа аллергических и аутоиммунных заболеваний кожи [8]. В литературе активно обсуждается вопрос разнонаправленности цитокинового профиля у больных ПС [2, 3]. В ряде исследований установлено, что наличие В-лимфоцитов в очагах поражения кожи при ПС способствует переключению иммунного ответа с Th1- на Th2-тип [23]. С данным фактом связывают повышение частоты встречаемости аллергических (атопических) реакций у больных ПС [10, 24]. Особое внимание уделяется исследованию роли пищевой аллергии в развитии ПС [1].

Известна ведущая роль отдельных цитокинов в развитии аллергического воспаления [27]. При аллергических заболеваниях atopического генеза отмечено повышение концентрации интерлейкина-4 (IL-4) и снижение концентрации интерлейкина-10 (IL-10) в сыворотке крови, что коррелирует с высоким уровнем общего IgE в сыворотке крови [15, 22, 25]. Установлено, что интерферон-гамма (IFN γ) – цитокин Th1-профиля, который действует одновременно с цитокинами Th2-профиля в поддержании хронического аллергического воспаления [14, 21]. Кроме того, у больных пищевой аллергией отмечено снижение уровня секреторного IgA (sIgA) [6, 13, 16]. Одним из перспективных направлений современной медицины является разработка и внедрение в практику информативных неизвазивных технологий диагностики. Альтернативным субстратом для выявления аллергического воспаления может быть секрет слюнных желез с учетом орального аллергического синдрома в процессе формирования гастроинтестинальных проявлений аллергии, поскольку слизистая оболочка полости рта является первым барьером на пути проникновения аллергенов в организм, в частности при пищевой аллергии [9]. Слюна представляет собой смесь секрета больших слюнных желез и десневой жидкости. Она также содержит почти все элементы, присутствующие в крови и проходящие через межклеточные пространства в составе парацеллюлярного транспорта [9]. Особого внимания заслуживает изучение особенностей цитокинового профиля в слюне, поскольку данные

характеристики отражают не только местные, но и системные нарушения. Согласно данным литературы, концентрация цитокинов в сыворотке крови и слюнной жидкости является сопоставимой [18]. Особую актуальность представляет изучение местной цитокиновой регуляции межклеточных взаимодействий при пищевой аллергии.

Цель исследования – изучить концентрацию IL-4, IL-10, IFN γ , секреторного IgA в слюнной жидкости, концентрацию общего иммуноглобулина E (IgE) и эозинофильного катионного протеина в сыворотке крови у больных atopическим дерматитом и псориазом с сопутствующей пищевой аллергией.

Материалы и методы

В исследование включены больные atopическим дерматитом (АтД, 1-я группа, n = 20), псориазом с сопутствующей пищевой аллергией (ПС, 2-я группа, n = 27), псориазом без сопутствующей аллергии (ПС, 3-я группа сравнения, n = 23). Средний возраст больных 1-й группы составил 31,5 \pm 2,5 года, 2-й группы – 43,1 \pm 2,7 года, 3-й группы – 42,1 \pm 2,8 года. Контрольную группу составили практически здоровые люди (4-я группа, n = 19) в том же возрастном диапазоне. В группе больных ПС с сопутствующей пищевой аллергией индекс PASI составил 14,2 (5,8-12,0), в группе больных псориазом без сопутствующей аллергии – 15,4 (4,4-18,4). Всем больным atopическим дерматитом и псориазом ранее проводилось специфическое аллергологическое обследование (аллергологический анамнез, рick-тестирование), которое показало наличие сенсibilизации к ряду пищевых, пыльцевых и грибковых аллергенов, с учетом общих антигенных детерминант. В группу больных псориазом с сопутствующей пищевой аллергией включены больные с гиперэргическими реакциями по данным кожного рick-тестирования. Исследования одобрены на заседании этического комитета НИИ медицинских проблем Севера обособленного подразделения ФИЦ КНЦ СО РАН (НИИ МПС). Протокол обследования больных соответствовал этическим стандартам и был разрешен комитетом по биомедицинской этике НИИ МПС (Протокол № 12 от 10.12.2013 г.). Право на проведение обследования юридически закреплялось информированным согласием пациента.

Количественная оценка концентрации цитокинов (IL-4, IL-10, IFN γ , sIgA) в слюнной жидкости проводилась методом твердофазного иммуноферментного анализа на автоматическом иммуноферментном анализаторе Alisei Q.S. с помощью тест-систем АО «Вектор-Бест» (г. Новосибирск). Концентрации общего иммуноглобулина E и эозинофильного катионного протеина в

сыворотке крови определяли методом непрямого иммунофлуоресцентного анализа на полуавтоматическом анализаторе Thermo Scientific Multiskan FC. В работе использовалось оборудование Красноярского регионального центра коллективного пользования ФИЦ КНЦ СО РАН.

Статистическую обработку полученных результатов проводили с помощью прикладных программ Statistica 8.0 с расчетом обобщающих коэффициентов: средняя величина (M) и ошибка средней (m). Полученные результаты представлены в виде медианы с интерквартильным размахом (25-75-й процентиля): Me (Q_{0,25}-Q_{0,75}) %. Статистически значимыми считались различия при достигнутом уровне p < 0,05.

Результаты

В результате проведенного исследования установлены особенности концентрации противовоспалительных и провоспалительных цитокинов в слюнной жидкости, регулирующих

приоритетный характер иммунного реагирования у больных атопическим дерматитом и псориазом (табл. 1).

В группах больных атопическим дерматитом (1-я группа) и псориазом с сопутствующей пищевой аллергией (2-я группа) отмечено статистически значимое повышение концентрации IL-4 и IL-10 в слюне, а также общего иммуноглобулина E в сыворотке крови в сравнении с группой больных псориазом без сопутствующей аллергии (3-я группа) и контрольной группой (табл. 1, 2).

При этом статистически значимых различий в концентрации IL-4, IL-10 в слюне, общего иммуноглобулина E и эозинофильного катионного протеина в сыворотке крови между группами больных атопическим дерматитом и псориазом с сопутствующей пищевой аллергией выявлено не было. Данный факт может свидетельствовать об аналогичных механизмах развития аллергического воспаления кожи у больных пищевой ал-

ТАБЛИЦА 1. КОНЦЕНТРАЦИЯ ЦИТОКИНОВ В СЛЮНЕ У БОЛЬНЫХ АТОПИЧЕСКИМ ДЕРМАТИТОМ И ПСОРИАЗОМ, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

TABLE 1. CONCENTRATION OF CYTOKINES IN SALIVA IN PATIENTS WITH ATOPIC DERMATITIS AND PSORIASIS, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

Показатели Indicators	АтД AD (1) (n = 20)	ПС PS (2) (n = 27)	ПС PS (3) (n = 23)	Контроль Control (4) (n = 19)	p
IL-4 (пг/мл) IL-4 (pg/mL)	1,8 (0,4-2,3)	1,5 (0,4-2,3)	0,4 (0,4-1,3)	0,1 (0,1-0,3)	p _{1,2} = 0,4 p _{1,3} = 0,004 p _{1,4} = 0,00003 p _{2,3} = 0,002 p _{2,4} = 0,00001 p _{3,4} = 0,7
IL-10 (пг/мл) IL-10 (pg/mL)	3,3 (1,0-3,7)	2,5 (1,0-2,7)	1,7 (1,0-5,6)	1,0 (0,4-1,3)	p _{1,2} = 0,7 p _{1,3} = 0,07 p _{1,4} = 0,0005 p _{2,3} = 0,9 p _{2,4} = 0,003 p _{3,4} = 0,3
IFN γ (пг/мл) IFN γ (pg/mL)	3,6 (0,8-8,9)	7,5 (2,0-7,7)	5,9 (2,2-9,7)	4,0 (0,0-7,2)	p _{1,2} = 0,6 p _{1,3} = 0,8 p _{1,4} = 0,9 p _{2,3} = 0,5 p _{2,4} = 0,6 p _{3,4} = 0,5
slgA (мг/л) slgA (mg/L)	150,8 (90,8-247,5)	170,8 (96,0-202,5)	107,3 (83,0-202,5)	92,5 (54,3-191,5)	p _{1,2} = 0,8 p _{1,3} = 0,3 p _{1,4} = 0,01 p _{2,3} = 0,1 p _{2,4} = 0,01 p _{3,4} = 0,09

Примечание. Достоверность различий (p) – критерий Манна–Уитни

Note. Significance of differences (p) – Mann–Whitney test.

ТАБЛИЦА 2. КОНЦЕНТРАЦИЯ ОБЩЕГО IgE И ЭОЗИНОФИЛЬНОГО КАТИОННОГО ПРОТЕИНА В СЫВОРОТКЕ КРОВИ БОЛЬНЫХ АТОПИЧЕСКИМ ДЕРМАТИТОМ И ПСОРИАЗОМ, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

TABLE 2. CONCENTRATION OF TOTAL IgE AND EOSINOPHILIC CATIONIC PROTEIN IN THE BLOOD SERUM OF PATIENTS WITH ATOPIC DERMATITIS AND PSORIASIS, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

Показатели Indicators	АтД AD (1) (n = 20)	ПС PS (2) (n = 27)	ПС PS (3) (n = 23)	Контроль Control (4) (n = 19)	p
IgE (МЕ/мл) IgE (IU/mL)	226,0 (68,4-1000,0)	134,9 (57,9-400,0)	35,7 (17,3-63,0)	46,5 (23,4-144,0)	p _{1,2} = 0,3 p _{1,3} < 0,0001 p _{1,4} = 0,0008 p _{2,3} = 0,00006 p _{2,4} = 0,006 p _{3,4} = 0,6
ЭКП (нг/мл) ECP (ng/mL)	30,9 (13,9-37,3)	13,9 (6,6-35,6)	7,4 (3,3-15,1)	8,8 (4,6-27,1)	p _{1,2} = 0,1 p _{1,3} = 0,00002 p _{1,4} = 0,04 p _{2,3} = 0,009 p _{2,4} = 0,1 p _{3,4} = 0,5

Примечание. Достоверность различий (p) – критерий Манна–Уитни

Note. Significance of differences (p) – Mann–Whitney test.

лергией, проявляющейся атопическим дерматитом и псориазом.

При исследовании концентрации IFN γ в слюне статистически значимых межгрупповых различий выявлено не было. Однако концентрация данного цитокина была выше в группе больных псориазом с сопутствующей пищевой аллергией. Повышенный уровень IFN γ в слюне больных ПС может свидетельствовать о модуляции клеточных механизмов иммунного ответа на фоне гуморальных иммунных реакций. Данный факт подтверждает преобладание клеточных механизмов иммунного ответа при ПС без аллергии.

Выявлены некоторые особенности концентрации секреторного IgA (табл. 1). Концентрация sIgA в слюне была статистически значимо выше в группах больных атопическим дерматитом и псориазом с сопутствующей пищевой аллергией в сравнении с контрольной группой и группой больных ПС без аллергии (3-я группа).

В группе больных атопическим дерматитом установлено достоверное повышение концентрации IL-4 и IL-10 в слюнной жидкости в сравнении с контрольной группой и группой больных ПС без аллергии (3-я группа), что подтверждает преобладание гуморальных механизмов иммунного ответа у данной категории больных. Участие атопических механизмов в развитии атопического дерматита подтверждает статистически значимое повышение концентрации общего иммуноглобулина E и эозинофильного катионного протеина в сыворотке крови в сравнении с группой больных ПС (3-я группа) и контрольной группой (табл. 2).

Обсуждение

Пищевая аллергия характеризуется повышенной проницаемостью слизистой оболочки желудочно-кишечного тракта для пищевых аллергенов, нарушенным ответом дендритных клеток, подавлением Treg-лимфоцитов, активацией тучных клеток, эозинофилов и базофилов, и индукцией синтеза специфических IgE-антител [12]. Пищевая аллергия – это реакция гиперчувствительности, которая может быть опосредована широким спектром не только гуморальных, но и клеточных механизмов [12]. Таким образом, для развития клинической картины пищевой аллергии необходимы дополнительные факторы, отличные от аллерген-специфических IgE. Ключевым фактором развития пищевой аллергии является экспансия тучными клетками слизистой оболочки желудочно-кишечного тракта, контролирующая ее проницаемость для аллергенов [22]. Следовательно, изучение состояния мукозального иммунитета с определением маркеров аллергического воспаления представляет особую важность. Таким образом, актуальность проводимой работы связана с поиском новых маркеров интестинальной аллергии, в частности орального аллергического синдрома.

Центральное место в патогенезе пищевой аллергии занимает поляризация иммунного ответа в сторону гуморальных механизмов, при которых IL-4 стимулирует Th2-тип аллергического воспаления слизистой оболочки желудочно-кишечного тракта. IL-4 – ключевой цитокин мукозального

иммунитета, поскольку он обеспечивает увеличение количества тучных клеток кишечника после употребления пищевого аллергена [9, 22]. Повышение концентрации IL-4 в сыворотке крови у больных аллергией является доказанным фактом. Наибольший интерес представляют работы по изучению концентрации IL-4 в слюнной жидкости. Есть данные о повышении концентрации IL-4 в слюне у больных с аллергией на арахис [9]. Полученные нами результаты исследования свидетельствуют о повышении концентрации IL-4 в слюне больных atopическим дерматитом и псориазом с сопутствующей пищевой аллергией, что согласуется с данными литературы [9, 22].

Гиперпродукция Treg-лимфоцитами IL-10 – мощного противовоспалительного цитокина, приводит к ингибированию важных процессов в эффекторных Th-лимфоцитах и других клетках иммунной системы. IL-10 регулирует эффекторные реакции, связанные с аллергическим воспалением, включая ингибирование продукции цитокинов Th2-лимфоцитами, тучными клетками и эозинофилами, а также модуляцию соотношения IgG4/IgE [25]. Есть данные о роли IL-10, продуцируемого врожденными лимфоидными клетками эпителия слизистых дыхательных путей, в модуляции аллергического воспаления при поллинозе [7]. IL-10 может предотвратить Th2-сенситизацию и продукцию IgE-антител *in vitro*. При этом концентрация IL-10 в бронхоальвеолярной лаважной жидкости у больных бронхиальной астмой была ниже в сравнении с контролем [25]. Кроме того, отмечено снижение концентрации IL-10 при аутоиммунных заболеваниях [15]. Причем в экспериментальных исследованиях на животных подтвержден вклад данного цитокина в патогенез воспалительных заболеваний кожи [11]. Данные о содержании IL-10 в слюне при псориазе крайне немногочисленны. В одном исследовании концентрация IL-10 в слюне у больных псориазом была значительно ниже в сравнении с контролем [19]. В проведенном нами исследовании, напротив, отмечено повышение концентрации IL-10 в слюне при atopическим дерматите и псориазе с сопутствующей пищевой аллергией, что может свидетельствовать о его роли в механизмах развития пищевой аллергии.

В литературе активно обсуждается вопрос об изменении направленности иммунного ответа с Th2-тип на Th1-тип, который является протективным в отношении развития аллергических заболеваний [26]. Было показано, что IFN γ , основной эффекторный цитокин Th1-профиля, имеет решающее значение для регресса аллергического воспаления. В свою очередь снижение продукции IFN γ коррелирует с развитием тяжелых форм

аллергии [21]. IFN γ оказывает как провоспалительный эффект за счет усиления процессинга и представления антигена, так и противовоспалительное действие благодаря его апоптотическим и антипролиферативным свойствам. IFN γ ингибирует функцию Th2-лимфоцитов, стимулирует активацию эозинофилов, продолжительность их жизни или апоптоз [14]. Аллергические заболевания характеризуются снижением синтеза IFN γ в сыворотке крови [20]. В патогенезе псориаза ведущая роль отводится цитокинам Th1/Th17-профиля: IFN γ , IL-17, IL-22 [5]. Концентрация IFN γ в слюне у больных псориазом была значительно ниже в сравнении с контролем [19]. В проведенном нами исследовании не выявлено статистически значимых межгрупповых различий в концентрации IFN γ в слюне больных АтД и ПС. Однако концентрация IFN γ в слюне больных ПС с сопутствующей пищевой аллергией была несколько выше, что может свидетельствовать об активации клеточных механизмов иммунного ответа наряду с гуморальными.

Секреторный иммуноглобулин А (sIgA) является одним из важных факторов защиты слизистой оболочки желудочно-кишечного тракта от токсинов, патогенных микроорганизмов и аллергенов [16]. sIgA оказывает противовоспалительное действие в результате индукции иммунных ответов слизистой оболочки, обусловленных Th2- или Treg-лимфоцитами. sIgA ограничивает опосредованное аллергенами повреждение слизистых оболочек у сенситизированных людей [16]. У больных аллергическими заболеваниями, в частности при пищевой аллергии, отмечено снижение концентрации sIgA [6]. Данные о содержании sIgA при псориазе крайне немногочисленны. Сообщается о снижении концентрации и скорости секреции sIgA в слюне в сравнении с контролем [13]. В проведенном нами исследовании отмечено статистически значимое повышение концентрации sIgA в слюне больных atopическим дерматитом и псориазом с сопутствующей пищевой аллергией, что может быть следствием контакта слизистой оболочки ротовой полости с пищевыми аллергенами и отражать состояние мукозального иммунитета.

Заключение

Таким образом, цитокиновый профиль слюны характеризуется однонаправленными изменениями при пищевой аллергии, шоковым органом которой является кожа, независимо от нозологической формы заболевания (atopический дерматит, псориаз). Слюнная жидкость является легко доступным материалом для оценки состояния мукозального иммунитета при пищевой аллергии.

Список литературы / References

1. Барило А.А., Смирнова С.В. Сравнительный анализ спектра сенсibilизации к пищевым, пыльцевым и грибковым аллергенам пациентов псориазом и атопическим дерматитом // Вопросы питания, 2020. Т. 89, № 5. С. 28-34. [Barilo A.A., Smirnova S.V. The comparative analysis of the spectrum of sensitization to food, pollen and fungal allergens in patients with atopic dermatitis and psoriasis. *Voprosy pitaniya = Problems of Nutrition*, 2020, Vol. 89, no. 5, pp. 28-34. (In Russ.)]
2. Барило А.А., Смирнова С.В., Смольникова М.В. Иммунологические показатели больных псориазом в различные возрастные периоды // Российский иммунологический журнал, 2017. Т.11 (20), № 4. С. 680-681. [Barilo A.A., Smirnova S.V., Smolnikova M.V. Immunological indicators of patients with psoriasis in different age groups. *Rossiyskiy immunologicheskiy zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2017, Vol. 11 (20), no. 4, pp. 680-681. (In Russ.)]
3. Барило А.А., Смирнова С.В., Смольникова М.В. Показатели иммунитета у больных псориазом с артритом в зависимости от возраста // Медицинская иммунология, 2019. Т. 21, № 1. С. 69-76. [Barilo A.A., Smirnova S.V., Smolnikova M.V. Age-dependent indexes of immunity in the patients with psoriatic arthritis. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2019, Vol. 21, no. 1, pp. 69-76. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2019-1-69-76.
4. Кубанова А.А., Кубанов А.А., Мелехина Л.Е., Богданова Е.В. Организация оказания медицинской помощи по профилю «дерматовенерология» в Российской Федерации. Динамика заболеваемости инфекциями, передаваемыми половым путем, болезнями кожи и подкожной клетчатки, 2013-2015 гг. // Вестник дерматологии и венерологии, 2016. № 3. С. 12-28. [Kubanova A.A., Kubanov A.A., Melekhina L.E., Bogdanova E.V. Dermatovenereologic healthcare delivery in Russian Federation. Incidence of sexually transmitted infections and skin disorders, 2013-2015. *Vestnik dermatologii i venerologii = Academic Medical Journal on Dermatology, Venereology and Cosmetology*, 2016, no. 3, pp. 12-28. (In Russ.)]
5. 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.
6. Fagerås M., Tomičić S., Voor T., Björkstén B., Jenmalm M.C. Slow salivary secretory IgA maturation may relate to low microbial pressure and allergic symptoms in sensitized children. *Pediatr. Res.*, 2011, Vol. 70, no. 6, pp. 572-577.
7. Golebski K., Layhadi J.A., Sahiner U., Steveling-Klein E.H., Lenormand M.M., Li R.C.Y., Bal S.M., Heesters B.A., Vilà-Nadal G., Hunewald O., Montamat G., He F.Q., Ollert M., Fedina O., Lao-Araya M., Vijverberg S.J.H., Maitland-van der Zee A.H., van Drunen C.M., Fokkens W.J., Durham S.R., Spits H., Shamji M.H. Induction of IL-10-producing type 2 innate lymphoid cells by allergen immunotherapy is associated with clinical response. *Immunity*, 2021, Vol. 54, no. 2, pp. 291-307.
8. Guttman-Yassky E., Krueger J.G. Atopic dermatitis and psoriasis: two different immune diseases or one spectrum? *Curr. Opin. Immunol.*, 2017, Vol. 48, pp. 68-73.
9. Ho H.E., Chun Y., Jeong S., Jumreornvong O., Sicherer S.H., Bunyavanich S. Multidimensional study of the oral microbiome, metabolite, and immunologic environment in peanut allergy. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2021, Vol. 148, no. 2, pp. 627-632.
10. Hosseini P., Khoshkhui M., Hosseini R.F. Ahanchian H., Ravanshad Y., Layegh P., Bakhshoudeh B., Ariaee N. Investigation of the relationship between atopy and psoriasis. *Postepy Dermatol. Alergol.*, 2019, Vol. 36, no. 3, pp. 276-281.
11. Justa S., Zhou X., Sarkar S. Endogenous IL-22 plays a dual role in arthritis: regulation of established arthritis via IFN- γ responses. *PLoS One*, 2014, Vol. 9, no. 3, e93279. doi: 10.1371/journal.pone.0093279.
12. Kanagaratham C., El Ansari Y.S., Lewis O.L., Oettgen H.C. IgE and IgG Antibodies as regulators of mast cell and basophil functions in food allergy. *Front. Immunol.*, 2020, Vol. 11, 603050. doi: 10.3389/fimmu.2020.603050.
13. Koh D., Yang Y., Khoo L., Nyunt S.Z., Ng V., Goh C.L. Salivary immunoglobulin A and lysozyme in patients with psoriasis. *Ann. Acad. Med. Singap.*, 2004, Vol. 33, no. 3, pp. 307-310.
14. Mitchell C., Provost K., Niu N., Homer R., Cohn L. IFN- γ acts on the airway epithelium to inhibit local and systemic pathology in allergic airway disease. *J. Immunol.*, 2011, Vol. 187, no. 7, pp. 3815-3820.
15. Ouyang W., O'Garra A. IL-10 Family cytokines IL-10 and IL-22: from basic science to clinical translation. *Immunity*, 2019, Vol. 50, no. 4, pp. 871-891.
16. Ren W., Wang K., Yin J., Chen S., Liu G., Tan B., Wu G., Bazer F.W., Peng Y., Yin Y. Glutamine-induced secretion of intestinal secretory immunoglobulin A: A mechanistic perspective. *Front. Immunol.*, 2016, Vol. 7, 503. doi: 10.3389/fimmu.2016.00503.
17. Sicherer S.H., Warren C.M., Dant C., Gupta R.S., Nadeau K.C. Food allergy from infancy through adulthood. *J. Allergy Clin. Immunol. Pract.*, 2020. Vol. 8, no. 6, pp. 1854-1864.
18. Shakeeb N., Varkey P., Hynse A., Ajit A. Saliva as a potential specimen to monitor IL-6, TNF- α and IL-10 in COVID-19 Patients. *Inflammation*, 2022, Vol. 45, no. 6, pp. 2368-2374.
19. Skutnik-Radziszewska A., Maciejczyk M., Flisiak I., Kołodziej J.K.U., Kotowska-Rodziewicz A., Klimiuk A., Zalewska A. Enhanced inflammation and nitrosative stress in the saliva and plasma of patients with plaque psoriasis. *J. Clin. Med.*, 2020, Vol. 9, no. 3, 745. doi: 10.3390/jcm9030745.

20. Sroka-Tomaszewska J., Trzeciak M. Molecular mechanisms of atopic dermatitis pathogenesis. *Int. J. Mol. Sci.*, 2021, Vol. 22, no. 8, 4130. doi: 10.3390/ijms22084130.
21. Teixeira L.K., Fonseca B.P., Barboza B.A., Viola J.P. The role of interferon-gamma on immune and allergic responses. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 2005, Vol. 100, no. 1, pp. 137-144.
22. Tomar S., Ganesan V., Sharma A., Zeng C., Waggoner L., Smith A., Kim C.H., Licona-Limón P., Reinhardt R.L., Flavell R.A., Wang Y.H., Hogan S.P. IL-4-BATF signaling directly modulates IL-9 producing mucosal mast cell (MMC9) function in experimental food allergy. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2021, Vol. 147, no. 1, pp. 280-295.
23. Ünal E.S., Gül Ü., Dursun A.B., Öner Erkeköl F. Prediction of atopy via total immunoglobulin E levels and skin prick tests in patients with psoriasis. *Turk. J. Med. Sci.*, 2017, Vol. 47, no. 2, pp. 577-582.
24. Weryńska-Kalemba M., Filipowska-Grońska A., Kalemba M., Krajewska A., Grzanka A., Bożek A., Jarząb J. Analysis of selected allergic reactions among psoriatic patients. *Postepy Dermatol. Alergol.*, 2016, Vol. 33, no. 1, pp. 18-22.
25. Wu K., Bi Y., Sun K., Wang C. IL-10-producing type 1 regulatory T cells and allergy. *Cell. Mol. Immunol.*, 2007, Vol. 4, no. 4, pp. 269-275.
26. Yagami A., Ebisawa M. New findings, pathophysiology, and antigen analysis in pollen-food allergy syndrome. *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.*, 2019, Vol. 19, no. 3, pp. 218-223.
27. Yang L., Fu J., Zhou Y. Research Progress in Atopic March. *Front. Immunol.*, 2020, Vol. 11, 1907. doi: 10.3389/fimmu.2020.01907.

Авторы:

Барило А.А. — к.м.н., старший научный сотрудник лаборатории клинической патофизиологии, Научно-исследовательский институт медицинских проблем Севера — обособленное подразделение ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук», г. Красноярск, Россия

Смирнова С.В. — д.м.н., профессор, руководитель научного направления, Научно-исследовательский институт медицинских проблем Севера — обособленное подразделение ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук», г. Красноярск, Россия

Перетьяко О.В. — к.б.н., научный сотрудник клинического отделения патологии пищеварительной системы взрослых и детей, Научно-исследовательский институт медицинских проблем Севера — обособленное подразделение ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук», г. Красноярск, Россия

Authors:

Barilo A.A., PhD (Medicine), Senior Research Associate, Laboratory of Clinical Pathophysiology, Research Institute of Medical Problems of the North, Krasnoyarsk Research Center, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Krasnoyarsk, Russian Federation

Smirnova S.V., PhD, MD (Medicine), Professor, Head of the Scientific Direction, Research Institute of Medical Problems of the North, Krasnoyarsk Research Center, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Krasnoyarsk, Russian Federation

Peretyatko O.V., PhD (Biology), Research Associate, Clinical Department of Pathology of the Digestive System of Adults and Children, Research Institute of Medical Problems of the North, Krasnoyarsk Research Center, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Krasnoyarsk, Russian Federation

ОСОБЕННОСТИ ИММУННОГО СТАТУСА И КОМОРБИДНОЙ ПАТОЛОГИИ У ДЕТЕЙ С ГНЕЗДНОЙ АЛОПЕЦИЕЙ

Штина И.Е., Ошева Л.В., Ермакова О.В., Матьянина А.И.

ФБУН «Федеральный научный центр медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения», г. Пермь, Россия

Резюме. В настоящее время отмечен рост заболеваемости алопецией у детей. Вклад в патогенез развития данного заболевания аутоиммунных (иммунопатологических) механизмов обуславливает необходимость дополнительного изучения иммунного статуса и особенностей коморбидной патологии. Цель исследования – выявить особенности иммунного статуса и коморбидной патологии у детей с гнездной алопецией. В группу наблюдения включены дети с различными типами гнездной алопеции ($n = 57$), в группу сравнения – дети с отсутствием клинических проявлений алопеции и указанием на нее в анамнезе ($n = 157$). Проведена сравнительная оценка содержания субпопуляций лимфоцитов ($CD3^+$, $CD3^+CD4^+$, $CD3^+CD8^+$, $CD3^+CD19^+$), интерлейкинов (IL-4, IL-6), иммуноглобулинов (IgA, IgM, IgG), параметров фагоцитарной активности (абсолютный фагоцитоз, процент фагоцитоза, фагоцитарное число и фагоцитарный индекс) и IgE к домашней пыли и шерсти кошки. Выполнен анализ коморбидной патологии. Статистическая обработка осуществлена в приложении Jampov. Установлено, что среди клинических форм доля очаговой преобладала над субтотальной и тотальной формами в 1,8 раза ($p = 0,033$), в группе наблюдения относительно группы сравнения, чаще регистрировали обычный переменный иммунодефицит – в 1,4 раза, хронический тонзиллит – в 3,9 раза, аллергический ринит – в 3,9 раза и аутоиммунный тиреоидит, отсутствующий в группе сравнения. У детей с алопецией выявлены нарушения Т-клеточного звена в виде большего значения медианы относительного и абсолютного числа $CD3^+CD4^+$ лимфоцитов ($p = 0,001-0,003$), увеличение долей повышенных значений IgA – 4,1 раза, IgM – в 7,3 раза, IgG – в 13,2 раза ($p < 0,001$), IL-4 – в 8,1 раза и IL-6 – в 4,6 раза ($p = 0,002-0,004$) при наличии связей средней и относительно сильной силы с алопецией. У детей с алопецией определена в 3,3 раза большая доля сниженных значений абсолютного фагоцитоза и в 3,7 раза – сниженных значений процента фагоцитоза ($p = 0,001-0,028$) при установленной связи от слабой до средней силы с алопецией, а также более низкие значения медианы фагоцитарного индекса и фагоцитарного числа в группе наблюдения ($p < 0,001$) при установленной связи средней силы в структуре результатов. Проведенный корреляционный анализ между формой алопеции (очаговая, субтотальная, тотальная) и лабораторными показателями не выявил ни одной статистически значимой связи. Таким образом, у детей с алопецией установлен дисбаланс компонентов иммунной системы, проявляющийся, с одной стороны, признаками гиперфункции, характер-

Адрес для переписки:

Штина Ирина Евгеньевна
ФБУН «Федеральный научный центр медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения»
614045, Россия, г. Пермь, ул. Монастырская, 82.
Тел.: 8 (342) 237-25-34.
E-mail: shtina_irina@fcrisk.ru; peditria.fbun@yandex.ru

Address for correspondence:

Irina E. Shtina
Federal Research Center for Medical and Preventive Health Risk Management Technologies
82 Monastyrskaya St
Perm
614045 Russian Federation
Phone: +7 (342) 237-25-34.
E-mail: shtina_irina@fcrisk.ru; peditria.fbun@yandex.ru

Образец цитирования:

И.Е. Штина, Л.В. Ошева, О.В. Ермакова, А.И. Матьянина «Особенности иммунного статуса и коморбидной патологии у детей с гнездной алопецией» // Медицинская иммунология, 2024. Т. 26, № 1. С. 75–88.
doi: 10.15789/1563-0625-FOT-2631

© Штина И.Е. и соавт., 2024
Эта статья распространяется по лицензии Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

I.E. Shtina, L.V. Osheva, O.V. Ermakova, A.I. Matyanina “Features of the immune status and comorbidities in children with alopecia areata”, Medical Immunology (Russia)/ Meditsinskaya Immunologiya, 2024, Vol. 26, no. 1, pp. 75–88.
doi: 10.15789/1563-0625-FOT-2631

© Shtina I.E. et al., 2024
The article can be used under the Creative Commons Attribution 4.0 License

DOI: 10.15789/1563-0625-FOT-2631

ных в том числе для аутоиммунного и аллергического процессов, сопровождающихся более частой регистрацией аутоиммунного тиреоидита и аллергического ринита, с другой признаками иммунной недостаточности, характеризующимися снижением фагоцитарной активности и большей частотой обычного переменного иммунодефицита и хронического тонзиллита.

Ключевые слова: алопеция, дети, лимфоциты, интерлейкины, иммуноглобулины, фагоцитоз, коморбидная патология

FEATURES OF THE IMMUNE STATUS AND COMORBIDITIES IN CHILDREN WITH ALOPECIA AREATA

Shtina I.E., Osheva L.V., Ermakova O.V., Matyanina A.I.

Federal Research Center for Medical and Preventive Health Risk Management Technologies, Perm, Russian Federation

Abstract. Increased incidence of alopecia has been noted in children at the present time. Participation of autoimmune (immunopathological) mechanisms in pathogenesis of this disease necessitates additional study of immune status and characteristics of comorbid pathologies. The aim of our study was to specify the features of immune status and comorbidities in children with alopecia areata. The observation group consisted of children with various types of alopecia areata ($n = 57$), a comparison group included children without clinical manifestations of alopecia or a history of alopecia ($n = 157$). We performed a comparative evaluation of major lymphocyte subpopulations ($CD3^+$, $CD3^+CD4^+$, $CD3^+CD8^+$, $CD3^+CD19^+$), interleukins (IL-4, IL-6), immunoglobulins (IgA, IgM, IgG), parameters of phagocytic activity (absolute phagocytosis, percentage of phagocytosis, phagocytic number and phagocytic index) and IgE to house dust and cat hair. Analysis of comorbidities was also performed. Statistical processing was carried out with Jamovi software. We have found that the focal clinical form of alopecia prevailed over the subtotal and total forms by 1.8 times ($p = 0.033$) in the observation group rather than in comparison group, with common variable immunodeficiency being more often (1.4-fold), chronic tonsillitis (3.9-fold), allergic rhinitis (3.9-fold) and autoimmune thyroiditis, which was absent in the comparison group. Among the children with alopecia, disturbances of the T-cell link were revealed, i.e., a higher median levels of the relative and absolute numbers of $CD3^+CD4^+$ cells ($p = 0.001$ to 0.003), larger proportions of elevated values for IgA (4.1-fold), IgM (7.3-fold), IgG (13.2-fold) with p -levels of 0.0001 to 0.0008 ; increased IL-4 (8.1-fold) and IL-6 (4.6-fold), with $p = 0.002$ - 0.004 , along with medium and relatively strong correlations with alopecia. In children with alopecia, we have determined a 3.3-fold proportion of reduced values of absolute phagocytosis and 3.7-fold reduced percentage of phagocytosis ($p = 0.0012$ to 0.028), with a sufficient correlation (weak to moderate strength) with alopecia, as well as lower values of the median phagocytic index and phagocytic number in the observation group ($p < 0.001$) associated with a average-strength correlation. Hence, an imbalance of the immune system components was revealed in children with alopecia which manifested with signs of immune hyperfunction, characteristic, e.g., of autoimmune and allergic processes, accompanied by more frequent registration of autoimmune thyroiditis and allergic rhinitis. Moreover, distinct signs of immune deficiency, are found, characterized by a decrease in phagocytic activity and higher incidence of common variable immunodeficiency and chronic tonsillitis.

Keywords: alopecia, children, lymphocytes, interleukins, immunoglobulins, phagocytosis, comorbidity

Введение

Алопеция является междисциплинарной патологией, актуальной для врачей разных специальностей: терапевтов, педиатров, дерматологов, иммунологов. Распространенность алопеции по данным разных авторов составляет от 0,15%

до 3,83% с признаками стабильного прироста за последнее десятилетие [25, 26, 29, 32]. Среди детей-пациентов с алопецией 60% относятся к возрастной группе 11-16 лет, соотношение мальчиков и девочек составляет 1:1,4 [22]. Истинная распространенность заболевания может превы-

шать статистические показатели, так как многие случаи гнездной алопеции не распознаются пациентами как патология. Актуальность алопеции объясняется торпидностью течения, затяжным и рецидивирующим характером патологического процесса, отсутствием универсальных и быстроэффективных методов лечения. Патогенез алопеции до конца не изучен. Многие исследователи полагают, что это аутоиммунное заболевание, возникающее в результате утраты волосным фолликулом иммунной привилегии и характеризующееся образованием воспалительного клеточного инфильтрата вокруг волосных фолликулов, состоящего из CD8⁺ и CD4⁺ лимфоцитов, макрофагов и клеток Лангерганса [5, 6, 10, 12, 20, 23]. Аутоиммунный процесс, опосредованный CD4⁺ и CD8⁺ лимфоцитами, воздействует на трансформирующий фактор роста волосных фолликулов, что приводит к выпадению волос на коже головы, лица и других участках кожного покрова [2, 9, 10, 12]. В литературе встречаются данные об ассоциации очаговой алопеции с аутоиммунными заболеваниями, такими как ревматоидный артрит, целиакия, диабет 1-го типа, аутоиммунный тиреоидит, витилиго [3, 13, 27]. Установлено, что у пациентов с алопецией иммунные нарушения проявляются в дефектах Т-клеточного звена, что выражается в снижении CD3⁺ – общего популяционного маркера Т-лимфоцитов и CD8⁺ лимфоцитов, в то же время уровень субпопуляции Т-хелперов (CD4⁺) был значительно выше референтных значений [12, 13, 23]. В связи с преобладанием Т-хелперов на фоне снижения Т-супрессоров установлено достоверное повышение иммунорегуляторного индекса (соотношение CD4/CD8) в 1,5 раза, что свидетельствует о дисбалансе в иммунном ответе. Прогрессирование алопеции сопровождается девиацией цитокинового профиля по Th1-типу, а в стационарной стадии при хронизации заболевания происходит переключение иммунного ответа на Th2-тип, характерный для аутоиммунного и аллергического процессов [23, 28]. В гуморальном звене иммунитета при алопеции выявлено нарастание числа В-лимфоцитов (CD20⁺) и IgG при нормальном уровне иммуноглобулинов А и М, что характерно для хронизации процесса [19]. Развитие алопеции характеризуется высокой степенью активации клеточно-опосредованных реакций, сопровождающихся повышенной продукцией провоспалительных цитокинов, среди которых одну из центральных ролей играет интерлейкин-6 (IL-6) [3, 11, 13]. Установлено, что IL-6 функционирует как аутокринный, паракринный и гормоноподобный регулятор нормальных и патологических иммуновоспалительных процессов [15, 16].

Другие авторы указывают в своих исследованиях на тесную взаимосвязь алопеции и аллергических заболеваний, таких как аллергический ринит, бронхиальная астма и атопический дерматит [1, 2, 14]. Согласно литературным данным, частота встречаемости атопических заболеваний при алопеции достигает 40% [1, 21, 24]. Существуют взаимные, усиливающие влияния одного патологического процесса на другой в виде снижения супрессирующей активности Т-регуляторных клеток (Treg) и повышения воспалительной и аутоиммунной активности Th17-лимфоцитов [1, 13, 28]. Среди значимых цитокинов интерлейкин-4 (IL-4) является основным медиатором аллергической реакции путем индукции дифференцировки Т-хелперов 2-го типа и синтеза иммуноглобулина Е антител на причинно-значимые аллергены [14]. Кроме того, развивающаяся при аллергическом воспалении слизистой желудочно-кишечного тракта эндотоксинемия является важным фактором в развитии аутоиммунных воспалительных процессов в организме [1, 4]. Очаговую алопецию у пациентов с аллергией можно рассматривать как одно из нетипичных проявлений системного атопического процесса – «атопической алопеции» [2]. Несмотря на многообразие исследований, посвященных изучению этиопатогенеза алопеции у детей, многие механизмы формирования и прогрессирования заболевания, в том числе иммунные, требуют дальнейшего уточнения.

Цель исследования – выявить особенности иммунного статуса и коморбидной патологии у детей с гнездной алопецией.

Материалы и методы

Исследуемая популяция

В ходе исследования изучали две популяции:

- 1) дети с различными формами гнездной алопеции (n = 57);
- 2) дети с отсутствием клинических проявлений алопеции и указания на нее в анамнезе (n = 157).

Критерии включения в группу «случай»: на момент обследования дети мужского и женского пола в возрасте от 3 до 17 лет включительно, имеющие клинические проявления алопеции (<https://diseases.medelement.com/disease/алоpecia-гнездная-рекомендации-рф/15218>).

Критерии включения в группу «контроль»: на момент обследования дети мужского и женского пола в возрасте от 3 до 17 лет включительно с отсутствием клинических проявлений алопеции и указания на нее в анамнезе.

Критерии исключения: наличие признаков острого инфекционного заболевания, психических расстройств и расстройств поведения, иная

возрастная категория; отсутствие информированного согласия.

Способ формирования выборки из изучаемой популяции

Применен способ целенаправленного формирования групп исследования.

Дизайн исследования

Проведено одноцентровое экспериментальное одномоментное двухвыборочное сравнительное исследование.

Условия проведения и продолжительность исследования

Обследование детей проведено на базе ФБУН «Федеральный научный центр медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека с 2007 по 2019 гг.

Описание медицинского вмешательства

В ходе исследования выполнен сравнительный анализ результатов клинического, лабораторного исследований.

Проведена сравнительная оценка результатов клинического и лабораторного исследования. Лабораторное исследование крови, выполненное натощак в утренние часы, включало анализ субпопуляций лимфоцитов ($CD3^+$, $CD3^+CD4^+$, $CD3^+CD8^+$, $CD3^+CD19^+$, (относительное (%)) и абсолютное содержание ($10^9/л$)), проведенный методом проточной цитометрии на приборе FACSCalibur (Becton Dickinson, США) с использованием соответствующих моноклональных антител с помощью универсальной программы CellQuestPro. Интерлейкины (IL-4, IL-6, пг/мл) определяли методом иммуноферментного анализа (АО «Вектор-Бест», г. Новосибирск) на анализаторе Elx808IU (Biotek instruments Inc., США). Диагностика состояния IgE-зависимой сенсибилизации осуществлена путем определения аллерген-специфических IgE к домашней пыли и шерсти кошки в сыворотке крови методом твердофазного иммуноферментного анализа с использованием набора реагентов «Спец-IgE-ИФА» (ООО «ХЕМА», Россия, Ридер ELx808, BioTek Instruments, США). Содержание иммуноглобулинов (IgA, IgM, IgG ($г/дм^3$)) в сыворотке крови изучали с помощью радиальной иммунной диффузии Манчини с применением сывороток диагностических моноспецифических против IgA (Н), IgM (Н), IgG (Н) против человека (АО «НПО» «Микроген», Россия). Определение показателей параметров фагоцитарной активности (абсолютный фагоцитоз ($10^9/л$), процент фагоцитоза (%), фагоцитарное число (у. е.) и фагоцитарный индекс (у. е.)) проводили с использованием в качестве объектов фагоцитоза форм-

малинизированные эритроциты барана методом проточной цитофлуометрии [7, 8, 18].

Этическая экспертиза

Медико-биологические исследования одобрены локальным этическим комитетом при ФБУН «Федеральный научный центр медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения» (выписка из протокола № 6 от 01.12.2006 г.). Исследования проведены с соблюдением этических принципов Хельсинкской декларации (1975 г. с доп. 1983 г.) и Национального стандарта РФ ГОСТ-Р 52379-2005 «Надлежащая клиническая практика» (ICH E6 GCP) при наличии письменного информированного добровольного согласия от законных представителей пациентов.

Статистический анализ

Статистический и математический анализ выполнен с применением пакета функций статистического приложения Jamovi 1.6.23.0. Статистическая значимость различий в половой структуре в группах и в структуре различных форм алопеции (частота очаговой алопеции против субтотальной и тотальной вместе взятых) у детей группы наблюдения рассчитана биномиальным тестом. Проверку параметров на нормальность распределения осуществляли на основе теста Шапиро–Уилка. Абсолютные и относительные значения количественных показателей (возраст, параметры лабораторной диагностики) представлены в виде медианы (Me), значений $Q_{0,25}$ и $Q_{0,75}$ перцентилей. Статистическая значимость различий в значениях переменных между группами определена критерием Манна–Уитни. Для сравнения частоты заболеваемости в изучаемых группах использован метод хи-квадрата Пирсона (χ^2). Сила связей между переменными определена по значению коэффициента V Крамера, рассчитанного для выявления силы связи между переменными, выраженными номинальными шкалами с размерностью таблицы сопряженности большей, чем 2×2 с интерпретацией значения коэффициента согласно рекомендациям Rea & Parker и коэффициентом ранговой корреляции Спирмена (r), рассчитанного для количественной оценки связи между парными показателями с интерпретацией значения коэффициента по шкале Чеддока. Статистически значимыми считали различия при уровне $p \leq 0,05$.

Результаты

В ходе исследования были ретроспективно проанализированы результаты клинического и иммунологического исследований 214 детей от 3 до 17 лет, обследованных в Центре с 2007 г. по 2019 г. В группу наблюдения включены 57 детей с диагнозом «алопеция», доля которых составила

26,6% от общего числа обследованных. В группу сравнения – 157 детей (73,4%). Группы были сопоставимы по возрастному составу ($p = 0,369$) и половой структуре ($p = 0,289$) (табл. 1).

Установлено отсутствие статистической значимости между долей мальчиков и девочек в группе наблюдения ($p = 0,289$).

При анализе структуры форм гнездовой алопеции в группе наблюдения установлено, что очаговую алопецию регистрировали у 37 человек (64,9%), субтотальную – у 16 (28,1%), тотальную – у 4 (7%). Частоту очаговой алопеции регистрировали статистически значимо чаще относительно суммарного значения субтотальной и тотальной форм (64,9% против 35,1%; $p = 0,033$) при отсутствии связи с полом ($p = 0,817$).

Структура сопутствующей патологии представлена в таблице 2. Анализ сопутствующей патологии, компрометирующей иммунный статус у обследованных показал, что в группе наблюдения относительно группы сравнения обычный переменный иммунодефицит регистрировали в 1,4 раза чаще ($p = 0,039$), хронический тонзиллит – в 3,9 раза чаще ($p = 0,002$), аллергический ринит – в 1,9 раза ($p = 0,0001$). Частота регистрации атопического дерматита и бронхиальной астмы среди обследованных не имела достоверных различий между группами ($p = 0,228$). Аутоиммунная патология, представленная аутоиммунным тиреоидитом, выявлена только у детей с алопецией ($p = 0,001$). В группе наблюдения также регистрировались единичные случаи целиакии и витилиго, не отмеченные в группе сравнения ($p = 0,3$).

Анализ лабораторного исследования представлен таблице 3. Оценка показателей гуморального звена иммунитета выявила в 13,2 раза большую долю детей с высокими значениями им-

муноглобулина G в группе наблюдения ($p < 0,001$) при наличии относительно сильной связи с фактором алопеции в структуре результатов (Cramer's V = 0,45), в 7,3 раза – с высокими значениями иммуноглобулина M ($p < 0,001$) при связи с фактором средней силы (Cramer's V = 0,26), в 4,1 раза – с высокими значениями иммуноглобулина A ($p < 0,001$) при связи с фактором средней силы (Cramer's V = 0,36).

Оценка фагоцитарной активности показала противоположную направленность изменений. В группе наблюдения значения медианы фагоцитарного индекса и фагоцитарного числа были статистически значимо ниже, чем в группе сравнения ($p < 0,001$), в структуре изменений установлена связь фагоцитарного индекса с фактором алопеции средней силы (Cramer's V = 0,3). В группе наблюдения выявлена в 3,3 раза большая доля сниженных значений абсолютного фагоцитоза ($p = 0,001$) и в 3,7 раза – сниженных значений процента фагоцитоза ($p = 0,028$), при наличии связи с фактором алопеции от слабой до средней силы в структуре результатов (Cramer's V = 0,18-0,25).

Медиана относительного и абсолютного числа CD3⁺CD4⁺ лимфоцитов (Т-хелперы) была статистически выше в группе наблюдения, чем в группе сравнения ($p \leq 0,001-0,003$, $r = 0,63-0,83$), без достоверной разницы по структуре. Оценка уровня CD3⁺CD8⁺ лимфоцитов (Т-цитотоксические) показала отсутствие межгрупповых различий медиан и различий по структуре. Медианы значений CD19⁺ лимфоцитов относительных и абсолютных не имели достоверных межгрупповых различий (табл. 2), при этом доля пациентов с алопецией, имеющих повышенные значения CD19⁺ лимфоцитов относительных в 4 раза превышала таковую в группе сравнения (5,3% и 1,3%,

ТАБЛИЦА 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ГРУПП ИССЛЕДОВАНИЯ, %

TABLE 1. CHARACTERISTICS OF STUDY GROUPS, %

Показатель Parameter	Группа наблюдения Observation group (n = 57)	Группа сравнения Comparison group (n = 157)	p
Возраст, Ме (Q_{0,25}-Q_{0,75}) Age, Me (Q _{0,25} -Q _{0,75})			
Возраст, лет Age, years	9,0 (5-12)	7,0 (6-10)	0,369
Половая структура, n (%) Sex structure, n (%)			
Мальчики Boys	24 (42,1)	88 (56,1)	0,289
Девочки Girls	33 (57,9)	69 (43,9)	0,289

ТАБЛИЦА 2. ЗАБОЛЕВАЕМОСТЬ ДЕТЕЙ ИССЛЕДУЕМЫХ ГРУПП, %

TABLE 2. MORBIDITY IN CHILDREN OF THE STUDY GROUPS, %

Класс болезней Disease class	Нозологическая форма Nosology	Группа наблюдения Observation group, %	Группа сравнения Comparison group, %	p
Болезни крови, кроветворных органов и отдельные нарушения, вовлекающие иммунный механизм Diseases of the blood and blood-forming organs and certain disorders involving the immune mechanism (D50-D89)	Обычный переменный иммунодефицит Common variable immunodeficiency with predominant abnormalities of B-cell numbers and function (D83.0)	52,63	36,94	0,039
Болезни органов дыхания Diseases of the respiratory system (J00-J99)	Болезни органов дыхания Diseases of the respiratory system (J00-J99)	84,21	96,17	0,003
	Аллергический ринит Vasomotor and allergic rhinitis (J30)	63,16	33,75	< 0,001
	Хронические болезни миндалин и аденоидов Chronic diseases of tonsils and adenoids (J35)	0	14,01	0,003
	Гипертрофия миндалин Hypertrophy of tonsils (J35.1)	15,78	36,94	0,003
	Гипертрофия аденоидов Hypertrophy of adenoids (J35.2)	21,05	25,47	0,507
	Хронический тонзиллит Chronic tonsillitis (J35.0)	17,54	4,45	0,002
	Бронхиальная астма Asthma (J45)	0	2,54	0,228
Болезни органов пищеварения Diseases of the digestive system (K00-K93)	Целиакия Intestinal malabsorption (K90.0)	3,5	0	0,116
Болезни кожи и подкожной клетчатки Diseases of the skin and subcutaneous tissue (L00-L99)	Болезни кожи и подкожной клетчатки Diseases of the skin and subcutaneous tissue (L00-L99)	100	46,29	< 0,001
	Атопический дерматит Atopic dermatitis (L20)	36,84	46,29	0,22
	Витилиго Vitiligo (L80)	3,5	0	0,116
Болезни эндокринной системы, расстройства питания и нарушения обмена веществ Endocrine, nutritional and metabolic diseases (E00-E90)	Аутоиммунный тиреоидит Autoimmune thyroiditis (E06.3)	7,01	0	0,001

ТАБЛИЦА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ЛАБОРАТОРНОГО ИССЛЕДОВАНИЯ ДЕТЕЙ ИССЛЕДУЕМЫХ ГРУПП

TABLE 3. RESULTS OF A LABORATORY STUDY OF CHILDREN IN THE STUDY GROUPS

Показатель Parameter	Группа наблюдения Observation group				Группа сравнения Comparison group				p*	p**
	Me (Q _{0,25} -Q _{0,75}) Me (Q _{0,25} -Q _{0,75})	Структура результатов, % Results structure, %			Me (Q _{0,25} -Q _{0,75}) Me (Q _{0,25} -Q _{0,75})	Структура результатов, % Results structure, %				
		Выше нормы Above normal	Норма Norm	Ниже нормы Below normal		Выше нормы Above normal	Норма Norm	Ниже нормы Below normal		
IgE к домашней пыли, у. е. IgE to house dust, с. у.	0,4 (0,2-0,7)	95,6	4,4	0	0,1 (0,1-0,2)	75	25	0	< 0,001	0,019
IgE к шерсти кошки, у. е. IgE to cat hair, с. у.	0,3 (0,2-0,6)	90,7	9,3	0	0,0 (0,0-0,1)	33,3	66,7	0	< 0,001	< 0,001
CD19 ⁺ лимфоциты, 10 ⁹ /л CD19 ⁺ lymphocytes, 10 ⁹ /L	0,36 (0,28-0,48)	8,8	91,2	0	0,35 (0,25-0,43)	4,5	93,6	1,9	0,105	0,287
CD19 ⁺ лимфоциты, % CD19 ⁺ lymphocytes, %	13 (12-16)	5,3	94,7	0	13 (10-15)	1,3	95,5	3,2	0,190	0,097
CD3 ⁺ лимфоциты, 10 ⁹ /л CD3 ⁺ lymphocytes, 10 ⁹ /L	1,83 (1,56-2,20)	14	86	0	1,76 (1,46-2,09)	7	91,7	1,3	0,251	0,201
CD3 ⁺ лимфоциты, % CD3 ⁺ lymphocytes, %	69 (66-73)	0	98,2	1,8	67 (63-72)	1,3	94,3	4,5	0,058	0,447
CD3 ⁺ CD4 ⁺ лимфоциты, 10 ⁹ /л CD3 ⁺ CD4 ⁺ lymphocytes, 10 ⁹ /L	1,01 (0,83-1,24)	10,5	87,7	1,8	0,88 (0,73-1,05)	3,8	93,6	2,5	0,003	0,164
CD3 ⁺ CD4 ⁺ лимфоциты, % CD3 ⁺ CD4 ⁺ lymphocytes, %	39 (34-42)	0	86	14	34 (30-38)	0	70,7	29,3	< 0,001	0,076
CD3 ⁺ CD8 ⁺ лимфоциты, 10 ⁹ /л CD3 ⁺ CD8 ⁺ lymphocytes, 10 ⁹ /L	0,65 (0,54-0,91)	5,3	93	1,8	0,71 (0,550-0,893)	5,1	94,9	0	0,567	0,25

Таблица 3 (окончание)
Table 3 (continued)

Показатель Parameter	Группа наблюдения Observation group				Группа сравнения Comparison group				p*	p**
	Me (Q _{0,25} -Q _{0,75}) Me (Q _{0,25} -Q _{0,75})	Структура результатов, % Results structure, %			Me (Q _{0,25} -Q _{0,75}) Me (Q _{0,25} -Q _{0,75})	Структура результатов, % Results structure, %				
		Выше нормы Above normal	Норма Norm	Ниже нормы Below normal		Выше нормы Above normal	Норма Norm	Ниже нормы Below normal		
CD3 ⁺ CD8 ⁺ лимфоциты, % CD3 ⁺ CD8 ⁺ lymphocytes, %	25 (20- 29)	0	98,2	1,8	26 (22- 31)	5,7	93,6	0,6	0,134	0,141
IgG, г/дм ³ IgG, g/dm ³	10,6 (9,3- 11,9)	33,3	22,8	43,9	10,7 (8,8- 12,3)	2,5	43,3	54,1	0,775	< 0,001
IgM, г/дм ³ IgM, g/dm ³	1,3 (1,2- 1,4)	14	33,3	52,6	1,3 (1,1- 1,5)	1,9	49	49	0,256	< 0,001
IgA, г/дм ³ IgA, g/dm ³	1,4 (1,1- 1,7)	42,1	33,3	24,6	1,3 (1,1- 1,9)	10,2	57,3	32,5	0,752	< 0,001
Абсолютный фагоцитоз, 10 ⁹ / дм ³ Absolute phagocytosis, 10 ⁹ /dm ³	1,72 (1,30- 2,29)	14	75,4	10,5	1,95 (1,54- 2,41)	37,6	59,2	3,2	0,088	0,001
Процент фагоцитоза, % Percentage of phagocytosis, %	51 (37- 59)	15,8	70,2	14	51 (44- 58)	16,6	79,6	3,8	0,293	0,028
Фагоцитарное число, у. е. Phagocytic number, c. u.	0,89 (0,62- 1,11)	19,3	40,4	40,4	1,00 (0,79- 1,20)	23,6	50,3	26,1	0,009	0,132
Фагоцитарный индекс, у. е. Phagocytic index, c. u.	1,75 (1,58- 1,96)	17,5	68,4	14	1,96 (1,79- 2,18)	41,4	56,7	1,9	< 0,001	< 0,001
IL-4, пг/мл IL-4, pg/mL	0,81 (0,21- 1,53)	10,5	89,5	0	0,88 (0,48- 1,97)	1,3	98,7	0	0,076	0,002
IL-6, пг/мл IL-6, pg/mL	2,75 (0,01- 4,47)	14	86	0	0,81 (0,54- 1,75)	3	97	0	< 0,001	0,004

Примечание. p* – значимость различий между значениями медиан, p** – значимость различий в структуре результатов.
Note. p*, significance of differences between median values; p**, significance of differences in the structure of results.

p = 0,097). Исследование цитокинового профиля позволило выявить статистически значимо большую долю детей с высоким значением IL-4 и IL-6 (p = 0,002-0,004) в группе наблюдения и наличие связи с фактором средней силы в структуре результатов (Cramer's V = 0,21).

Диагностика состояния IgE-зависимой сенсибилизации показала, что медиана IgE к домашней пыли в группе наблюдения была выше в 4 раза, чем в группе сравнения (0,4 у. е. против 0,1 у. е., p = 0,0001), при наличии статистически значимых различий по структуре (доли повы-

ТАБЛИЦА 4. КОРРЕЛЯЦИОННЫЙ АНАЛИЗ ФОРМЫ АЛОПЕЦИИ С ЛАБОРАТОРНЫМИ ПОКАЗАТЕЛЯМИ У ОБСЛЕДОВАННЫХ ДЕТЕЙ

TABLE 4. CORRELATION ANALYSIS OF THE FORM OF ALOPECIA WITH LABORATORY PARAMETERS IN THE EXAMINED CHILDREN

Показатель Parameter	Коэффициент Спирмена Spearman's correlation coefficient	p
IgE к домашней пыли, у. е. IgE to house dust, c. u.	0,16	0,307
IgE к шерсти кошки, у. е. IgE to cat hair, c. u.	0,21	0,175
CD19 ⁺ лимфоциты, 10 ⁹ /л CD19 ⁺ lymphocytes, 10 ⁹ /L	0,04	0,790
CD19 ⁺ лимфоциты, % CD19 ⁺ lymphocytes, %	0,03	0,825
CD3 ⁺ лимфоциты, 10 ⁹ /л CD3 ⁺ lymphocytes, 10 ⁹ /L	0,02	0,877
CD3 ⁺ лимфоциты, % CD3 ⁺ lymphocytes, %	0,16	0,238
CD3 ⁺ CD4 ⁺ лимфоциты, 10 ⁹ /л CD3 ⁺ CD4 ⁺ lymphocytes, 10 ⁹ /L	0,07	0,627
CD3 ⁺ CD4 ⁺ лимфоциты, % CD3 ⁺ CD4 ⁺ lymphocytes, %	0,03	0,826
CD3 ⁺ CD8 ⁺ лимфоциты, 10 ⁹ /л CD3 ⁺ CD8 ⁺ lymphocytes, 10 ⁹ /L	0,08	0,545
CD3 ⁺ CD8 ⁺ лимфоциты, % CD3 ⁺ CD8 ⁺ lymphocytes, %	0,08	0,569
IgG, г/дм ³ IgG, g/dm ³	0,02	0,911
IgM, г/дм ³ IgM, g/dm ³	0,11	0,414
IgA, г/дм ³ IgA, g/dm ³	0,19	0,154
Абсолютный фагоцитоз, 10 ⁹ /дм ³ Absolute phagocytosis, 10 ⁹ /dm ³	0,02	0,889
Процент фагоцитоза, % Percentage of phagocytosis, %	0,13	0,320
Фагоцитарное число, у. е. Phagocytic number, c. u.	0,17	0,217
Фагоцитарный индекс, у. е. Phagocytic index, c. u.	0,13	0,331
IL-4, пг/мл IL-4, pg/mL	0,21	0,384
IL-6, пг/мл IL-6, pg/mL	0,01	0,979

шенных значений 95,6% и 75% соответственно, $p = 0,019$) и связи с фактором алопеции средней силы (Cramer's $V = 0,28$). У детей с алопецией выявлена специфическая сенсibilизация (IgE) к шерсти кошки, при отсутствии таковой в группе сравнения (0,3 у. е. и 0,0 у. е., $p < 0,001$) при наличии достоверных различий по структуре

($p < 0,001$) и сильной связи с фактором алопеции (Cramer's $V = 0,6$).

Проведенный корреляционный анализ между формой алопеции (очаговая, субтотальная, тотальная) и лабораторными показателями не выявил ни одной статистически значимой связи (табл. 4).

Обсуждение

Целью настоящего исследования было изучить особенности иммунного статуса и коморбидной патологии и у детей с гнездовой алопецией.

Актуальность проблемы связана с неопределенным спектром диагностических методов [2, 3, 9]. Несмотря на полученные в последние годы научные данные о причастности к этому процессу иммунных механизмов, патофизиология заболевания изучена недостаточно [12, 13, 20].

В результате проведенного анализа определена одинаковая частота встречаемости алопеции у лиц обоих полов, что согласуется с результатами ранее проведенных исследований [22]. При этом установлено статистически значимое превалирование очаговой формы, что соответствует эпидемиологическим показателям [29, 34].

По данным научной литературы, аутоиммунный характер алопеции подразумевает возможное наличие у этой группы пациентов других иммуноопосредованных заболеваний, таких как иммунодефицитные состояния, аллергическая (атопический дерматит, аллергический ринит, бронхиальная астма и др.) и аутоиммунная (витилиго, псориаз, аутоиммунный тиреоидит, целиакия и др.) патология [1, 2, 26, 30, 33], что подтверждается данными собственных исследований, а именно статистически значимо чаще диагностированных аллергического ринита, варибельного иммунодефицита, аутоиммунного тиреоидита, и выявленных только у детей с алопецией витилиго и целиакии в рамках данного исследования. Статистически значимая более частая регистрация у пациентов с алопецией перечисленных заболеваний указывает на общность их патогенеза, подтверждается существованием так называемого аутоиммунного полигландулярного синдрома, характеризующегося сочетанием аутоиммунного поражения эндокринных желез с различными органоспецифическими неэндокринными заболеваниями аутоиммунного генеза, в том числе с алопецией, или обсуждение наличия так называемой атопической алопеции [2, 17].

Установленный более высокий уровень сенсibilизации к домашней пыли и шерсти кошки и связь с фактором алопеции подтверждают ранее проведенные исследования. Полученные результаты могут служить объяснением положительного эффекта от антигистаминных препаратов и элиминационной диеты на рост волос [2, 31]. Предполагается, что взаимодействие атопического процесса и развития алопеции осуществляется посредством взаимодействия тучных клеток с Т-лимфоцитами с участием интерлейкинов [23], что подтверждается статистически зна-

чимо большей долей детей с высоким значением IL-4 и IL-6 ($p = 0,002-0,004$) и наличием связи с фактором алопеции средней силы в структуре результатов у детей группы наблюдения. Кроме того, под действием IL-4 происходит переключение В-лимфоцитов на синтез IgE, играющего одну из ведущих ролей в патогенезе аллергических заболеваний [16].

Результаты проведенных ранее исследований клеточного звена иммунитета при алопеции, представленные в литературе, достаточно противоречивы [5, 6, 12, 13]. Нами выявлен более высокий уровень медианы относительного и абсолютного числа CD3⁺CD4⁺ лимфоцитов (Т-хелперы) у детей с алопецией и отсутствие статистически значимых межгрупповых различий уровней CD3⁺CD8⁺ лимфоцитов. Увеличение абсолютного и относительного количества Т-хелперов, наблюдаемое при аутоиммунной патологии, аллергических реакциях и некоторых инфекционных заболеваниях, свидетельствует о стимуляции иммунной системы на антиген и служит подтверждением гиперреактивных синдромов, в том числе такого, как алопеция [12, 19, 20, 23].

В литературе подчеркивается важная роль дисбаланса провоспалительных и регуляторных цитокинов в возникновении и прогрессировании алопеции [3, 13, 19, 25, 34], что подтверждают полученные нами результаты, демонстрирующие статистически значимо большую долю детей с высоким значением IL-6 ($p = 0,004$) и наличием связи с фактором алопеции средней силы в структуре результатов. К иммуновоспалительным эффектам IL-6 относят участие в регуляции дифференцировки иммунных клеток, переключении с врожденного на приобретенный иммунный ответ и синтез антител В-клетками [11, 15, 16], подтверждаемый выявленной тенденцией к большей долей с повышенными уровнями CD19⁺ лимфоцитов (В-лимфоциты) и статистически значимо большей долей с гипериммуноглобулинемией IgA, IgM и IgG ($p < 0,001$) среди детей группы наблюдения и наличием связи с фактором алопеции от средней до относительно сильной.

Ряд авторов указывают на наличие у пациентов с алопецией признаков иммунодефицита, затрагивающее чаще клеточное звено иммунитета [12]. У детей группы наблюдения нами установлены признаки иммунной недостаточности, характеризующейся статистически значимо большей долей детей со сниженными значениями фагоцитарного индекса ($< 0,001$), абсолютного фагоцитоза ($p = 0,001$) и процента фагоцитоза ($p = 0,028$) с установленной связью с фактором алопеции от слабой до средней силы (Cramer's V = 0,18-0,3), которые могли проявляться клиникой обычного варибельного им-

мунодефицита, чаще регистрирующегося среди детей, страдающих алопецией.

Выявленное отсутствие статистически значимых связей лабораторных показателей с формой алопеции не позволило определить лабораторные предикторы форм гнездной алопеции.

Заключение

Среди детей, страдающих алопецией, доля девочек и мальчиков были близки по значению. Установлено статистически значимое преобладание очаговой формы над субтотальной и тотальной. У детей с алопецией, относительно условно здоровых детей, в виде коморбидной патологии чаще регистрировали обычный переменный иммунодефицит, хронический тонзиллит, аллергический ринит и аутоиммунный тиреоидит. У детей с алопецией выявлены признаки гиперфункции иммунной системы, характеризующейся повышенным уровнем CD3⁺CD4⁺ лимфоцитов (Т-хелперы), иммуноглобулинов классов А, М, G и IL-4, IL-6 с установленной связью с ало-

пецией от средней силы до относительно сильной. Выявленные проявления иммунодефицита, характеризовались снижением показателей фагоцитарной активности с установленной связью с алопецией от слабой до средней силы. Оценка уровней IgE-специфических показала высокий уровень сенсибилизации к домашней пыли и шерсти кошки при наличии связи с фактором алопеции от средней силы до сильной. Проведенный корреляционный анализ между формой алопеции (очаговая, субтотальная, тотальная) и лабораторными показателями не выявил ни одной статистически значимой связи. Таким образом, у детей, страдающих алопецией, установлен дисбаланс компонентов иммунной системы, проявляющийся как признаками гиперфункции, характерных, в том числе для аутоиммунного и аллергического процессов, так и признаками иммунной недостаточности.

Ограничения исследования обусловлены изучением случаев заболеваемости алопецией по обращаемости.

Список литературы / References

1. Барило А.А., Смирнова С.В. Роль аллергии в развитии очаговой алопеции // Медицинская иммунология, 2022, Т. 24, № 4. С. 799-806. [Barilo A.A., Smirnova S.V. Role of allergy in the development of alopecia areata. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2022, Vol. 24, no. 4, pp. 799-806. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-ROA-2491.
2. Барило А.А., Смирнова С.В., Олянина И.М. Клинический случай очаговой алопеции у ребенка с атопией // Медицинская иммунология, 2021. Т. 23, № 1. С. 191-196. [Barilo A.A., Smirnova S.V., Olyanina I.M. A clinical case of alopecia areata in a child with atopy. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2021, Vol. 23, no. 1, pp. 191-196. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-CCO-2074.
3. Беречикидзе Т.Т., Ломоносов К.М. Цитокины в патогенезе гнездной алопеции // Российский журнал кожных и венерических болезней, 2012. Т. 15, № 3. С. 41-44. [Berechikidze T.T., Lomonosov K.M. Contribution of cytokines to the pathogenesis of alopecia areata. *Rossiyskiy zhurnal kozhnykh i venericheskikh bolezney = Russian Journal of Skin and Venereal Diseases*, 2012, Vol. 15, no. 3, pp. 41-44. (In Russ.)]
4. Вишнёва Е.А., Намазова-Баранова Л.С., Макарова С.Г., Алексеева А.А., Эфендиева К.Е., Левина Ю.Г., Селимзянова Л.Р., Вознесенская Н.И., Томилова А.Ю., Волков К.С., Сновская М.А. Пищевая аллергия к белкам пшеницы. Трудности диагностики и лечения // Педиатрическая фармакология, 2015. Т. 4. С. 429-434. [Vishneva E.A., Namazova-Baranova L.S., Makarova S.G., Alekseeva A.A., Efendieva K.E., Levina Yu.G., Selimzyanova L.R., Voznesenskaya N.I., Tomilova A.Yu., Volkov K.S., Snovskaya M.A. Food allergy to wheat proteins. Difficulties in diagnosis and treatment. *Pediatricheskaya farmakologiya = Pediatric Pharmacology*, 2015, Vol. 4, pp. 429-434. (In Russ.)]
5. Гаджигороева А.Г., Коган Е.А., Потехаев Н.Н., Терещенко Г.П., Демура Т.А. Соотношение процессов апоптоза, пролиферации, неоангиогенеза и клеточной дифференцировки при иммунном воспалении в очагах гнездной алопеции // Клиническая дерматология и венерология, 2010. Т. 8, № 2. С. 25-34. [Gadzhigorieva A.G., Kogan E.A., Potekhaev N.N., Tereshchenko G.P., Demura T.A. Relative significance of apoptotic and proliferative processes, neoangiogenesis, and cellular differentiation for immune inflammation at sites affected by circumscribed alopecia. *Klinicheskaya dermatologiya i venerologiya = Clinical Dermatology and Venereology*, 2010, Vol. 8, no. 2, pp. 25-34. (In Russ.)]
6. Касымов О.И., Ахмедов А.А., Касымов А.О., Рахимова Т.П. К вопросу патогенеза гнездной алопеции // Вестник последипломного образования в сфере здравоохранения, 2015. № 1. С. 32-36. [Kasymov O.I., Akhmedov A.A., Kasymov A.O., Rakhimova T.P. On the pathogenesis of alopecia areata. *Vestnik poslediplomnogo obrazovaniya v sfere zdravookhraneniya = Bulletin of Postgraduate Education in Healthcare*, 2015, no. 1, pp. 32-36. (In Russ.)]

7. Клиническая лабораторная диагностика: национальное руководство: в 2 т. Т. II / Под ред. В.В. Долгова, В.В. Меньшикова. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2012. 808 с. [Clinical laboratory diagnostics: national guide: in 2 volumes. Eds. V.V. Dolgov, V.V. Menshikov]. Moscow: GEOTAR-Media, 2012, Vol. 2, 808 p.
8. Клиническое руководство по лабораторным тестам / Под ред. проф. Норберта У. Тица // Перевод с англ. под ред. В.В. Меньшикова. М.: ЮНИМЕД-пресс, 2003. 960 с. [Encyclopedia of clinical laboratory tests. Ed. prof. N.W. Tits. (transl., ed. by V.V. Menshikov)]. Moscow: UNIMED-press, 2003. 960 p.
9. Кондрахина И.Н., Мареева А.Н. Неинвазивная диагностика нерубцовых alopecий методом трихоскопии // Вестник дерматологии и венерологии, 2014. Т. 90, № 5. С. 81-85. [Kondrakhina I.N., Mareeva A.N. Non-invasive diagnosis of non-scarring alopecia by trichoscopy. *Vestnik dermatologii i venerologii = Bulletin of Dermatology and Venereology*, 2014, Vol. 90, no. 5, pp. 81-85. (In Russ.)]
10. Мареева А.Н., Кондрахин И.Н. Психоэмоциональные состояния у больных нерубцующими alopeciaми (гнездной, андрогенетической) // Вестник дерматологии и венерологии, 2015. № 6. С. 50-56. [Mareeva A.N., Kondrakhin I.N. Psycho-emotional states in patients with non-scarring alopecia (nested, androgenetic). *Vestnik dermatologii i venerologii = Bulletin of Dermatology and Venereology*, 2015, no. 6, pp. 50-56. (In Russ.)]
11. Мазуров В.И., Беляева И.Б., Самигуллина Р.Р., Чудинов А.Л., Дадалова А.М. Участие интерлейкина 6 в формировании патогенетических механизмов иммуновоспалительных заболеваний // Эффективная фармакотерапия, 2022. Т. 18, № 8. С. 22-30. [Mazurov V.I., Belyaeva I.B., Samigullina R.R., Chudinov A.L., Dadalova A.M. Participation of interleukin 6 in the formation of pathogenetic mechanisms of immunoinflammatory diseases. *Effektivnaya farmakoterapiya = Effective Pharmacotherapy*, 2022, Vol. 18, no. 8, pp. 22-30. (In Russ.)]
12. Николаева Т.В., Смолягин А.И., Воронина Л.Г., Сетко Н.П. Особенности системного иммунитета пациентов с прогрессирующей стадией гнездной alopecии // Проблемы современной науки и образования, 2016. № 234 (76). С. 105-109. [Nikolaeva T.V., Smolyagin A.I., Voronina L.G., Setko N.P. Features of systemic immunity in patients with a progressive stage of alopecia areata. *Problemy sovremennoy nauki i obrazovaniya = Problems of Modern Science and Education*, 2016, no. 234 (76), pp. 105-109. (In Russ.)]
13. Николаева Т.В. Патогенетические механизмы гнездной alopecии по данным биоинформационного анализа // Современные проблемы науки и образования, 2017. № 1. [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://science-education.ru/ru/article/view?id=26060>. [Nikolaeva T.V. Patogenetic mechanisms of alopecia aloptia according to bioinformation analysis data. *Sovremennye problemy nauki i obrazovaniya = Modern Problems of Science and Education*, 2017, no. 1. [Electronic resource]. Access mode: <https://science-education.ru/ru/article/view?id=26060>. (In Russ.)]
14. Петрова С.Ю., Альбанова В.И. Гнездная alopecия у больных atopическим дерматитом: совпадение или закономерность? // Медицинское обозрение, 2022. Т. 6, № 2. С. 85-91. [Petrova S.Yu., Albanova V.I. Alopecia areata in patients with atopical dermatitis: coincidence or regularity? *Meditsinskoe obozrenie = Medical Review*, 2022, Vol. 6, no. 2, pp. 85-91. (In Russ.)]
15. Потапнев М.П. Апоптоз клеток иммунной системы и его регуляция цитокинами // Иммунология, 2002. № 4. С. 237-243. [Potapnev M.P. Apoptosis of cells of the immune system and its regulation by cytokine. *Immunologiya = Immunology*, 2002, no. 4, pp. 237-243. (In Russ.)]
16. Трушина Е.Ю., Костина Е.М., Баранова Н.И., Типикин В.А. Роль цитокинов как молекулярных маркеров воспаления при неаллергической бронхиальной астме // Современные проблемы науки и образования, 2018. № 4. [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://science-education.ru/ru/article/view?id=27799>. [Trushina E.Yu., Kostina E.M., Baranova N.I., Tipikin V.A. The role of cytokines as molecular markers of inflammation in non-allergic bronchial asthma. *Sovremennye problemy nauki i obrazovaniya = Modern Problems of Science and Education*, 2018, no. 4. [Electronic resource]. Access mode: <https://science-education.ru/ru/article/view?id=27799>. (In Russ.)]
17. Фадеев В.В., Шевченко И.В., Мельниченко Г.А. Аутоиммунные полиглангулярные синдромы // Проблемы эндокринологии, 1999. Т. 45, № 1. С. 47-54. [Fadeev V.V., Shevchenko I.V., Melnichenko G.A. Autoimmune polyglandular syndromes. *Problemy Endokrinologii = Problems of Endocrinology*, 1999, Vol. 45, no. 1, pp. 47-54. (In Russ.)]
18. Helixbook. Справочник по медицинским лабораторным исследованиям: справочное издание. М: Практическая медицина, 2016. 1320 с. [Helixbook. Handbook of Medical Laboratory Research: Reference Edition]. Moscow: Prakticheskaya meditsina, 2016. 1320 p.
19. Чучалин А.Г. Болезни, ассоциированные с иммуноглобулином G // Пульмонология, 2017. Т. 27, № 3. С. 311-319. Chuchalin A.G. Diseases associated with immunoglobulin G // *Pulmonologiya = Pulmonology*, 2017, Vol. 27, no. 3, pp. 311-319.
20. Bertolini M., Zilio F., Rossi A., Kleditzsch P., Emelianov V.E., Gilhar A., Keren A., Meyer K.C., Wang E., Funk W., McElwee K., Paus R. Abnormal interactions between perifollicular mast cells and CD8⁺ T-cells may contribute to the pathogenesis of alopecia areata. *PLoS One*, 2014, Vol. 9, no. 5, e94260. doi: 10.1371/journal.pone.0094260.
21. Barakhmani N., Shabat MB., Duvik M. A history of atopy or autoimmunity increases the risk of developing alopecia areata. *Akad. Dermatol.*, 2009, Vol. 6, no. 14, pp. 581-591.
22. Bhardwaj P., Basu D., Podder I., Gharami R.C. Clinico-epidemiological profile of childhood alopecia areata along with dermoscopic correlation. *Indian Dermatol. Online J.*, 2021, Vol. 12, no. 2, pp. 250-257.

23. Guo H., Cheng Y., Shapiro J., McElwee K. The role of lymphocytes in the development and treatment of alopecia areata. *Expert Rev. Clin. Immunol.*, 2015, Vol. 11, no. 12, pp. 1335-1351.
24. Conic R.Z., Tamashunas N.L., Damiani G., Fabbrocini G., Cantelli M.; Young Dermatologists Italian Network, Bergfeld W.F. Comorbidities in pediatric alopecia areata. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.*, 2020, Vol. 34, no. 12, pp. 2898-2901.
25. Darwin E., Hirt P.A., Fertig R. Alopecia areata: review of epidemiology, clinical features, pathogenesis, and new treatment options. *Int. J. Trichology*, 2018, Vol. 10, no. 2, pp. 51-60.
26. Fricke A.C.V., Miteva M. Epidemiology and burden of alopecia areata: A systematic review. *Clin. Cosmetic Investig. Dermatol.*, 2015, Vol. 8, pp. 397-403.
27. Ito T. Recent advances in the pathogenesis of autoimmune hair loss disease alopecia areata. *Clin. Dev. Immunol.*, 2013, Vol. 2013, 348546. doi: 10.1155/2013/348546.
28. Kageyama R., Ito T., Hanai S. Immunological properties of atopic. Immunological properties of atopic dermatitis-associated alopecia areata. *Int. J. Mol. Sci.*, 2021, Vol. 22, no. 5, 2618. doi: 10.3390/ijms22052618.
29. Lee H.H., Gwillim E., Patel K.R., Rastogi S., Ibler E., Silverberg J.I. Epidemiology of alopecia areata, ophiasis, totalis, and universalis: A systematic review and meta-analysis. *J. Am. Acad. Dermatol.*, 2020, Vol. 82, no. 3, pp. 675-682.
30. Lim C.P., Severin R.K., Petukhova L. Big data reveal insights into alopecia areata comorbidities. *J. Invest. Dermatol. Symp. Proc.*, 2018, Vol. 19, pp. 57-61.
31. Pham C.T., Romero K., Almohanna H.M., Griggs J., Ahmed A., Tosti A. The role of diet as an adjuvant treatment in scarring and nonscarring alopecia. *Skin Appendage Disor.*, 2020, Vol. 6, pp. 88-96.
32. Pratt C.H., King L.E., Messenger A.G., Christiano A.M., Sundberg J.P. Alopecia areata. *Nat. Rev. Dis. Primers.*, 2017, Vol. 3, 17011. doi: 10.1038/nrdp.2017.11.
33. Rork J.F., Rashighi M., Harris J.E. Understanding autoimmunity of vitiligo and alopecia areata. *Curr. Opin. Pediatr.*, 2016, Vol. 28, no. 4, pp. 463-469.
34. Zoller M., McElvey K.D., Vitacolonna M., Hoffmann R. A progressive state, in contrast to the stable or regressive state of alopecia areata, is reflected in peripheral blood mononuclear cells. *Exp. Dermatol.*, 2004, Vol. 13, no. 7, pp. 435-444.

Авторы:

Штина И.Е. — к.м.н., заведующая лабораторией комплексных проблем здоровья детей с клинической группой ФБУН «Федеральный научный центр медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения», г. Пермь, Россия

Ошева Л.В. — к.м.н., врач-педиатр клинической группы медико-профилактических технологий управления рисками здоровья населения ФБУН «Федеральный научный центр медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения», г. Пермь, Россия

Authors:

Shtina I.E., PhD (Medicine), Head, Laboratory of Complex Health Problems of Children with a Clinical Group, Federal Research Center for Medical and Preventive Health Risk Management Technologies, Perm, Russian Federation

Osheva L.V., PhD (Medicine), Pediatrician of the Clinical Group, Federal Research Center for Medical and Preventive Health Risk Management Technologies, Perm, Russian Federation

Ермакова О.В. — врач-педиатр первой категории в клинической группе медико-профилактических технологий управления рисками здоровья населения ФБУН «Федеральный научный центр медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения», г. Пермь, Россия

Ermakova O.V., Pediatrician of the Clinical Group, Federal Research Center for Medical and Preventive Health Risk Management Technologies, Perm, Russian Federation

Матьянина А.И. — врач-педиатр первой категории в клинической группе медико-профилактических технологий управления рисками здоровья населения ФБУН «Федеральный научный центр медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения», г. Пермь, Россия

Matyanina A.I., Pediatrician of the Clinical Group, Federal Research Center for Medical and Preventive Health Risk Management Technologies, Perm, Russian Federation

Поступила 23.12.2022
Принята к печати 16.02.2023

Received 23.12.2022
Accepted 16.02.2023

ОСОБЕННОСТИ ЭКСПРЕССИИ МОЛЕКУЛ HLA-G И HLA-DR НА ЛИМФОЦИТАХ ЖЕНЩИН И ИХ ДЕТЕЙ С СЕПТАЛЬНЫМИ ВРОЖДЕННЫМИ ПОРОКАМИ СЕРДЦА

Шабалдин А.В., Сеницкая А.В., Шмулевич С.А., Гришачева Е.О.

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

Резюме. Цель исследования – изучение особенностей экспрессии молекул HLA-G и HLA-DR на лимфоцитах женщин и их детей с ВПС под воздействием аллогенных и аутогенных сывороток крови.

Обследовано 38 женщин и их детей со спорадическими септальными врожденными пороками сердца (основная группа). Группами сравнения были: 21 женщина и их дети без ВПС (первая группа сравнения), а также 17 условно здоровых мужчин (вторая группа сравнения). Всего обследовано 115 индивидуумов. Выполнялись исследования по методологии «cross-match» на проточном цитофлуориметре CytoFlex (Beckman Coulter, США). Оценивалось влияние аутогенных и аллогенных сывороток крови на изменение экспрессии молекул HLA-G и HLA-DR на лимфоцитах. Статистическая обработка полученных результатов проводилась в пакетах программ Statistica for WINDOWS фирмы StatSoft Inc. Версия 10.0 и MedCalc 17.5.3. по правилам вариационной статистики.

Выявлено, что под воздействием аутогенной сыворотки экспрессия молекул HLA-G и HLA-DR значимо не меняется на лимфоцитах мужчин и женщин, имеющих детей с врожденными пороками сердца. В то же время у женщин, имеющих более двух родов и всех условно здоровых детей, аутогенная сыворотка значимо подавляет экспрессию молекул HLA-G и HLA-DR на лимфоцитах. Особо выраженное и значимое подавление под воздействием аутогенной сыворотки отмечено для молекулы HLA-DR на CD3 положительных лимфоцитах. Другие значимые различия касались влияния аутогенной и аллогенной (материнской) сывороток на экспрессию молекул HLA-G и HLA-DR на лимфоцитах детей. Показано, что в группе детей с септальным ВПС, аутогенные и аллогенные сыворотки не подавляли экспрессию HLA-G и HLA-DR на лимфоцитах. В то же время в группе условно здоровых детей аутогенные и аллогенные (материнские) сыворотки подавляли экспрессию HLA-G и HLA-DR на лимфоцитах. Причем эффект подавления экспрессии как HLA-G, так и HLA-DR был значимо выше аллогенной сыворотки (материнской), чем аутогенной ($p < 0,01$). Данный эффект, вполне вероятно, определяется наличием ауто- и аллоиммунных антител к молекулам HLA-G и HLA-DR в сыворотке крови многорожавших женщин.

Адрес для переписки:

Сеницкая Анна Викторовна
ФГБНУ «Научно-исследовательский институт
комплексных проблем сердечно-сосудистых
заболеваний»
650002, Россия, г. Кемерово, Сосновый б-р, б.
Тел.: 8 (950) 586-33-97.
E-mail: cepoav1991@gmail.com

Address for correspondence:

Anna V. Sinitskaya
Research Institute for Complex Issues
of Cardiovascular Diseases
6 Sosnovy Blvd
Kemerovo
650002 Russian Federation
Phone: +7 (950) 586-33-97.
E-mail: cepoav1991@gmail.com

Образец цитирования:

А.В. Шабалдин, А.В. Сеницкая, С.А. Шмулевич,
Е.О. Гришачева «Особенности экспрессии молекул
HLA-G и HLA-DR на лимфоцитах женщин и их детей
с септальными врожденными пороками сердца»
// Медицинская иммунология, 2024. Т. 26, № 1. С. 89-106.
doi: 10.15789/1563-0625-EPO-2614

© Шабалдин А.В. и соавт., 2023

Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

A.V. Shabaldin, A.V. Sinitskaya, S.A. Shmulevich,
E.O. Grishacheva "Expression pattern of HLA-G and
HLA-DR molecules on lymphocytes of women and their
children with septal congenital heart defects", *Medical
Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2024,
Vol. 26, no. 1, pp. 89-106.
doi: 10.15789/1563-0625-EPO-2614

© Shabaldin A.V. et al., 2023

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

DOI: 10.15789/1563-0625-EPO-2614

Супрессорная активность женской сыворотки по отношению к аллогенным (эмбриона/плода/ребенка) и аутогенным (собственным) молекулам HLA-G и HLA-DR определяет протективный эффект в отношении формирования септальных врожденных пороков сердца у потомства.

Ключевые слова: врожденные пороки сердца, HLA-G, HLA-DR, аутосыворотка, лимфоциты, экспрессия

EXPRESSION PATTERN OF HLA-G AND HLA-DR MOLECULES ON LYMPHOCYTES OF WOMEN AND THEIR CHILDREN WITH SEPTAL CONGENITAL HEART DEFECTS

Shabaldin A.V., Sinitskaya A.V., Shmulevich S.A., Grishacheva E.O.

Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases, Kemerovo, Russian Federation

Abstract. The aim of our study was to evaluate the features of HLA-G and HLA-DR expression on lymphocytes of women and their children with congenital heart defects (CHD) under the influence of allogeneic and autologous blood sera.

38 women and their children with sporadic septal congenital heart defects (main group) were examined. The comparison groups included 21 women and their children without congenital heart disease (comparison group 1), as well as 17 apparently healthy men (comparison group 2). A total of 115 individuals were examined. The cross-match studies were carried out using a CytoFlex flow cytometer (Beckman Coulter, USA). The effects of autologous and allogeneic blood sera on HLA-G and HLA-DR expression on lymphocytes were evaluated. Statistical processing of the obtained results was carried out using Statistica for WINDOWS software packages from StatSoft Inc. Version 10.0 and MedCalc 17.5.3. by the rules of variation statistics.

The expression of HLA-G and HLA-DR molecules on the lymphocytes did not significantly change under the influence of autologous serum from men and women of children with CHD. At the same time, in women with more than two births of apparently healthy children, autologous serum significantly suppressed expression of HLA-G and HLA-DR on their lymphocytes. In particular, a pronounced and significant suppression was noted with autologous serum for HLA-DR molecules on CD3-positive lymphocytes. One may suggest that inflammation in the mother-embryo system is limited by this mechanism. Other significant differences concerned the effect of autologous and allogeneic (maternal) sera on the expression of HLA-G and HLA-DR molecules on the children's lymphocytes. We have shown that in the group of children with septal CHD, autologous and allogeneic sera did not suppress the expression of HLA-G and HLA-DR on lymphocytes. At the same time, in the group of apparently healthy children, autologous and allogeneic (maternal) sera suppressed the expression of HLA-G and HLA-DR on lymphocytes. Moreover, the suppressive effect upon expression of both HLA-G and HLA-DR was significantly higher in allogeneic (maternal) sera than in autologous serum ($p < 0.01$). This effect seems to be determined by the presence of auto- and alloimmune antibodies to HLA-G and HLA-DR molecules in blood serum of multiparous women.

The suppressor activity of female sera against allogeneic (embryo / fetus / child) and autologous (intrinsic) HLA-G and HLA-DR antigenic molecules may determine a protective effect related to development of septal congenital heart defects in offspring.

Keywords: congenital heart defects, HLA-DR, HLA-G, autologous serum, lymphocytes, expression

Работа выполнена при поддержке комплексной программы фундаментальных научных исследований СО РАН в рамках фундаментальной темы НИИ КПССЗ № 0419-2022-0001

Введение

Эпидемиологические исследования показали, что врожденные пороки сердца (ВПС) доминируют среди всей врожденной и наследственной патологии плода и новорожденного ребенка [10]. Частота значимых ВПС достигает 1%, а это зна-

чит, что каждый сотый ребенок рождается с пороком сердца, который необходимо лечить, в том числе хирургическими методами [14]. Особое значение имеют критические ВПС, определяющие уровень перинатальной и младенческой смертности в мире, а хирургическое лечение которых не приводит к полному выздоровлению ребенка [1].

Одной из важных проблем современной медицины является прегравидарное прогнозирование и специфическая профилактика врожденной па-

тологии плода и новорожденного ребенка, в том числе значимых и критических ВПС. Это может быть достигнуто при достаточном уровне знаний этиологии и патогенеза спорадических ВПС.

Современные исследования, в том числе с помощью OMICs технологий (исследования протеома, экзома, транскриптома и метаболома), спорадических (не имеющих семейной истории) ВПС показали значимые отклонения в регуляторных сетях, через которые контролируется пролиферация прогениторных клеток сердечно-сосудистой системы. Были получены схожие данные как для отдельных септальных ВПС, так и для комбинированных (например, тетрада Фалло) [12]. Показана ассоциативная значимость с ВПС генов цитокинов и мембранных рецепторов межклеточных контактов [12].

С другой стороны, продолжают исследоваться роли внешних факторов (макро- и микроэкологии) в индукции ВПС, а также иммунных нарушений в системе «мать – плод» [5, 7].

Спорадические ВПС являются мультифакториальными заболеваниями, при которых имеют место конституциональные (наследуемые от родителей) нарушения регуляции пролиферации и дифференцировки клеток эмбриобласта и прогениторных клеток сердечно-сосудистой системы. В то же время триггерными факторами для индукции этих сетей являются иммунные нарушения в системе «мать – плод». Они сами по себе могут активировать «патологические» регуляторные сети и могут усиливать индуцибельное действие ксено- и эндобиотиков с тератогенным эффектом.

Иммунология репродукции является важным разделом современной медицины, в котором можно выделить направление, посвященное иммунной регуляции эмбриогенеза. В этом ключе, были проведены исследования роли иммунных нарушений в системе «мать – эмбрион/плод» в детерминировании ВПС [7]. Особое значение было показано для модулирующей активности женской аутогенной сыворотки, высокая активность которой, по отношению к аллогенным взаимодействиям лимфоцитов супругов, является предиктором ВПС у их потомства. Оценка аллогенных взаимодействий лимфоцитов супругов проводилась по изменению экспрессии HLA-DR на лимфоцитах [6]. Кроме того, изучалась и роль генов кодирующих молекулу HLA-G и HLA-DR в детерминировании ВПС [2, 8]. Именно через межклеточные контакты посредством HLA-G и HLA-DR контролируется иммунное воспаление в системе «мать – плод», а также пролиферация и дифференцировка стволовых и прогениторных клеток эмбриона [2]. Ранее уже выдвигалась гипотеза, что декомпенсация воспалительного процесса в «системе мать – плод» может быть основой

индукции ВПС [9, 11]. В частности, провоспалительные цитокины могут сдвигать процессы пролиферации, дифференцировки и апоптоза в прогениторных клетках сердечно-сосудистой системы в сторону последнего (пироптоза) [2].

Вполне вероятно, что одним из ключевых гуморальных факторов экспрессии и функциональной активности молекул HLA-G и HLA-DR являются антитела к ним. Причем женские (материнские) антитела могут быть направлены как к собственным молекулам главного комплекса тканевой совместимости, так и к антигенам эмбриона/плода/новорожденного ребенка. Соответственно от аутогенной или аллогенной направленности антитела могут оказывать различное регуляторное влияние на иммунное обеспечение беременности и регуляцию эмбриогенеза.

Исходя из этого, была поставлена **цель исследования** – изучить особенности экспрессии молекул HLA-G и HLA-DR на лимфоцитах женщин и их детей с ВПС под воздействием аутогенных и аллогенных сывороток крови.

Материалы и методы

Для достижения поставленной цели исследования было обследовано 38 женщин и их детей со спорадическими септальными ВПС (основная группа). Распределение нозологических форм ВПС представлено в таблице 1.

Основная группа была сформирована на базе хирургического отделения «Научно-исследовательского института комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», где они проходили лечения. Дети находились в отделении вместе с матерями, которые подписывали информированное согласие на их участие, а также на участие их детей, иммунологических исследований. Все диагнозы ВПС у детей был подтверждены с помощью ЭхоКГ и других инструментальных методов обследования. У всех детей с ВПС отсутствовали хромосомные болезни и синдромы, а также в семьях не было других случаев рождения или пренатального обнаружения ВПС.

Были сформированы две группы сравнения. Первая группа сравнения была представлена 21 женщиной и их условно здоровыми детьми без ВПС, а также с отсутствием в семье родов или пренатального обнаружения ВПС. Группа была сформирована на поликлинических базах ФГБОУ ВО «Кемеровского государственного медицинского университета». У всех матерей первой группы сравнения было получено информированное согласие на их участие, а также их детей, в иммунологическом исследовании. Вторая группа сравнения состояла из 17 условно здоровых мужчин. Группа сформирована из сотрудников «Научно-исследовательского института комплексных проблем сердечно-сосудистых

ТАБЛИЦА 1. НОЗОЛОГИЧЕСКИЕ ФОРМЫ СПОРАДИЧЕСКИХ ВРОЖДЕННЫХ ПОРОКОВ СЕРДЦА У ДЕТЕЙ ОСНОВНОЙ ГРУППЫ

TABLE 1. NOSOLOGICAL FORMS OF SPORADIC CONGENITAL HEART DEFECTS IN CHILDREN OF THE MAIN GROUP

Септальный ВПС Septal CHD	Абсолютное Absolute	в %
Дефект межжелудочковой перегородки (ДМЖП) Ventricular septal defect (VSD)	8	21,06
Дефект межпредсердной перегородки (ДМПП) Atrial septal defect (ASD)	28	73,68
ДМЖП и ДМПП VSD and ASD	2	5,26

заболеваний». Все мужчины подписывали информированное согласие на участие в иммунологическом исследовании. Всего обследовано 115 индивидуумов.

Возраст матерей основной группы (Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)) был 25,3 (21,7-29,6) года, детей – 2,9 (0,5-4,8) года, а в группе сравнения – матерей 26,9 (22,5-30,8) года и детей 4,1 (3,6-5,9). Значимых различий не получено ($p < 0,05$). Половые различия в сравниваемых группах детей были сопоставимы.

Исследование первичной экспрессии молекул HLA-G и HLA-DR на лимфоцитах матерей, их детей и мужчин, а также вторичной, после инкубации с аутогенной и аллогенной сывороткой проводили по методологии «cross-match» на проточном цитофлуориметре CytoFlex (Beckman Coulter, США).

Исследование экспрессии HLA-G и HLA-DR в различных субпопуляциях лимфоцитов проводилось на женских, детских и мужских монокультурах. Лимфоциты выделялись из периферической крови на градиенте плотности 1,077 («Фиколл-1077», «Диаэм», Москва, Россия). Полученные взвеси женских, детских и мужских лимфоцитов двукратно отмывались раствором Хэнкса («Диаэм», Москва, Россия). Для этого по 1000 мкл раствора Хэнкса добавлялось в пробирки с женскими, детскими и мужскими лимфоцитами и центрифугировалось 10 минут при 1500 g. После центрифугирования надосадочная жидкость убиралась. Далее во все монокультуры с минимальным количеством раствора Хэнкса (среднее содержание лимфоцитов было 1 млн женских или мужских клеток и 1,5 млн детских клеток в 25 мкл раствора Хэнкса) для первичного окрашивания лимфоцитов добавлялись 5 мкл с моноклональными антителами к молекуле CD45, конъюгированными с флуоресцентным красителем перидинин-хлорофиллом 7 (PC-7, BioLegend, США). Инкубация проводилась в течение 15 минут при комнатной температуре в темноте, после которой выполнялась однократная отмывка лимфоцитов раствором Хэнкса от несвязанных антител. После отмывки в пробирки с детскими мо-

нокультурами добавлялось 600 мкл полной среды (RPMI-1640 (Sigma-Aldrich, США), с 2 ммольями L-глутамином (Panreac, Испания), с 10 ммольями Нерес-буфера (Sigma-Aldrich, США), с 5×10^{-5} ммольями 2-меркаптоэтанола (Biochem, Франция) и с 50 мкг/мл раствора гентамицина-сульфата («Ветинтерфарм», Россия)), а с женскими и мужскими – 400 мкл полной среды. Далее выполнялся подход «cross-match». Для каждой детской монокультуры готовилось 3 пробирки для оценки экспрессии HLA-G и 3 пробирки – для HLA-DR, в которые вносилось по 100 мкл клеточной взвеси (250 тысяч клеток в полной среде). Далее, в первую пробирку добавлялись 100 мкл полной среды (контрольная пробирка), во вторую пробирку вносились 100 мкл аутогенной сыворотки крови ребенка, а в третью пробирку 100 мкл аллогенной сыворотки крови матери. Для женских и мужских лимфоцитов исследование выполнялось в двух пробирках (с контрольной и с аутогенной сывороткой) для HLA-G и в двух – для HLA-DR. Всего 4 пробирки (250 тысяч клеток в каждой пробирке). Все пробирки помещались термостат на 0,5 часа при 37 °С. После окончания инкубации проводилась однократная отмывка лимфоцитов каждой пробирки раствором Хэнкса по вышеописанной методике. После однократной отмывки выполнялось окрашивание лимфоцитов в каждой монокультуре как в полной среде, так и в среде с добавлением аллогенных и аутогенных сывороток с помощью конъюгированных моноклональных антител (МКАТ). В пробирки, где оценивалась экспрессия HLA-G, добавлялись 3 мкл с МКАТ к молекуле CD3 конъюгированные с флуорисцеин изотиоцианат (FITC) и 3 мкл с МКАТ к молекуле HLA-G конъюгированные с алофикиоцианин (APC) (BioLegend, США). Соответственно в пробирки, где оценивалась экспрессия HLA-DR, добавлялись МКАТ в тех же соотношения, но вместо МКАТ к HLA-G добавлялся МКАТ к HLA-DR, также конъюгированный с APC (BioLegend, США). Объем антител к количеству лимфоцитов, время и температура инкубаций соответствовали прилагаемым инструкциям к каждому конъюгированному моноклональному

антителу. Инкубирование проводилось в течение 15 минут при комнатной температуре в темноте.

С учетом перекрестного реагирования с молекулами HLA-G и HLA-DR антител-содержащих в аллогенных и аутогенных сыворотках оценили концентрацию гаммаглобулинов в растворах моноклональных антител и в добавляемой сыворотки крови. Так, из раствора специфических МКАТ добавлялось на 250 тысяч клеток 1,5 мкг антител; а из сыворотки крови на это же количество клеток добавлялось около 1000 мкг гаммаглобулина, что могло быть достаточным для частичного закрытия антигенных детерминант анализируемых молекул на лимфоцитах.

После окончания инкубации с МКАТ проводилась отмывка лимфоцитов раствором Хенкса по описанной выше методике. Раствор 1X OptiLyse (Beckman Coulter, США) добавлялся по 200 мкл в каждую пробирку для фиксации антител на лимфоцитах в монокультурах.

Особенности экспрессии HLA-G и HLA-DR на различных субпопуляциях лимфоцитов женщин, детей и мужчин и влияние на этот процесс аутогенных и аллогенных сывороток крови были оценены с помощью протокола проточной ци-

тофлуориметрии для CytoFlex (Beckman Coulter, США).

Протокол включал несколько последовательных этапов для каждой монокультуры инкубированных в полной среде и в среде с добавлением аллогенных и аутогенных сывороток крови.

Первый этап был связан с выделением в первой гистограмме популяции лимфоцитов по их размерным характеристикам (прямое (малоугловое) светорассеяние – forward scatter – FSL) и по внутриклеточной плотности (боковое светорассеяние – side scatter – SSL).

В следующей гистограмме пул лимфоцитов был дополнительно кластеризован по общему лейкоцитарному маркеру CD45 (CD45-PC7) и внутриклеточной плотности (SSL).

Третья гистограмма была для этого исследования основной. Именно в ней анализировались выделенные лимфоциты по фенотипам: CD3⁺/HLA-G⁺, CD3⁺/HLA-DR⁺, CD3⁺/HLA-G⁺, CD3⁺/HLA-DR⁺, а также CD45⁺/HLA-G⁺, CD45⁺/HLA-DR⁺. Анализ этих субпопуляций проводился во всех монокультурах как в полной среде, так и с добавлением аутогенных и аллогенных сывороток крови (рис. 1, 2).

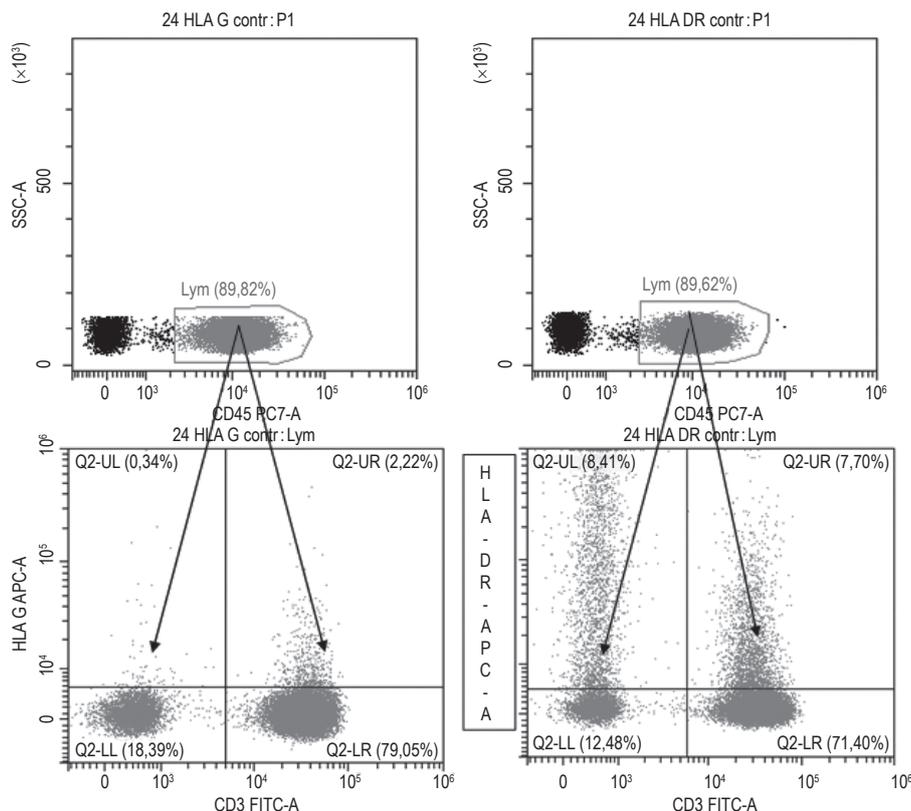


Рисунок 1. Протокол проточной цитофлуориметрии для анализа экспрессии молекул HLA-G и HLA-DR на лимфоцитах женщин, детей и мужчин в полной среде (сбор клеток прекращался при достижении 10 000 лимфоцитов по гейту SSC-A/CD45 PC-7A)

Figure 1. Flow cytometry protocol for the analysis of the expression of HLA-G and HLA-DR molecules on lymphocytes of women, children and men in complete medium (cell collection was stopped when reaching 10,000 lymphocytes by the SSC-A/CD45 PC-7A gate)

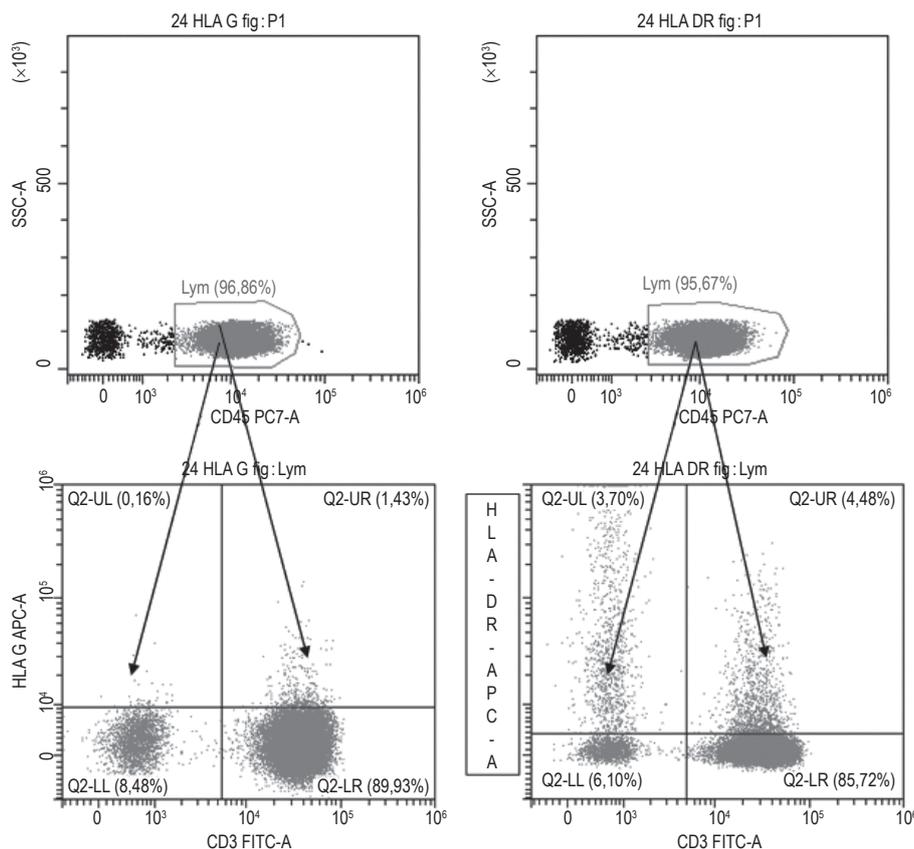


Рисунок 2. Протокол проточной цитофлуориметрии для анализа экспрессии молекул HLA-G и HLA-DR на лимфоцитах женщин, детей и мужчин в среде с добавлением сыворотки крови (сбор клеток прекращался при достижении 10 000 лимфоцитов по гейту SSC-A/CD45 PC-7A)

Figure 2. Flow cytometry protocol for the analysis of the expression of HLA-G and HLA-DR molecules on lymphocytes of women, children and men in a medium with the addition of blood serum (cell collection was stopped when 10,000 lymphocytes were reached according to the SSC-A/CD45 PC-7A gate)

По различию экспрессии HLA-G и HLA-DR на различных субпопуляциях женских, детских и мужских лимфоцитов в полной среде и в среде с добавлением аллогенных и аутогенных сывороток крови соответственно определяли их эффект. Если в среде с той или иной сывороткой крови экспрессия HLA-G и HLA-DR на соответствующей субпопуляции лимфоцитов была ниже, чем в полной среде, то эффект данной сыворотки крови считался блокирующим. В том случае, если в среде с сывороткой крови экспрессия молекул HLA-G и HLA-DR на соответствующей субпопуляции лимфоцитов была выше, чем в полной среде, то эффект данной сыворотки считался активирующим. Для количественной оценки эффектов сывороток крови использовали формулу:

Изменение экспрессии HLA-G или HLA-DR в % = ((количество клеток с молекулами HLA-G или HLA-DR в среде с сывороткой крови – количество клеток с молекулами HLA-G или HLA-DR в полной среде) / количество клеток с молекулами HLA-G или HLA-DR в полной среде) × 100%.

Статистическая обработка данных проводилась в пакетах программ Statistica for WINDOWS фирмы StatSoft Inc. Версия 10.0 и MedCalc 17.5.3. по правилам вариационной статистики.

Нормальность распределения выборок оценивали с помощью W-теста Шапиро–Уилка. Проверка на нормальность распределения показала, что данные в исследовании не имеют нормального распределения. Поэтому в дальнейшем расчеты производились методами непараметрической статистики. Номинальные данные описывались с указанием абсолютных значений, процентных долей (%). Количественные данные представляли в виде медианы (Me), 25-го и 75-го перцентилей ($Q_{0,25}$ – $Q_{0,75}$). Сравнение значений уровней метрических показателей в несвязанных выборках проводили с помощью непараметрического Манна–Уитни, а в связанных – Вилкоксона.

Уровень статистической значимости различий принимали при $p < 0,05$, что соответствует медико-биологическим исследованиям [4].

Результаты

Проведенное исследование показало, что по экспрессии HLA-G на различных субпопуляциях лимфоцитов как в полной среде, так и с добавлением аутогенной сыворотки сравниваемые группы (женщины основной группы, женщины первой группы сравнения и мужчины второй группы сравнения) не различались. Тем самым можно говорить о том, что экспрессия этих молекул является достаточно стабильным свойством лимфоцитов периферической крови человека. Как видно из таблицы 1, количество лимфоцитов CD3⁻ (В-лимфоциты и натуральные киллерные лимфоциты), экспрессирующих данную молекулу, не превышал 1%, а лимфоцитов CD3⁺ (Т-лимфоцитов) с этой молекулой достигало 7%. Эти данные указывают, что молекула HLA-G может также быть экспрессированной на активированных Т-лимфоцитах.

В то же время для изменения экспрессии молекул HLA-G под воздействием аутогенной сыворотки крови получены значимые различия между группами. Прежде всего, необходимо отметить, что в первой группе сравнения (женщины, имеющие условно здоровых детей) аутогенная сыворотка преимущественно оказывала блокирующий эффект (табл. 2), и это, возможно, связано с наличием в ней регуляторных блокирующих антител к собственной молекуле HLA-G. В то же время в основной группе доминировал эффект активации экспрессии или отсутствие такового. Во второй группе сравнения (мужчины) аутогенная сыворотка крови была преимущественно нейтральной по отношению к экспрессии молекул HLA-G. По данному показателю получены значимые различия не только между основной группой и группами сравнения, но и внутри групп сравнения. Надо отметить, что женщины основной группы имели более высокий активирующий эффект аутогенной сыворотки на экспрессию молекул HLA-G в анализируемых субпопуляциях лимфоцитов, чем в группе мужчин (вторая группа сравнения). Если принять во внимание, что HLA-G на Т-лимфоцитах отражает их активацию, то можно предположить о повышении провоспалительного потенциала в женском микроокружении эмбриона в основной группе.

Исследования экспрессии HLA-DR на различных субпопуляциях лимфоцитов в сравниваемые группы (женщины основной группы, женщины первой группы сравнения и мужчины второй группы сравнения) показали единственное значимое различие (табл. 3). Это различие касалось основной группы и первой группы сравнения (женщины, имеющие здоровых детей). Так, в основной группе CD3⁺ лимфоцитов (Т-лимфоциты) с молекулой HLA-DR на их мем-

бране было значимо больше в среде с аутогенной сывороткой крови, чем в этих условиях в первой группе сравнения ($p < 0,05$). Эти данные указывают, что уровень активированных Т-лимфоцитов под воздействием аутогенной сыворотки возрастает в группе женщин, имеющих детей со спорадическими септальными ВПС.

Наглядно этот эффект продемонстрирован при оценке изменения экспрессии молекулы HLA-DR под воздействием аутогенной сыворотки крови. По аналогии с изменением экспрессии молекулы HLA-G под воздействием аутогенной сыворотки, в первой группе сравнения (женщины, имеющие условно здоровых детей) аутогенная сыворотка преимущественно блокировала экспрессию HLA-DR на анализируемых субпопуляциях лимфоцитов (табл. 3). Вполне вероятно, что этот эффект был связан с наличием в ней регуляторных блокирующих антител к собственной молекуле HLA-DR. В основной группе также доминировал активирующий эффект на экспрессию HLA-DR. В группе мужчин (вторая группа сравнения) аутогенная сыворотка крови была преимущественно нейтральной по отношению к экспрессии молекул HLA-DR. По этим показателям получены значимые различия между основной группой и группами сравнения, а также и внутри групп сравнения. Соответственно, женщины основной группы имели высокий активирующий эффект аутогенной сыворотки на экспрессию молекул HLA-DR, в том числе по отношению к группе мужчин (вторая группа сравнения). Этот эффект был особенно представлен для субпопуляции CD3⁻ лимфоцитов (В-лимфоциты и натуральные киллерные лимфоциты – NK-лимфоциты). Можно предположить о дополнительном негативном влиянии женских гуморальных факторов на активацию NK-лимфоцитов в группе женщин, имеющих детей со спорадическими септальными ВПС.

На следующем этапе исследования провели сравнение эффекта аутогенной и аллогенной сывороток на экспрессию молекул HLA-G и HLA-DR на лимфоцитах детей. В таблице 4 представлены данные об экспрессии молекулы HLA-G на субпопуляциях детских лимфоцитов под воздействием аутогенной (детской сыворотки крови) и аллогенной (материнской). Получены значимые различия. Так, в первой группе сравнения (условно здоровые дети) CD3⁺ лимфоцитов (Т-лимфоцитов) с молекулой HLA-G в среде без добавления сывороток крови было значимо больше, чем в основной группе (дети со спорадическими септальными ВПС). Анализ изменения экспрессии молекул HLA-G на детских лимфоцитах под воздействием аутогенной и аллогенной сывороток крови в сравниваемых

ТАБЛИЦА 2. ЭКСПРЕССИЯ МОЛЕКУЛ HLA-G НА ЛИМФОЦИТАХ СРАВНИВАЕМЫХ ГРУПП И ИЗМЕНЕНИЯ ИХ ЭКСПРЕССИИ ПРИ ДОБАВЛЕНИИ АУТОГЕННОЙ СЫВОРОТКИ (АУТОСЫВОРОТКА)

TABLE 2. EXPRESSION OF HLA-G MOLECULES ON LYMPHOCYTES OF THE COMPARED GROUPS AND CHANGES IN THEIR EXPRESSION UPON ADDITION OF AUTOGENOUS SERUM (AUTOSERUM)

Аналиты Analytes	1. Женщины, основная группа 1. Female, main group n = 38			2. Женщины, первая группа сравнения 2. Female, first comparison group n = 21			3. Мужчины, вторая группа сравнения 3. Male, second comparison group n = 17			p _{1,2}	p _{1,3}	p _{2,3}
	Me	Q _{0,75}	Q _{0,25}	Me	Q _{0,75}	Q _{0,25}	Me	Q _{0,75}	Q _{0,25}			
	HLA-G на CD3⁻ без аутосыыворотки (контроль), в % HLA-G on CD3 ⁻ without autoserum (control), in %	0,30	0,53	0,08	0,65	1,39	0,01	0,83	1,67			
HLA-G на CD3⁻ с аутосыывороткой (опыт), в % HLA-G on CD3 ⁻ with autoserum (experiment), in %	0,38	0,65	0,11	0,13	0,24	0,03	0,28	0,42	0,14	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05
HLA-G на CD3⁺ без аутосыыворотки (контроль), % HLA-G on CD3 ⁺ without autoserum (control), %	1,05	1,83	0,27	3,93	6,87	0,02	3,80	7,97	0,37	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05
HLA-G на CD3⁺ с аутосыывороткой (опыт), в % HLA-G on CD3 ⁺ with autoserum (experiment), in %	1,15	2,21	0,10	1,08	2,19	0,04	0,97	1,65	0,28	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05
Изменение в % HLA-G на CD3⁻ (контроль/опыт) Change in % HLA-G to CD3 ⁻ (control/experiment)	78,18	253,41	-97,04	-34,24	56,23	-124,71	38,65	74,94	-67,63	p < 0,001*	p < 0,05*	p < 0,01*
Изменение в % HLA-G на CD3⁺ (контроль/опыт) Change in % HLA-G on CD3 ⁺ (control/experiment)	45,72	168,75	-77,32	-35,59	7,18	-78,38	22,55	150,84	-85,74	p < 0,001*	p < 0,05*	p < 0,01*

Примечание. * – значимые различия показателей.

Note. *, significant differences in indicators.

ТАБЛИЦА 3. ЭКСПРЕССИЯ МОЛЕКУЛ HLA-DR НА ЛИМФОЦИТАХ СРАВНИВАЕМЫХ ГРУПП И ИЗМЕНЕНИЯ ИХ ЭКСПРЕССИИ ПРИ ДОБАВЛЕНИИ АУТОГЕННОЙ СЫВОРОТКИ (АУТОСЫВОРОТКА)

TABLE 3. EXPRESSION OF HLA-DR MOLECULES ON LYMPHOCYTES OF THE COMPARED GROUPS AND CHANGES IN THEIR EXPRESSION UPON THE ADDITION OF AUTOGENOUS SERUM (AUTOSERUM)

Аналиты Analytes	1. Женщины, основная группа 1. Female, main group n = 38			2. Женщины, первая группа сравнения 2. Female, first comparison group n = 21			3. Мужчины, вторая группа сравнения 3. Male, second comparison group n = 17			p _{1,2}	p _{1,3}	p _{2,3}
	Me	Q _{0,75}	Q _{0,25}	Me	Q _{0,75}	Q _{0,25}	Me	Q _{0,75}	Q _{0,25}			
	HLA-DR на CD3 ⁻ без аутосыыворотки (контроль), в % HLA-DR on CD3 ⁻ without autoserum (control), in %	6,65	9,79	3,51	9,93	17,22	2,64	8,41	10,09			
HLA-DR на CD3 ⁻ с аутосыывороткой (опыт), в % HLA-DR on CD3 ⁻ with autoserum (experiment), in %	7,73	11,72	3,74	10,71	22,92	-1,51	6,54	7,29	5,78	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05
HLA-DR на CD3 ⁺ без аутосыыворотки (контроль), в % HLA-DR on CD3 ⁺ without autoserum (control), in %	10,31	18,93	1,68	11,44	20,55	2,32	9,05	11,98	6,13	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05
HLA-DR на CD3 ⁺ с аутосыывороткой (опыт), в % HLA-DR on CD3 ⁺ with autoserum (experiment), in %	8,19	12,46	3,91	4,87	7,99	1,74	7,06	8,83	5,29	p < 0,05*	p > 0,05	p > 0,05
Изменение в % HLA-DR на CD3 ⁻ (контроль/опыт) Change in % HLA-DR per CD3 ⁻ (control / experiment)	30,89	104,85	-43,08	-15,21	47,62	-58,03	1,51	12,53	-25,49	p < 0,01*	p < 0,05*	p < 0,05*
Изменение в % HLA-DR на CD3 ⁺ (контроль/опыт) Change in % HLA-DR on CD3 ⁺ (control / experiment)	10,68	90,63	-73,26	-46,95	-26,60	-67,31	2,38	14,78	-27,99	p < 0,001*	p < 0,05*	p < 0,01*

Примечание. * – значимые различия показателей.

Note. *, significant differences in indicators.

ТАБЛИЦА 4. ЭКСПРЕССИЯ МОЛЕКУЛ HLA-G НА ЛИМФОЦИТАХ ДЕТЕЙ СРАВНИВАЕМЫХ ГРУПП И ИЗМЕНЕНИЯ ИХ ЭКСПРЕССИИ ПРИ ДОБАВЛЕНИИ АУТОГЕННОЙ (ДЕТСКОЙ) И АЛЛОГЕННОЙ (МАТЕРИНСКОЙ) СЫВОРОТОК КРОВИ
TABLE 4. EXPRESSION OF HLA-G MOLECULES ON LYMPHOCYTES OF CHILDREN OF THE COMPARED GROUPS AND CHANGES IN THEIR EXPRESSION WITH THE ADDITION OF AUTOGENOUS (CHILDREN'S) AND ALLOGENEIC (MATERNAL) BLOOD SERA

Аналиты Analytes	Дети, основная группа Children, main group n = 38			Дети, первая группа сравнения Children, first comparison group n = 21			p
	Me	Q _{0,75}	Q _{0,25}	Me	Q _{0,75}	Q _{0,25}	
HLA-G на CD3 ⁻ без сывороток HLA-G on CD3 ⁻ without serum	0,37	0,54	0,19	1,29	2,07	0,51	p > 0,05
HLA-G на CD3 ⁻ с аутосывороткой HLA-G on CD3 ⁻ with auto serum	0,75	1,29	0,20	0,46	0,48	0,44	p > 0,05
HLA-G на CD3 ⁻ с аллосывороткой HLA-G on CD3 ⁻ with allo serum	0,33	0,50	0,16	0,19	0,31	0,06	p > 0,05
HLA-G на CD3 ⁺ без сывороток HLA-G on CD3 ⁺ without serum	0,58	1,06	0,10	2,99	4,65	1,33	p < 0,05*
HLA-G на CD3 ⁺ с аутосывороткой HLA-G on CD3 ⁺ with auto serum	0,80	1,49	0,11	0,90	1,49	0,30	p > 0,05
HLA-G на CD3 ⁺ с аллосывороткой HLA-G on CD3 ⁺ with allo serum	0,58	0,95	0,21	0,58	0,72	0,45	p > 0,05
Изменение в % HLA-G на CD3 ⁻ (контроль/ауто) Change in % HLA-G to CD3 ⁻ (control / auto)	143,72	324,87	-37,42	4,19	25,18	-13,57	p < 0,01*
Изменение в % HLA-G на CD3 ⁻ (контроль/алло) Change in % HLA-G to CD3 ⁻ (control / allo)	17,71	114,66	-79,23	-86,62	-83,83	-89,40	p < 0,001*
Изменение в % HLA-G на CD3 ⁺ (контроль/ауто) Change in % HLA-G on CD3 ⁺ (control / auto)	44,03	140,98	-52,92	1,42	35,73	-18,53	p < 0,01*
Изменение в % HLA-G на CD3 ⁺ (контроль/алло) Change in % HLA-G on CD3 ⁺ (control / allo)	30,39	130,23	-69,45	-75,45	-61,88	-89,01	p < 0,001*

Примечание. * – значимые различия показателей; ауто – аутогенная сыворотка, алло – аллогенная сыворотка.

Note. *, significant differences in indicators. Abbreviations: auto, autogenous serum; allo, allogeneic serum.

группах показал значимые различия по всем показателям (табл. 4).

Так, показатели изменения экспрессии в основной группе все были значимо выше, чем в первой группе сравнения. Надо отметить, что материнская аллогенная сыворотка имела эффект активации экспрессии молекул HLA-G на CD3⁻ и CD3⁺ в группе детей со спорадическими септальными ВПС, в то время как в первой группе

сравнения материнская сыворотка обладала блокирующим эффектом по отношению к HLA-G. Детская аутогенная сыворотка преимущественно обладала нейтральным эффектом в первой группе сравнения (эффект схож с влиянием аутосыворотки на мужские лимфоциты) и активирующим эффектом в основной группе. Различия по этим показателям были значимыми.

ТАБЛИЦА 5. ИЗМЕНЕНИЯ ЭКСПРЕССИИ МОЛЕКУЛ HLA-G НА ЛИМФОЦИТАХ ДЕТЕЙ ПОД ВОЗДЕЙСТВИЕМ АУТОГЕННОЙ (ДЕТСКОЙ) И АЛЛОГЕННОЙ (МАТЕРИНСКОЙ) СЫВОРОТОК КРОВИ

TABLE 5. CHANGES IN THE EXPRESSION OF HLA-G MOLECULES ON LYMPHOCYTES OF CHILDREN UNDER THE INFLUENCE OF AUTOGENOUS (CHILDREN'S) AND ALLOGENEIC (MATERNAL) BLOOD SERA

Аналиты Analytes	Аутосыворотка Autoserum			Аллосыворотка Alloserum			p
	Me	Q _{0,75}	Q _{0,25}	Me	Q _{0,75}	Q _{0,25}	
Основная группа, изменение в % HLA-G на CD3⁻ (контроль/сыворотка) Main group, change in % HLA-G to CD3 ⁻ (control / serum)	143,72	324,87	-37,42	17,71	114,66	-79,23	p < 0,001*
Сравнения группа, изменение в % HLA-G на CD3⁻ (контроль/сыворотка) Comparison group, change in % HLA-G to CD3 ⁻ (control / serum)	4,19	25,18	-13,57	-86,62	-83,83	-89,40	p < 0,01*
Основная группа, изменение в % HLA-G на CD3⁺ (контроль/сыворотка) Main group, change in % HLA-G to CD3 ⁺ (control / serum)	44,03	140,98	-52,92	30,39	130,23	-69,45	p > 0,05
Сравнения группа, изменение в % HLA-G на CD3⁺ (контроль/сыворотка) Comparison group, change in % HLA-G on CD3 ⁺ (control / serum)	1,42	35,73	-18,53	-75,45	-61,88	-89,01	p < 0,01*

Примечание. * – значимые различия показателей; аутосыворотка – аутогенная сыворотка, аллосыворотка – аллогенная сыворотка.

Note. *, significant differences in indicators. Abbreviations: autoserum, autogenous serum; alloserum, allogeneic serum.

Дополнительно проведено сравнение экспрессии молекул HLA-G на лимфоцитах детей под воздействием аутогенной (детской) и аллогенной (материнской) сывороток крови (табл. 5). Как видно из таблицы 5 аллогенная сыворотка крови обладала более выраженным блокирующим эффектом по отношению к экспрессии молекулы HLA-G в основной и группе сравнения при сопоставлении с аутогенной сывороткой. Отсутствие значимых различий между аллогенной и аутогенной сывороткам было в основной группе на популяции CD3⁺ лимфоцитах (Т-лимфоцитах). Обе сыворотки обладали активирующим эффектом в отношении этих лимфоцитов. Возможно, что этот эффект стимуляции Т-лимфоцитов детей сывороточными факторами определяет высокий провоспалительный потенциал в основной группе.

По аналогии с молекулой HLA-G выполнены исследования и по оценке экспрессии молекул HLA-DR на лимфоцитах детей (табл. 6 и 7). Как видно из таблицы 6, значимые различия по количеству лимфоцитов с HLA-DR были выявлены для детей основной и первой группы сравнения.

Так, в основной группе количество CD3⁻ лимфоцитов (В-лимфоцитов и НК-лимфоцитов) с HLA-DR было значимо выше как в среде без сывороток крови, так и во всех средах с добавлением аутогенной и аллогенной сывороток крови. Кроме того, значимо больше было CD3⁺ лимфоцитов (Т-лимфоцитов) с молекулой HLA-DR в основной группе при добавлении в среде аллогенной материнской сыворотки крови. Это также указывает на высокую провоспалительную активность у детей основной группы, особенно под воздействием аллогенной (материнской) сыворотки крови.

Показатели изменения экспрессии в основной группе все были значимо выше, чем в первой группе сравнения для всех показателей. Надо отметить, что по отношению к экспрессии молекул HLA-DR на CD3⁻ и CD3⁺ лимфоцитах в группе условно здоровых детей как аллогенная (материнская), так и аутогенная (детская) сыворотки крови обладали блокирующим эффектом. Механизм такого действия аутогенной сыворотки не

ТАБЛИЦА 6. ЭКСПРЕССИЯ МОЛЕКУЛ HLA-DR НА ЛИМФОЦИТАХ ДЕТЕЙ СРАВНИВАЕМЫХ ГРУПП И ИЗМЕНЕНИЯ ИХ ЭКСПРЕССИИ ПРИ ДОБАВЛЕНИИ АУТОГЕННОЙ (ДЕТСКОЙ) И АЛЛОГЕННОЙ (МАТЕРИНСКОЙ) СЫВОРОТОК КРОВИ

TABLE 6. EXPRESSION OF HLA-DR MOLECULES ON LYMPHOCYTES OF CHILDREN OF THE COMPARED GROUPS AND CHANGES IN THEIR EXPRESSION WITH THE ADDITION OF AUTOGENOUS (CHILDREN'S) AND ALLOGENEIC (MATERNAL) BLOOD SERA

Аналиты Analytes	Дети, основная группа Children, main group n = 38			Дети, первая группа сравнения Children, first comparison group n = 21			p
	Me	Q _{0,75}	Q _{0,25}	Me	Q _{0,75}	Q _{0,25}	
HLA-DR на CD3⁻ без сывороток HLA-DR on CD3 ⁻ no serum	13,08	23,17	3,00	8,41	10,09	6,74	p < 0,05*
HLA-DR на CD3⁻ с аутосывороткой HLA-DR on CD3 ⁻ with auto serum	16,61	31,37	1,85	6,54	7,29	5,78	p < 0,05*
HLA-DR на CD3⁻ с аллосывороткой HLA-DR on CD3 ⁻ with allo serum	13,55	26,11	0,99	7,04	7,84	6,24	p < 0,05*
HLA-DR на CD3⁺ без сывороток HLA-DR on CD3 ⁺ without serum	8,70	14,73	2,68	9,05	11,97	6,13	p > 0,05
HLA-DR на CD3⁺ с аутосывороткой HLA-DR on CD3 ⁺ with auto serum	7,67	13,89	1,45	7,06	8,83	5,29	p > 0,05
HLA-DR на CD3⁺ с аллосывороткой HLA-DR on CD3 ⁺ with allo serum	8,13	14,96	1,29	4,57	4,78	4,35	p < 0,05*
Изменение в % HLA-DR на CD3⁻ (контроль/ауто) Change in % HLA-DR per CD3 ⁻ (control / auto)	36,44	113,19	-40,30	-21,51	-15,53	-27,49	p < 0,001*
Изменение в % HLA-DR на CD3⁻ (контроль/алло) Change in % HLA-DR per CD3 ⁻ (control / allo)	2,30	46,60	-42,00	-15,49	-8,90	-22,08	p < 0,05*
Изменение в % HLA-DR на CD3⁺ (контроль/ауто) Change in % HLA-DR per CD3 ⁺ (control / auto)	-5,67	33,22	-44,55	-20,38	-12,78	-27,99	p < 0,05*
Изменение в % HLA-DR на CD3⁺ (контроль/алло) Change in % HLA-DR on CD3 ⁺ (control / allo)	-8,00	17,43	-33,42	-45,53	-26,83	-64,24	p < 0,01*

Примечание. * – значимые различия показателей; ауто – аутогенная сыворотка, алло – аллогенная сыворотка.

Note. *, significant differences in indicators. Abbreviations: auto, autogenous serum; allo, allogeneic serum.

ТАБЛИЦА 7. ИЗМЕНЕНИЯ ЭКСПРЕССИИ МОЛЕКУЛ HLA-DR НА ЛИМФОЦИТАХ ДЕТЕЙ ПОД ВОЗДЕЙСТВИЕМ АУТОГЕННОЙ (ДЕТСКОЙ) И АЛЛОГЕННОЙ (МАТЕРИНСКОЙ) СЫВОРОТОК КРОВИ

TABLE 7. CHANGES IN THE EXPRESSION OF HLA-DR MOLECULES ON CHILDREN'S LYMPHOCYTES UNDER THE INFLUENCE OF AUTOGENOUS (CHILDREN'S) AND ALLOGENEIC (MATERNAL) BLOOD SERA

Аналит Analyte	Аутосыворотка Autoserum			Аллосыворотка Alloserum			p
	Me	Q _{0,75}	Q _{0,25}	Me	Q _{0,75}	Q _{0,25}	
Основная группа, изменение в % HLA-DR на CD3⁻ (контроль/ сыворотка) Main group, change in % HLA-DR to CD3 ⁻ (control / serum)	36,44	113,19	-40,30	2,30	46,60	-42,00	p < 0,01*
Сравнения группа, изменение в % HLA-DR на CD3⁻ (контроль/ сыворотка) Comparison group, change in % HLA-DR per CD3 ⁻ (control / serum)	-21,51	-15,53	-27,49	-15,49	-8,90	-22,08	p < 0,05*
Основная группа, изменение в % HLA-DR на CD3⁺ (контроль/ сыворотка) Main group, change in % HLA-DR on CD3 ⁺ (control / serum)	-5,67	33,22	-44,55	-7,81	17,43	-33,42	p > 0,05
Сравнения группа, изменение в % HLA-DR на CD3⁺ (контроль/ сыворотка) Comparison group, change in % HLA-DR for CD3 ⁺ (control / serum)	-20,38	-12,78	-27,99	-45,53	-26,83	-64,24	p < 0,01*

Примечание. * – значимые различия показателей; аутосыворотка – аутогенная сыворотка, аллосыворотка – аллогенная сыворотка.

Note. *, significant differences in indicators. Abbreviations: autoserum, autogenous serum; alloserum, allogeneic serum.

совсем понятен, возможно, это эффект материнских антител.

Также дополнительно проведено сравнение экспрессии молекул HLA-DR на лимфоцитах детей под воздействием аутогенной (детской) и аллогенной (материнской) сывороток крови (табл. 7). Как видно из таблицы 7, аллогенная сыворотка крови обладала более выраженным блокирующим эффектом по отношению к экспрессии молекулы HLA-DR в основной и группе сравнения, при сопоставлении с аутогенной сывороткой. Единственное отличие касалось группы сравнения и субпопуляции CD3⁻ лимфоцитов (B-лимфоциты и NK-лимфоциты). В этом сравнении аутогенная сыворотка обладала более выраженным блокирующим эффектом, чем аллогенная. Так же как и для молекулы

HLA-G, выявлено отсутствие значимых различий между аллогенной и аутогенной сывороткам в основной группе на популяции CD3⁺ лимфоцитов (T-лимфоцитов). Обе сыворотки обладали блокирующим эффектом в отношении этих лимфоцитов. Блокирующий эффект аутогенной детской сыворотки по отношению к молекуле HLA-DR требует дальнейшего изучения и, возможно, определяется материнскими антителами.

Обсуждение

Вопрос о регуляции иммунных взаимодействий в системе «мать – эмбрион» при физиологической беременности и при нарушениях в этом процессе активно изучается в мировой литературе, в том числе на примере критических

клинических проявлений, таких как идиопатические репродуктивные потери [3]. Одним из ключевых является вопрос об иммунных механизмах толерантности к полуаллогенному зародышу. Соответственно, при патологических состояниях исследуются пути ее отмены. Была показана роль эмбриональных HLA (HLA Ib), в том числе HLA-G, в моделировании иммунного ответа на аллогенные антигены в норме и при патологии. Доказано, что молекула HLA-G, инактивирует киллинг-индуцируемый рецептор (KIR2DL4 и ILT-2) NK-лимфоцитов [17]. Доказано, что молекула HLA-G экспрессируется не только на клетках вневорсинчатого цитотрофобласта, но и в половых путях, в крови небеременных женщин, в семенной жидкости, а также в предимплантированных эмбрионах [16]. Необходимо учесть, что ген *HLA-G* имеет низкий полиморфизм, поэтому практически у всех людей экспрессируется почти один и тот же белок. Именно эти уникальные особенности отличают HLA-G от его высокополиморфных аналогов HLA класса Ia, молекул HLA-A, HLA-B и HLA-C. С учетом выше сказанного, растворимые и мембранные формы HLA-G материнского, эмбрионального и отцовского происхождения, являясь фактически одной молекулой, моделируют клеточный эффекторный реакции в системе «мать – эмбрион/плод» [16]. Роль молекулы HLA-G в вынашивании беременности, в репродуктивных потерях и в детерминировании ВПС была показана на молекулярно-генетическом уровне [19, 20]. Исследования в этом направлении были нацелены на полиморфный участок гена, кодирующий HLA-G и расположенный в 3'UTR области (*HLA-G3'UTR 14-bp *ins/del*). Этот участок гена детерминирует устойчивость транскрипта к действию РНКаз. Многочисленные исследования показали, что наличие гомозиготности по инсерции (*ins/ins*) приводит к значимому снижению матричной РНК, кодируемой с этого гена, а это, в свою очередь, приводит к дефициту экспрессии самой молекулы HLA-G [19]. Именно дефицитом HLA-G, а не его полиморфизмом, на клетках эмбриона и цитотрофобласта объясняются идиопатические репродуктивные потери, ассоциированные с гомозиготным генотипом *HLA-G 3'UTR*ins/ins* [16, 19, 20]. Собственные исследования показали, что данный материнский и детский генотипы были ассоциированы с ВПС у детей [2]. Тем самым особенности экспрессии HLA-G в материнском микроокружении и в клетках эмбриона могут быть значимыми не только в ограничении иммунного отторжения полуаллогенного эмбриона, но и в развитии, вытекающих из первичного эффекторного иммунного ответа, вторичных провоспалительных реакций. Именно альтерирую-

щий компонент воспаления и является основой для формирования ВПС.

Соответственно, изменять особенности экспрессии HLA-G в материнском микроокружении и в клетках эмбриобласта могут специфические аллогенные и аутогенные антитела. Причем их индивидуальная антигенная специфичность может быть низкой. Интерес к аллогенным антителам против HLA, индуцируемых во время беременности, не стихает с 80-х годов прошлого столетия [13]. Современные исследования на диагностических платформах LUMINEX подтверждают, что более 40% повторнородящих женщин имеют антитела против HLA I и II классов. Причем доказано, что удельный вес женщин, имеющих специфические антитела против отцовских HLA не превышает 20% из всей популяции. Соответственно, из когорты женщин, имеющих антитела к HLA, это будет 50% [18]. При репродуктивных потерях снижается как количество женщин имеющих антитела к HLA I и II классов, так и их специфичность по отношению к отцовским HLA [18]. Неспецифические в отношении отцовских, а значит, и аллогенных эмбриональных HLA антитела не обладают блокирующим эффектом. Они могут быть триггерами в развитии воспалительных реакций в системе «мать – эмбрион/плод» и через это усиливать экспрессию молекул HLA I и II классов.

Надо отметить, что платформа LUMINEX является золотым стандартом для исследований HLA и антител к ним при трансплантации. Гены локуса HLA Ib, как уже говорилось выше, имеют низкий аллельный и антигенный полиморфизм, их продукты фактически не экспрессируются на соматических и иммунокомпетентных клетках организма и поэтому фактически не влияют на трансплантацию. В то же время вполне вероятно, что специфические и/или перекрестно-реагирующие антитела к HLA-G могут вырабатываться и влиять на экспрессию данной молекулы на материнских и эмбриональных клетках, а также связывать растворимые формы sHLA-G.

Настоящее исследование не претендует на изучение ауто- и аллоантител к HLA-DR и HLA-G, так как отсутствует контроль с очищенными антителами и исследование проводилось в прямой иммунофлуоресценции. Для исследования антител в данном формате необходимо проведение непрямой иммунофлуоресценции. Т. е. после первичной инкубации лимфоцитов с сывороткой крови и отмывки их от не связавшихся антител необходима вторичная инкубация с конъюгированными моноклональными антителами к Fc-фрагменту иммуноглобулина G. Именно сопоставление изменений количества клеток (на-

пример, CD3⁺) с флюорисцирующим комплексом HLA-DR⁺ сывороточные антитела к HLA-DR⁺ моноклональное антитело к Fc-фрагменту иммуноглобулина G, конъюгированное с алофикоцианином, в образцах с контрольной (с известной концентрацией анти-HLA-DR антител) и исследуемой сыворотками могло дать полуколичественную характеристику антител к HLA-DR и по аналогии к HLA-G. В настоящем исследовании оценивались блокирующий и стимулирующий эффект аллогенных и аутогенных сывороток. Причем наибольший интерес представляли сыворотки женщин и их эффект в отношении собственных молекул HLA-DR и HLA-G, а также этих молекул на лимфоцитах детей, которых они выносили. Сравнивались эффекты сывороток женщин, имеющих двух и более здоровых детей, а также имеющих детей с ВПС. Оценивались эффекты мужских сывороток по отношению к собственным HLA и эти же эффекты сывороток условно здоровых детей и пациентов с ВПС. Как видно из исследования, блокирующий эффект в отношении ауто-HLA-G, расположенных на мембране как CD3⁺, так и CD3⁻ лимфоцитах, был наиболее выраженный в женской группе сравнения. В группе мужчин этот эффект на исследуемых популяциях лимфоцитов стремился к нулю, а в группе женщин, имеющих детей с ВПС, напротив, был стимулирующим. Между всеми группами получены значимые различия. Блокирования экспрессии собственных HLA-G на CD3⁺ и CD3⁻ лимфоцитах многорожавших женщин вполне вероятно обусловлено аутоантителами к данной молекуле. Стимулирующий эффект по отношению к HLA-G на CD3⁺ и CD3⁻ лимфоцитах женщин, имеющих детей с ВПС, может быть обусловлен, с одной стороны, отсутствием блокирующих аутоантител к данной молекуле, а с другой – наличием в сыворотке крови этих женщин высоко активных липидов [13, 15].

Абсолютно такая же направленность блокирования и стимулирования экспрессии ауто-HLA-DR на CD3⁺ и CD3⁻ лимфоцитах была выявлена для группы сравнения женщин, основной группы и группы мужчин. Причем стремление к нулевому эффекту у мужчин было наиболее наглядным. Исходя из этого, можно констатировать, что в мужской сыворотке нет аутоантител к HLA-DR. Соответственно, у многорожавших женщин эти антитела присутствуют. Механизм их появления не совсем понятен, возможно, что при индукции антиотцовских антител к HLA-DR, образуются и перекрестно-реагирующие антитела к собственным молекулам. Хотя биологический смысл этих перекрестно-реагирующих антител вполне понятен, они, с одной стороны, блокиру-

ют HLA-DR на эмбриональных клетках, а с другой – на клетках материнского микроокружения. Тем самым может иметь место контролируемое ограничение презентации аллоантигенов эмбриона плода. В исследовании показано, что у женщин, имеющих детей с ВПС, аутоантитела к HLA-DR отсутствуют, возможно, из-за ограниченной стимуляции аллогенными HLA-DR. Помимо этого, в сыворотке крови женщин, имеющих детей с ВПС, имеются биологически активные гуморальные факторы, стимулирующие экспрессию HLA-DR на CD3⁺ и CD3⁻ лимфоцитах.

Эффекты аутосывороток условно здоровых детей были схожи с действием мужских аутосывороток. Изменения экспрессии HLA-G на CD3⁺ и CD3⁻ лимфоцитах под воздействием детских сывороток стремились к нулю, что указывает на отсутствие аутоантител к HLA-G. В основной группе детей выраженный стимулирующий эффект аутогенной сыворотки был показан в отношении экспрессии HLA-G на CD3⁻ лимфоцитах. Феномен чувствительности В-лимфоцитов к стимуляции экспрессии HLA-DR и HLA-G описан и ранее [15]. Возможно, что биологически активные липиды и амины могут присутствовать в крови и самих детей с ВПС.

Аллогенная женская (материнская) сыворотка обладает выраженным блокирующим эффектом в отношении HLA-G на CD3⁺ и CD3⁻ лимфоцитах условно здоровых детей, и это указывает на наличие в женской сыворотке крови блокирующих антител не только к аутоHLA-G, но и к HLA-G их детей (в пренатальном периоде – эмбриона/плода). Как уже говорилось выше, молекулы HLA-G обладают низким аллогенным полиморфизмом, поэтому алло- и аутоантитела могут иметь общую специфичность. В то же время в основной группе доминировал стимулирующий эффект аллогенной (материнской) сыворотки, механизм которого обсуждался выше.

Антигенный полиморфизм HLA-DR достаточно выраженный, и беременности стимулируют синтез антиотцовских антител, о чем говорилось выше. Это наглядно продемонстрировано в группе условно здоровых детей, на HLA-DR которых женская (материнская) сыворотка крови влияла блокирующим эффектом. Т. е. в ходе физиологической беременности у женщины сформировались антитела к аллогенным (эмбриональным/плодовым/детским) HLA-DR. Роль этих антител, может быть также в блокировании дополнительных антигенных детерминант. Надо отметить, что аутогенная сыворотка условно здоровых детей, также обладала преимущественно блокирующим эффектом в отношении собственных HLA-DR. Этот феномен требует дальнейше-

го изучения, и объективной оценки аутоантител к HLA-DR.

У детей с ВПС эффекты аутогенных и аллогенных сывороток крови по отношению к изменению экспрессии HLA-DR на CD3⁺ и CD3⁻ лимфоцитах стремился к нулю. Исключением был стимулирующий эффект детской аутогенной сыворотки на CD3⁻ лимфоцитах. Этот феномен может также быть связан с наличием в крови детей с ВПС биологически активных веществ, ко-

торые наибольшее влияние оказывают именно на экспрессию HLA-DR на В-лимфоцитах.

Заключение

Блокирующая активность женской сыворотки по отношению к аллогенным (эмбриона/плода / ребенка) и аутогенным (собственным) молекулам HLA-G и HLA-DR определяет протективный эффект в отношении формирования септальных врожденных пороков сердца у потомства.

Список литературы / References

1. Борисенко Д.В., Ивкин А.А., Шукевич Д.Л. Современные методы ограничения системного воспалительного ответа при коррекции врожденных пороков сердца у детей в условиях искусственного кровообращения // Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний, 2021. Т. 10, № 2. С. 113-124. [Borisenko D.V., Ivkin A.A., Shukevich D.L. Treatment of systemic inflammatory response syndrome following on-pump pediatric congenital heart surgery. *Kompleksnyye problemy serdechno-sosudistykh zabolevaniy = Complex Issues of Cardiovascular Diseases*, 2021, Vol. 10, no. 2, pp. 113-124. (In Russ.)]
2. Деева Н.С., Цепочкина А.В., Шмулевич С.А., Шабалдин А.В. Роль материнских локусов HLA-DR и HLA-G в детерминировании риска формирования спорадических врожденных пороков сердца в последующем поколении // Российский вестник перинатологии и педиатрии, 2021. Т. 66, № 5. С. 42-48. [Deeva N.S., Tsepokina A.V., Shmulevich S.A., Shabaldin A.V. The role of maternal HLA-DR and HLA-G loci in determining the risk of sporadic congenital heart defects in the next generation. *Rossiyskiy Vestnik Perinatologii i Pediatrii = Russian Bulletin of Perinatology and Pediatrics*, 2021, Vol. 66, no. 5, pp. 42-48. (In Russ.)]
3. Есина Е.В., Логина Н.Ю., Аляутдина О.С. Роль иммунных взаимодействий в развитии бесплодия: обзор литературы // Русский медицинский журнал. Мать и дитя, 2013. Т. 21, № 1. С. 44-48. [Esina E.V., Logina N.Yu., Alyautdina O.S. The role of immune interactions in the development of infertility: a review of the literature. *Russkiy meditsinskiy zhurnal. Mat i ditya = Russian Medical Journal. Mother and Child*, 2013, Vol. 21, no. 1, pp. 44-48. (In Russ.)]
4. Лакин Г.Ф. Биометрия. М.: Высшая школа, 1990. 352 с. [Lakin G.F. Biometrics]. Moscow: Vysshaya shkola, 1990. 352 p.
5. Хайтов Р.М., Алексеев Л.П., Кофиади И.А. Роль иммуногенетики в решении фундаментальных и прикладных задач персонализированной медицины // Медицина экстремальных ситуаций, 2016. № 3. С. 9-24. [Khaitov R.M., Alexeev L.P., Kofiadi I.A. Role of immunogenetics in addressing fundamental and applied tasks of personalized medicine. *Meditsina ekstremalnykh situatsiy = Medicine of Extreme Situations*, 2016, no. 3, pp. 9-24. (In Russ.)]
6. Шабалдин А.В., Гривцова С.В., Деева Н.С., Шмулевич С.А., Цепочкина А.В., Аникеенко А.А., Шабалдина Е.В., Вавин Г.В. Изменение экспрессии HLA-DR на субпопуляциях лимфоцитов супругов, имеющих детей со спорадическими врожденными пороками сердца без хромосомных заболеваний, под воздействием женской аутосыворотки // Медицинская иммунология, 2021. Т. 23, № 1. С. 143-148. [Shabaldin A.V., Grivtsova S.V., Deeva N.S., Shmulevich S.A., Tsepokina A.V., Anikeenko A.A., Shabaldina E.V., Vavin G.V. Changes in the expression of HLA-DR on lymphocyte subpopulations of spouses having children with sporadic congenital heart defects without chromosomal diseases, under the influence of female's autoserum. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2021, Vol. 23, no. 1, pp. 143-148. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-CIT-2013.
7. Шабалдин А.В., Шмулевич С.А., Чистякова Г.Н., Ремизова И.И., Лукоянычева Е.Б., Горшкова С.В., Шабалдина Е.В. Особенности аллогенных взаимодействий в краткосрочной культуре лимфоцитов супругов, имеющих детей с врожденными пороками сердца или ранние репродуктивные потери // Медицинская иммунология, 2019. Т. 21, № 2. С. 279-292. [Shabaldin A.V., Shmulevich S.A., Chistyakova G.N., Remizova I.I., Lukoyanicheva E.B., Gorshkova S.V., Shabaldina E.V. Peculiarities of allogenic interactions in the short-term culture of lymphocytes of spouses who have children with congenital heart diseases or early reproductive losses. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2019, Vol. 21, no. 2, pp. 279-292. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2019-2-279-292.
8. Шабалдин А.В., Цепочкина А.В., Долгих О.В., Шабалдина Е.В., Понасенко А.В. Сочетание аллелей HLA-DRB1 как условие реализации риска формирования спорадических врожденных пороков сердца и врожденных пороков развития плода без хромосомных заболеваний // Анализ риска здоровью, 2021. № 1. С. 133-142. [Shabaldin A.V., Tsepokina A.V., Dolgikh O.V., Shabaldina E.V., Ponasenko A.V. Combination of HLA-DRB1 alleles as a factor causing risks of sporadic congenital heart defects and congenital malformations without chromosome diseases. *Analiz riska zdorov'yu = Health Risk Analysis*, 2021, no. 1, pp. 133-142. (In Russ.)]

9. Шабалдин А.В., Деева Н.С., Сухих А.С., Вавин Г.В., Крюков П.М. Изменение экспрессии мембранных молекул HLA-G у женщин, имеющих детей с врожденными пороками сердца, под воздействием фракции гамма-глобулинов, полученной из плазмы крови многорожавших женщин // Российский иммунологический журнал, 2021. Т. 24, № 3. С. 373-376. [Shabal'din A.V., Deeva N.S., Sukhikh A.S., Vavin G.V., Kryukov P.M. Altered expression of cell membrane HLA-G molecules in mothers of children with inborn heart defects upon exposure to plasma gamma-globulin from multiparous women. *Rossiyskiy immunologicheskiy zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2021, Vol. 24, no. 3, pp. 373-376. (In Russ.)]
10. Bradshaw E.A. Screening for critical congenital heart disease: advancing detection in the newborn. *Curr. Opin. Pediatr.*, 2012, Vol. 24, no. 5, pp. 603-608.
11. Chadha S., Behl T., Bungau S., Kumar A., Arora R., Gupta A., Uddin M.S., Zengin G., Aleya L., Setia D., Arora S. Mechanistic insights into the role of pyroptosis in rheumatoid arthritis. *Curr. Res. Transl. Med.*, 2020, Vol. 68, no. 4, pp. 151-158.
12. Chen L., Guan J., Wei Q., Yuan Z., Zhang M. Potential role of "omics" technique in prenatal diagnosis of congenital heart defects. *Clin. Chim. Acta*, 2018, Vol. 482, pp. 185-190.
13. Densmore T.L., Tim Goodnough L., Ali S., Dynis M., Chaplin H. Prevalence of HLA sensitization in female apheresis donors. *Transfusion*, 1999, Vol. 39, no. 1, pp. 103-106.
14. European Platform on Rare Disease Registration. Prevalence charts and tables. Available at: https://eu-rd-platform.jrc.ec.europa.eu/eurocat/eurocat-data/prevalence_en.
15. Mulder A., Kardol M.J., Kamp J., Uit Het Broek C., Schreuder G.M., Doxiadis I.I., Claas F.H. Determination of the frequency of HLA antibody secreting B-lymphocytes in alloantigen sensitized individuals. *Clin. Exp. Immunol.*, 2021, Vol. 124, no. 1, pp. 9-15.
16. Nilsson L.L., Djuricic S., Hviid T.V.F. Controlling the immunological crosstalk during conception and pregnancy: HLA-G in reproduction. *Front. Immunol.*, 2014, Vol. 5, 198. doi: 10.3389/fimmu.2014.00198.
17. Persson G., Jørgensen N., Nilsson L.L., Andersen L.H.J., Hviid T.V.F. A role for both HLA-F and HLA-G in reproduction and during pregnancy? *Hum. Immunol.*, 2020, Vol. 81, no. 4, pp. 127-133.
18. Prieto-Casal F., Cabañas-Gadea C., Figueredo-López S., Villagra-Carrón V. Fetomaternal immunization against HLA antigens in women from a Paraguayan population. *Mem. Inst. Investig. Cienc. Salud*, 2021, Vol. 19, no. 1, pp. 48-57. [In Spanish]
19. Wang X., Jiang W., Zhang D. Association of 14-bp insertion/deletion polymorphism of HLA-G gene with unexplained recurrent spontaneous abortion: a meta-analysis. *Tissue Antigens*, 2013, Vol. 81, no. 2, pp. 108-115.
20. Xue S., Yang J., Yao F., Xu L., Fan L. Recurrent spontaneous abortions patients have more -14 bp/+14 bp heterozygotes in the 3'UT region of the HLA-G gene in a Chinese Han population. *Tissue Antigens*, 2007, Vol. 69, no. 1, pp. 153-155.

Авторы:

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

Синицкая А.В. — к.б.н., научный сотрудник лаборатории геномной медицины отдела экспериментальной медицины ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», г. Кемерово, Россия

Authors:

Shabal'din A.V., PhD, MD (Medicine), Associate Professor, Leading Research Associate, Laboratory of Heart Diseases, Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases, Kemerovo, Russian Federation

Sinitskaya A.V., PhD (Biology), Research Associate, Laboratory of Genomic Medicine, Department of Experimental Medicine, Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases, Kemerovo, Russian Federation

Шмелевич С.А. — к.м.н., детский кардиолог
кардиохирургического отделения ФГБНУ «Научно-
исследовательский институт комплексных проблем
сердечно-сосудистых заболеваний», г. Кемерово, Россия

Гришачева Е.О. — клинический ординатор ФГБНУ
«Научно-исследовательский институт комплексных
проблем сердечно-сосудистых заболеваний»,
г. Кемерово, Россия

Shmulevich S.A., PhD (Medicine), Pediatric Cardiologist,
Cardiac Surgery Department, Research Institute for Complex
Issues of Cardiovascular Diseases, Kemerovo, Russian
Federation

Grishacheva E.O., Clinical Resident, Research Institute
for Complex Issues of Cardiovascular Diseases, Kemerovo,
Russian Federation

Поступила 18.11.2022
Отправлена на доработку 12.12.2022
Принята к печати 16.02.2023

Received 18.11.2022
Revision received 12.12.2022
Accepted 16.02.2023

ВЛИЯНИЕ ВНУТРИВЕННЫХ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ НА НЕГАТИВНО ТРАНСФОРМИРОВАННЫЕ СУБПОПУЛЯЦИИ НЕЙТРОФИЛЬНЫХ ГРАНУЛОЦИТОВ НОВОРОЖДЕННЫХ С ВРОЖДЕННОЙ ПНЕВМОНИЕЙ И НЕОНАТАЛЬНЫМ СЕПСИСОМ

Нестерова И.В.^{1, 2}, Ковалева С.В.¹, Чудилова Г.А.¹, Ломтатидзе Л.В.¹, Смерчинская Т.В.³, Чапурина В.Н.¹

¹ ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Краснодар, Россия

² ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы», Москва, Россия

³ ГБУЗ «Детская краевая клиническая больница» Министерства здравоохранения Краснодарского края, г. Краснодар, Россия

Резюме. На сегодняшний день остаются сложными задачами диагностика и лечение тяжелых инфекционно-воспалительных заболеваний у новорожденных – врожденной пневмонии (ВП) и неонатального сепсиса (НС). Поиск чувствительных и специфичных диагностических маркеров тяжести бактериального воспалительного процесса, раннее и эффективное лечение имеют решающее значение для исхода и прогноза данных жизнеугрожающих заболеваний. Цель исследования – изучение влияния внутривенных иммуноглобулинов (ВВИГ) на негативно трансформированные субпопуляции нейтрофильных гранулоцитов (НГ) CD64⁺CD16⁺CD32⁺CD11b⁺, CD64⁺CD16⁺CD32⁺CD11b⁺ и их функциональную активность у новорожденных с ВП и НС. Под наблюдением находилось 38 доношенных новорожденных. В группу 1 вошли 19 новорожденных с (ВП), из них 11 детей, получивших традиционную терапию и ВВИГ (группа 1.1), и 8 детей, находящихся на традиционной терапии (группа 1.2). В группу 2 вошли 19 детей с НС, из них 12 детей, получивших традиционную терапию и ВВИГ (группа 2.1), и 7 детей, находящихся на традиционной терапии (группа 2.2). Группа сравнения – 22 здоровых доношенных новорожденных. Тестирование системы НГ включало: определение методом проточной цитометрии количества субпопуляций НГ, одномоментно экспрессирующих CD11b CD64, CD32, CD16, и их фенотипических особенностей с учетом плотности экспрессии рецепторов (MFI); оценку фагоцитарной и микробицидной активности НГ. Установлена негатив-

Адрес для переписки:

Нестерова Ирина Вадимовна
ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов»
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
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, С.В. Ковалева, Г.А. Чудилова, Л.В. Ломтатидзе, Т.В. Смерчинская, В.Н. Чапурина «Влияние внутривенных иммуноглобулинов на негативно трансформированные субпопуляции нейтрофильных гранулоцитов новорожденных с врожденной пневмонией и неонатальным сепсисом» // Медицинская иммунология, 2024. Т. 26, № 1. С. 107-120. doi: 10.15789/1563-0625-EOI-2597

© Нестерова И.В. и соавт., 2023

Эта статья распространяется по лицензии Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

I.V. Nesterova, S.V. Kovaleva, G.A. Chudilova, L.V. Lomtadidze, T.V. Smerchinskaya, V.N. Chapurina “Effects of intravenous immunoglobulin on the negatively transformed subpopulations of neutrophilic granulocytes in newborns with congenital pneumonia and neonatal sepsis”, *Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2024, Vol. 26, no. 1, pp. 107-120.

doi: 10.15789/1563-0625-EOI-2597

© Nesterova I.V. et al., 2023

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

DOI: 10.15789/1563-0625-EOI-2597

ная трансформация субпопуляций CD64⁺CD16⁺CD32⁺CD11b⁺НГ и CD64⁺CD16⁺CD32⁺CD11b⁺НГ при ВП и НС с наибольшей диагностической значимостью увеличения содержания субпопуляции CD64⁺CD16⁺CD32⁺CD11b⁺НГ по мере прогрессирования тяжести бактериального инфекционно-воспалительного процесса – при ВП в 18,7 раза, при НС в 52,3 раза, а также преобладающим снижением экспрессии мембранных рецепторов. Данные изменения фенотипа были сопряжены с нарушением фагоцитарной и киллинговой активности НГ. Эффект влияния ВВИГ на наиболее нарушенные механизмы антибактериального иммунитета связан не только с уменьшением дефицита IgG, но и с позитивным ремоделированием негативно трансформированных субпопуляций CD64⁺CD16⁺CD32⁺CD11b⁺НГ и CD64⁺CD16⁺CD32⁺CD11b⁺НГ, улучшением эффекторных функций НГ, особенно при ВП. Так, после лечения ВВИГ сниженное количество субпопуляции CD64⁺CD16⁺CD32⁺CD11b⁺НГ полностью восстановилось при ВП, а при НС увеличилось в 1,5 раза, а количество диагностически значимой субпопуляции CD64⁺CD16⁺CD32⁺CD11b⁺НГ значительно снизилось как при ВП (в 2 раза), так и при НС (в 2,6 раза), оставаясь выше содержания данной субпопуляции у здоровых новорожденных. Одновременно отмечалось восстановление или модулирующий характер изменений плотности экспрессии триггерных молекул в субпопуляциях НГ. Лимитирование негативной трансформации функционально-значимых субпопуляций НГ у новорожденных с ВП и НС сопровождалось позитивными клиническими эффектами – оптимизацией антибактериальной терапии, уменьшением длительности лечения, улучшением показателя летальности.

Ключевые слова: нейтрофильные гранулоциты, фенотип, дисфункции, врожденная пневмония, неонатальный сепсис, внутривенные иммуноглобулины

EFFECTS OF INTRAVENOUS IMMUNOGLOBULIN ON THE NEGATIVELY TRANSFORMED SUBPOPULATIONS OF NEUTROPHILIC GRANULOCYTES IN NEWBORNS WITH CONGENITAL PNEUMONIA AND NEONATAL SEPSIS

Nesterova I.V.^{a,b}, Kovaleva S.V.^a, Chudilova G.A.^a, Lomtadze L.V.^a, Smerchinskaya T.V.^c, Chapurina V.N.^a

^a Kuban State Medical University, Krasnodar, Russian Federation

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

^c Children's Regional Clinical Hospital, Krasnodar, Russian Federation

Abstract. Today, the diagnosis and treatment of severe infectious and inflammatory diseases in newborns, e.g., congenital pneumonia (CP) and neonatal sepsis (NS), present difficult problems. Searching sensitive and specific severity markers of bacterial inflammatory process as well as early and effective treatment are crucial for the outcome and prognosis of these life-threatening diseases. The aim of our study was to assess the effects of intravenous immunoglobulin (IVIG) injections on the negatively transformed subpopulations of neutrophilic granulocytes (NG) CD64⁺CD16⁺CD32⁺CD11b⁺, CD64⁺CD16⁺CD32⁺CD11b⁺ and evaluation of their functional activity in newborns with CP and NS. We have observed 38 full-term newborn patients. Group 1 included 19 infants with CP, including 11 children who received conventional therapy and IVIG (group 1.1), and 8 children treated at conventional protocols (group 1.2). Group 2 included 19 children with NS, including 12 children who underwent conventional therapy and IVIG treatment (group 2.1), and 7 children who were subject to conventional therapy (group 2.2). The comparison group consisted of 22 healthy full-term newborns. Testing of NG population included the following parameters: counting the numbers of NG subpopulations which simultaneously expressed CD11b CD64, CD32, CD16, as well as their phenotypic patterns, with regard of the receptor expression density (MFI) using flow cytometric techniques. Moreover, we determined phagocytic and microbicidal activity of the granulocytes. We have revealed negative transformation of CD64⁺CD16⁺CD32⁺CD11b⁺ and CD64⁺CD16⁺CD32⁺CD11b⁺ subpopulations of neutrophilic granulocytes in newborns with CP and NS, The diagnostic significance of increased CD64⁺CD16⁺CD32⁺CD11b⁺NG subpopulation was more pronounced with increasing severity of bacterial infection and inflammatory

process, i.e., 18.7-fold in CP, 52.3-fold in NS, along with predominant decrease in expression of appropriate membrane receptors. These phenotypic changes were associated with impaired phagocytic and killing activity of NG. The effect of IVIG on the impaired mechanisms of antibacterial immunity is associated not only with alleviation of IgG deficiency, but also with positive remodeling of negatively transformed subpopulations of CD64⁺CD16⁺CD32⁺CD11b⁺NG and CD64⁺CD16⁺CD32⁺CD11b⁺NG, improved effector functions of NG, especially in cases of CP. Thus, following IVIG treatment, a reduced number of CD64⁺CD16⁺CD32⁺CD11b⁺NG subpopulations was fully recovered in CP, while it increased 1.5 times in NS, and the content of diagnostically significant CD64⁺CD16⁺CD32⁺CD11b⁺NG subpopulation showed a significantly decrease, both in CP (2-fold) and in NS (2.6-fold). However, this index remained higher than the content of this subpopulation in healthy newborns. At the same time, we have noted the restorative or modulatory effects by changing density of trigger molecules in NG subpopulations. Limitation of the negative NG transformation in their functionally significant subpopulations in newborns with CAP and NS was accompanied by positive clinical effects, i.e., optimization of antibiotic therapy, reduced duration of treatment, and improved mortality rates.

Keywords: neutrophilic granulocytes, phenotype, dysfunctions, congenital pneumonia, neonatal sepsis, intravenous immunoglobulins

Исследование выполнено в рамках государственного задания Министерства здравоохранения Российской Федерации № 121031000071-4.

Введение

Ведущее место в структуре заболеваемости новорожденных в Российской Федерации и за рубежом занимают такие тяжелые бактериальные инфекционные болезни как неонатальный сепсис (НС) и врожденная пневмония (ВП). Оптимизация диагностических и лечебных подходов, использование современных технологий выхаживания доношенных и недоношенных новорожденных улучшили выживаемость, но тем не менее летальность при тяжелых бактериальных инфекциях по-прежнему высока – при ВП составляет от 10% до 38% [8, 14], а при НС – от 20% до 80% [8, 11, 25].

Ведущее значение при тяжелых бактериальных локальных (ВП) и генерализованных (НС) заболеваниях принадлежит синдрому системного воспалительного ответа (ССВО) с вовлечением в патологический процесс различных органов и систем, в том числе развитием дисрегуляции иммунной системы [7, 22]. Гиперэргический вариант характеризуется значительной активацией врожденного иммунитета, вызванной повышенным синтезом провоспалительных цитокинов, в то время как гипоэргический вариант характеризуется дефектным или неадекватным ответом иммунной системы на инфекционный процесс и является прогностически более неблагоприятным [1, 2, 4, 9, 10, 13, 19, 24, 26, 27, 29]. Использование в лечебной тактике неадекватной антибактериальной терапии и отсутствие коррекции дисфункций иммунной системы может привести к смене гиперэргического варианта иммунных нарушений на гипоэргический вариант [3, 13].

Противовоспалительная направленность иммунного ответа, регистрируемая в более поздние

сроки развития инфекционно-воспалительного процесса, связана с активацией эффекторных механизмов адаптивного иммунитета и синтезом противовоспалительных цитокинов (IL-10, IL-4), что приводит к элиминации патогенов, прекращению бактериемии и разрешению очагов воспаления [7, 19].

Функциональная некомпетентность иммунной системы новорожденных, антенатальные и интранатальные инфекционные риски способствуют повышенной восприимчивости к патогенам и усугублению дисрегуляции иммунной системы [9, 15] вплоть до развития так называемого «иммунологического паралича» – отсутствия ответа иммунной системы, что нарушает клиренс патогенов и их токсинов и приводит к полиорганной недостаточности (дисфункции трех и более систем организма), с высокой вероятностью летального исхода [17, 19, 21, 23, 27, 28].

В клинической картине НС могут встречаться случаи наличия единичного очага инфекции или сочетания нескольких очагов. В то же время в 100% случаев НС у детей различного гестационного возраста сопровождается полиорганной недостаточностью [11], что увеличивает риск летальных исходов [12]. При этом наиболее значимыми клинико-лабораторными предикторами летального исхода при НС являются кома, высокий уровень лактата в крови и тяжелая тромбоцитопения [12]. Клиническая симптоматика ВП полиморфна и характеризуется дыхательной недостаточностью разной степени выраженности, интоксикационным синдромом, повреждением различных систем организма (нервной, сердечно-сосудистой, пищеварительной и т. д.), токсико-метаболическими нарушениями [18].

Лечение ВП и НС сопряжено с рядом сложностей как на диагностическом этапе – оценка и прогнозирование инфекционных рисков, верификация нередко проблемных возбудителей, обладающих резистентностью к широкому спек-

тру антибактериальных препаратов, полиморфизм клинической симптоматики, отсутствие надежных лабораторных ориентиров, свидетельствующих о прогрессировании бактериального процесса и усугублении тяжести течения заболевания, так и на этапе выбора терапевтической тактики. Традиционно лечение ВП и НС включает антибактериальную (этиотропную) терапию, патогенетическую терапию и симптоматическую терапию для создания оптимальных условий адаптации новорожденных [9, 10, 13], которое не всегда приводит к достижению ожидаемого позитивного эффекта в более ранние сроки и не учитывает имеющейся дисрегуляции иммунной системы, что обосновывает необходимость использования иммунотерапевтических стратегий.

В клинической практике для реставрации механизмов антибактериального иммунитета и, в первую очередь, дефицита IgG, при ВП и НС показаны и успешно использовались ВВИГ [11, 13]. Тем не менее работа по изучению влияния ВВИГ на фенотип субпопуляций НГ, непосредственно отвечающих за функциональный потенциал клеток, не проводилась. Вместе с тем при воспалении может быстро происходить изменение плотности экспрессии молекул (CD11b, CD64, CD32, CD16) – триггеров биоцидности НГ, способных инициировать фагоцитоз, антителозависимую цитотоксичность (АЗКЦ), образование активных форм кислорода и NET [6, 16].

В связи с изложенным выявление изменений содержания и фенотипа субпопуляций НГ новорожденных при локальных генерализованных инфекционно-воспалительных процессах вызывает определенный интерес как с диагностической точки зрения, так и с целью оценки возможности реставрации фенотипа субпопуляций НГ и коррекции дисфункций НГ.

Целью исследования явилось изучение влияния внутривенных иммуноглобулинов на негативно трансформированные субпопуляции НГ CD64⁺CD16⁺CD32⁺CD11b⁺, CD64⁺CD16⁺CD32⁺CD11b⁺ и их функциональную активность у новорожденных с врожденной пневмонией и неонатальным сепсисом.

Материалы и методы

Исследование проводилось на базе ГБУЗ ДККБ (г. Краснодар). Под наблюдением находилось 60 доношенных новорожденных (27 девочек, 33 мальчика), родившихся с весом 2700–4050 г. Сформированы группы исследования с учетом нозологии и лечебной тактики.

Группа 1 – новорожденные дети с врожденной пневмонией (ВП) тяжелого течения до лечения, n = 19.

Группа 1.1 – новорожденные с ВП тяжелого течения весом 2700–4050 г, получавшие традиционную терапию и ВВИГ, n = 11.

Группа 1.2 – новорожденные с ВП тяжелого течения весом 2800–4000 г, в лечении которых применялась только традиционная терапия, n = 8.

Группа 2 – новорожденные дети с неонатальным сепсисом (НС) до лечения, n = 19.

Группа 2.1 – новорожденные с НС весом 2800–3800 г, получавших комплексное лечение с включением традиционной терапии и ВВИГ, n = 12.

Группа 2.2 – новорожденные с НС весом 2900–4000 г, получавших только традиционную терапию, n = 7.

Группа сравнения – здоровые доношенные новорожденные (n = 22, 10 девочек, 12 мальчиков) 3–7 суток жизни.

Оценка иммунологических параметров проводилась при поступлении на лечение и перед переводом из отделения реанимации и интенсивной терапии. Клинический эффект оценивался при выписке пациентов по следующим критериям: частота курсов антибактериальной терапии, необходимость и длительность респираторной поддержки, сроки госпитализации, летальность.

В периферической крови определяли «процент НГ субпопуляций CD64⁺CD32⁺CD16⁺CD11b⁺, CD64⁺CD32⁺CD16⁺CD11b⁺ (FC 500, Beckman Coulter, США); оценивали плотность экспрессии рецепторов по MFI» [5].

«Фагоцитарную активность НГ» оценивали по показателям содержания активно фагоцитирующих НГ (%ФАН, ФАН абс.); фагоцитарное число (ФЧ), фагоцитарный индекс (ФИ) – для характеристики процессов захвата *S. aureus* (штамм 209); процент переваривания (%П) и индекс переваривания (ИП)» для оценки завершенности фагоцитарного акта» [5]. Методом ИФА определяли уровень сывороточных IgA, IgM, IgG (Labsystems Multiskan Ascent, Финляндия, тест-системы ЗАО «Вектор-Бест», Россия).

Математическую обработку полученных результатов проводили с помощью программ Microsoft Excel 2016 и StatPlus 2010. После оценки нормальности распределения лабораторных показателей применялись непараметрические статистические критерии Вилкоксона–Манна–Уитни: в виде медианы и квартилей – Me (Q_{0,25}–Q_{0,75}). Статистически значимые различия определяли при p < 0,05.

Результаты

Диагностический поиск факторов риска развития тяжелой локальной и генерализованной инфекционно-воспалительной патологии у новорожденных показал, что по данным анамнеза 2/3

матерей детей с ВП и НС имели критериальные признаки иммунокомпрометированности, ассоциированные с инфекционными заболеваниями – острыми инфекционными заболеваниями респираторного тракта, обострением хронических инфекционно-воспалительных заболеваний различной локализации во время беременности. Лабораторными иммунологическими критериями иммунокомпрометированности у новорожденных с ВП и НС явились повреждения механизмов антибактериального иммунитета, в частности дефицит IgG, что соотносится с уже известными ранее данными [9, 13]. Наряду с этим к нарушениям антибактериальной иммунной защиты при ВП и НС относят количественные и функциональные дефекты НГ, приводящие к снижению бактериального клиренса [3, 6].

Выявлено, что в ПК здоровых новорожденных циркулируют две субпопуляции, среди которых преобладает субпопуляция – CD64⁺CD16⁺CD32⁺CD11b⁺НГ (96,5 (94,85-97,6) %) с высокой плотностью экспрессии по MFI CD16 и низкой – CD32, CD11b и субпопуляция CD64⁺CD16⁺CD32⁺CD11b⁺НГ (1,3 (1,0-2,6) %) с высокой плотностью экспрессии CD16 и низкой CD64, CD32 и CD11b молекул. Представленные субпопуляции НГ участвуют в осуществлении адекватных антигенной нагрузке для детей данного возраста эффекторных функций НГ, прежде всего фагоцитоза, и элиминации патогенов.

У новорожденных с ВП и НС установлено изменение субпопуляционного состава и фенотипа НГ. У новорожденных детей наблюдалось негативное изменение соотношения исследуемых субпопуляций НГ. Отмечалось уменьшение доли CD64⁺CD16⁺CD32⁺CD11b⁺НГ в 1,2 раза ($p < 0,05$) при ВП и в 1,9 раза при НС ($p < 0,05$) по отношению к показателям здоровых новорожденных. Наибольшую диагностическую значимость приобрело ярко выраженное многократное количественное увеличение CD64⁺CD16⁺CD32⁺CD11b⁺НГ: в 18,7 раза при ВП ($p < 0,05$) и в 52,3 раза при НС ($p < 0,05$), что может служить критерием тяжести и прогрессирования бактериального процесса, а также неблагоприятного исхода вследствие нарушения эффекторного потенциала НГ. Так, дисфункции НГ, ассоциированные с негативной перестройкой фенотипа субпопуляций НГ и их представленностью в ПК новорожденных с ВП, связаны с дефектом их фагоцитарной и микробицидной активности – снижением фагоцитирующих НГ (ФАН), разобщением поглотительной и киллинговой способностей вследствие усиления захвата бактериального антигена. При НС дисрегуляция функциональной активности НГ, сопровождающаяся их негативной фенотипической трансформацией, выражалась количественным

дефицитом ФАН и при этом поглотительные и переваривающие возможности этих клеток были чрезмерно активированы, что свидетельствует об агрессивном потенциале НГ при генерализованном гнойно-воспалительном процессе.

Несомненный интерес представляет поиск возможности ремоделирования негативно измененных субпопуляций НГ (CD64⁺CD16⁺CD32⁺CD11b⁺ и CD64⁺CD16⁺CD32⁺CD11b⁺) и восстановления функциональной активности НГ при ВП и НС.

Нашими исследованиями показано влияние ВВИГ на ремоделирование негативно трансформированных субпопуляций CD64⁺CD16⁺CD32⁺CD11b⁺НГ и CD64⁺CD16⁺CD32⁺CD11b⁺НГ, ассоциированное с восстановлением функциональной активности НГ, при ВП и НС. ВВИГ, содержащие IgG, вводились внутривенно капельно в рекомендованной инструкцией суточной дозе через 24 часа течение 3 дней.

После лечения с применением ВВИГ в группе 1.1 новорожденных с ВП отмечалось восстановление до уровня здоровых новорожденных содержания CD64⁺CD16⁺CD32⁺CD11b⁺НГ. Уровни экспрессии CD16 и CD32 были сопоставимы с показателями здоровых новорожденных, а MFI CD11b уменьшилась в 1,2 раза, оставаясь выше значений группы сравнения ($p < 0,05$) (рис. 1).

В группе 1.2 детей, не получавших ВВИГ, оставалось сниженным количество CD64⁺CD16⁺CD32⁺CD11b⁺НГ, MFI CD11b уменьшался в 1,4 раза до показателей группы сравнения ($p > 0,05$), а уровень экспрессии CD32 и CD16 практически не менялся (рис. 1).

После лечения ВВИГ в группе 1.1 отмечалось снижение в 2 раза содержания диагностически значимой субпопуляции CD64⁺CD16⁺CD32⁺CD11b⁺НГ ($p < 0,05$). Переоснащение поверхностной мембраны НГ этой минорной субпопуляции связано с восстановлением сниженной до лечения MFI CD64, и повышенной до лечения MFI CD32 ($p_1 > 0,05$, $p_2 > 0,05$). Плотность экспрессии CD11b уменьшилась в 1,4 раза, но полностью не восстановилась. Изменение плотности экспрессии MFI CD16 было в пределах группы сравнения ($p < 0,05$) (рис. 2).

В группе 1.2 новорожденных с ВП, не получавших ВВИГ, количество диагностически значимой субпопуляции CD64⁺CD16⁺CD32⁺CD11b⁺НГ не менялось по отношению к показателям группы 1.2 до лечения и было выше значений группы сравнения ($p_{1-2} < 0,05$). Отмечалось снижение MFI CD11b до значений, превышающих показатели группы сравнения (34,7 (31,2-49,1), против 23,4 (20,0-27,5) в группе сравнения, $p < 0,05$) (рис. 2).

Таким образом, под влиянием иммунотерапии ВВИГ при ВП происходит позитивное ремодели-

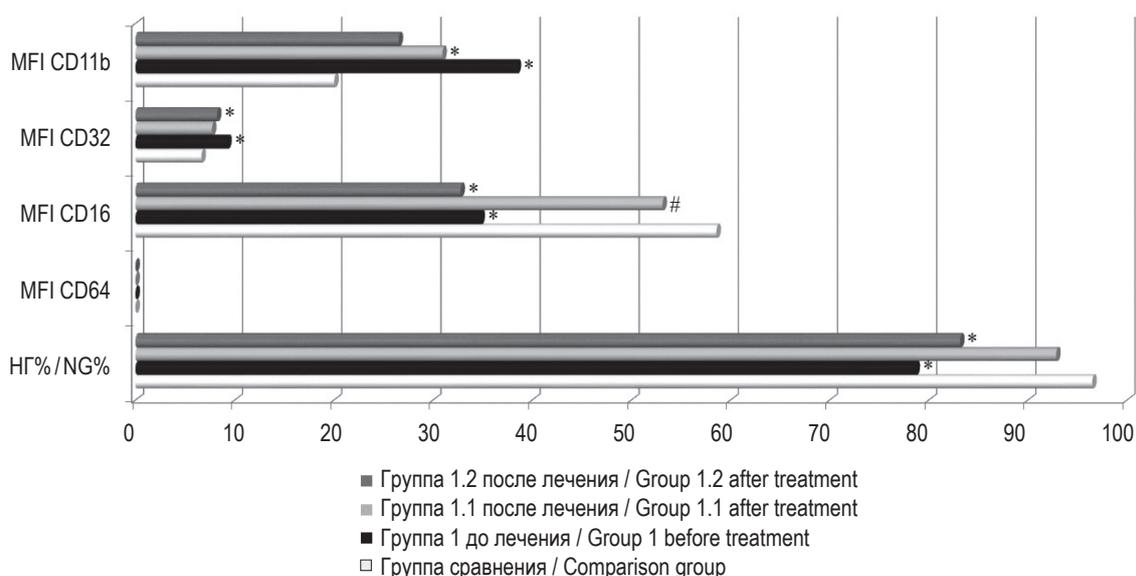


Рисунок 1. Эффекты влияния внутривенных иммуноглобулинов на негативно трансформированную субпопуляцию CD64⁺CD16⁺CD32⁺CD11b⁺ нейтрофильных гранулоцитов при врожденной пневмонии
Примечание. * – статистически значимые различия по отношению к группе сравнения ($p < 0,05$); # – статистически значимые различия показателей группы 1 до и после лечения ($p < 0,05$).

Figure 1. Effects of intravenous immunoglobulins on negatively transformed CD64⁺CD16⁺CD32⁺CD11b⁺ neutrophilic granulocyte subpopulation in congenital pneumonia

Note. *, statistically significant differences in relation to the comparison group ($p < 0.05$); #, statistically significant differences in the parameters of group 1 before and after treatment ($p < 0.05$).

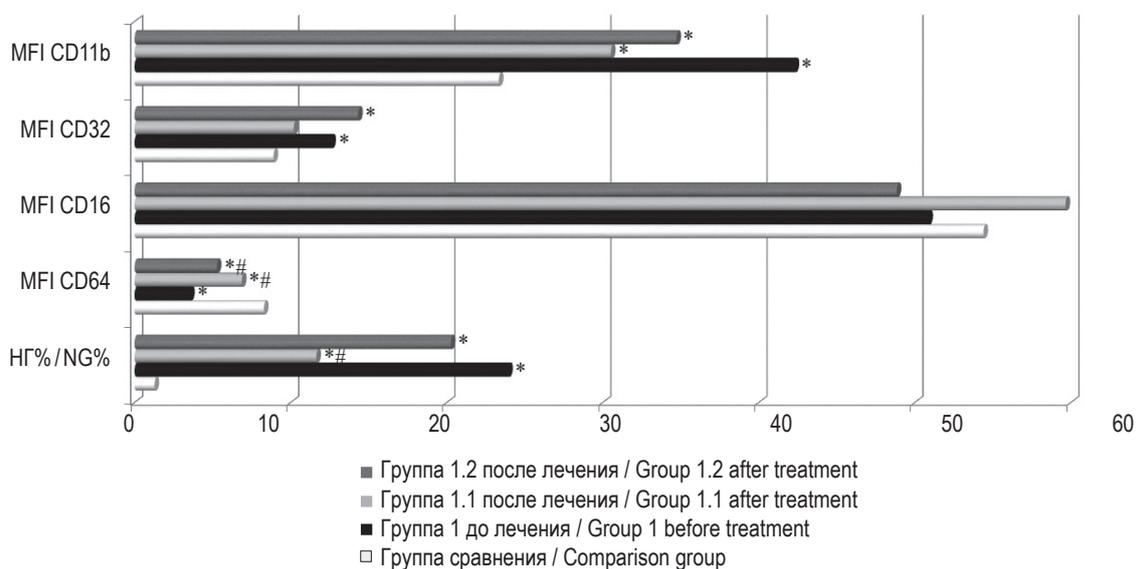


Рисунок 2. Эффекты влияния внутривенных иммуноглобулинов на негативно трансформированную субпопуляцию CD64⁺CD16⁺CD32⁺CD11b⁺ нейтрофильных гранулоцитов при врожденной пневмонии
Примечание. * – статистически значимые различия по отношению к группе сравнения ($p < 0,05$); # – статистически значимые различия показателей группы 1 до и после лечения ($p < 0,05$).

Figure 2. Effects of intravenous immunoglobulins on negatively transformed CD64⁺CD16⁺CD32⁺CD11b⁺ neutrophilic granulocyte subpopulation in congenital pneumonia

Note. *, statistically significant differences in relation to the comparison group ($p < 0.05$); #, statistically significant differences in the parameters of group 1 before and after treatment ($p < 0.05$).

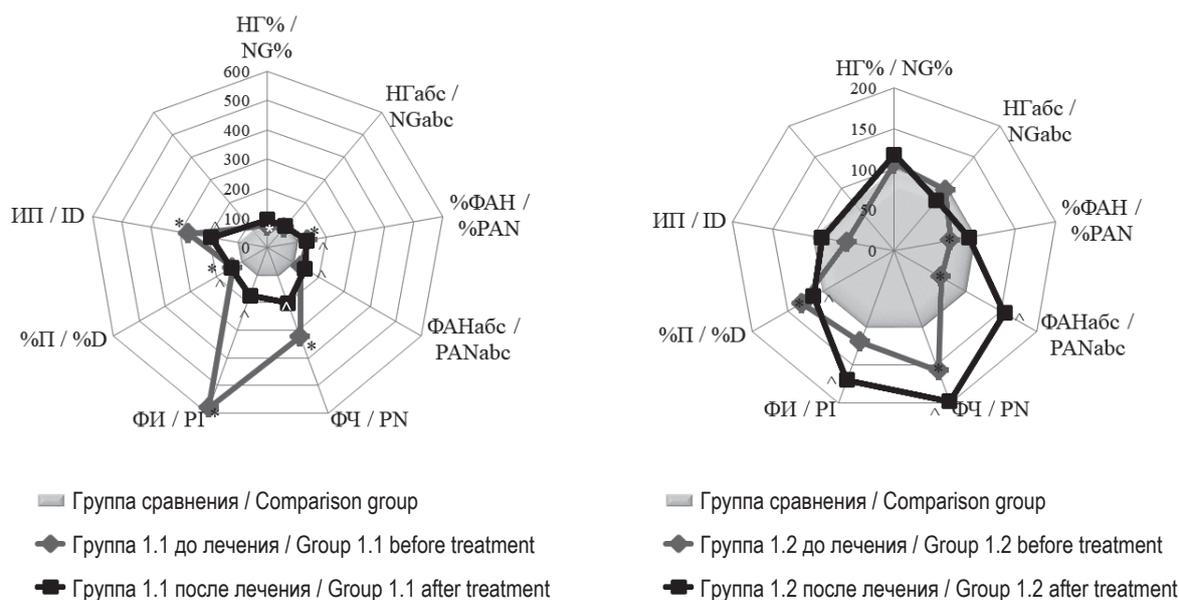


Рисунок 3. Изменение функциональной активности нейтрофильных гранулоцитов у новорожденных детей с врожденной пневмонией под влиянием внутривенных иммуноглобулинов (процент от группы сравнения)

Примечание. * – статистически значимые различия показателей группы 1.1 и группы 1.2 до лечения по отношению к группе сравнения ($p < 0,05$); ^ – статистически значимые различия показателей группы 1.1 и группы 1.2 после лечения по отношению к группе сравнения ($p < 0,05$).

Figure 3. Changes in the functional activity of neutrophilic granulocytes in newborns with congenital pneumonia under the influence of intravenous immunoglobulins (percentage of the comparison group)

Note. *, statistically significant differences in the indicators of group 1.1 and group 1.2 before treatment in relation to the comparison group ($p < 0.05$); ^, statistically significant differences in the indicators of group 1.1 and group 1.2 after treatment in relation to the comparison group ($p < 0.05$).

рование негативно трансформированных фенотипов субпопуляций НГ ($CD64^+CD16^+CD32^+CD11b^+$ и $CD64^+CD16^+CD32^+CD11b^+$) за счет более значимого восстановления как количественного соотношения субпопуляций НГ, так и мембранной экспрессии функционально-значимых рецепторов по сравнению с новорожденными с ВП, не получавшими ВВИГ. Данные фенотипические изменения НГ у новорожденных с ВП (группа 1.1) тесно ассоциированы с улучшением их функциональной активности с последующим клиренсом патогенов и регрессом воспаления, что сопровождается более выраженным клиническим эффектом.

Иммунозаместительная и иммуномодулирующая терапия ВП у новорожденных группы 1.1 способствовала сохранению в ПК на высоком уровне %ФАН (71,1 (64,2-76,9) % против 53,2 (51,2-57,3) % в группе сравнения, $p < 0,05$), ФАН абс. (3,4 (2,2-4,6) г/л против 2,3 (2,3-2,9) г/л в группе сравнения, $p < 0,05$), способности НГ к захвату бактериального антигена – ФЧ 5,5 (5,4-7,4), ФИ – до 2,4 (2,3-4,9) ($p_1 < 0,05$, $p_2 < 0,05$) и переваривающей активности (рис. 3).

После проведения традиционной терапии в группе 1.2 произошла активация фагоцитарной функции НГ вследствие повышения в 2,4 раза ФАН абс. до 3,6 (3,4-4,6) против 2,3 (2,2-2,9) в группе сравнения ($p < 0,05$), процессов поглощения – ФЧ в 1,6 раза (с 4,3 (3,5-5,3) до 5,4 (4,6-5,7) ($p > 0,05$) и ФИ в 1,2 раза (с 1,4 (1,1-1,8) до 1,7 (1,2-2,5) ($p > 0,05$), что оказалось выше показателей здоровых новорожденных. При этом киллинговая активность НГ незначительно снизилась по %П, по-прежнему превышая значения группы сравнения ($p < 0,05$). Полученные данные свидетельствуют о продолжающейся антигенной стимуляции, отрицательном клиренсе патогенов и пролонгирует течение заболевания.

Нивелирование активированного функционального потенциала НГ у новорожденных группы 1.1 сопоставимо с регрессом воспалительного процесса и улучшением клинического статуса новорожденных с ВП при введении ВВИГ, что отражает позитивный эффект их влияния. Так, в группе 1.1 новорожденных с ВП при введении ВВИГ увеличилось на 6,8% (до 81,8%) количество детей, получивших 1-3 курса антибактериальной терапии, и, соответственно, уменьшилось

на 6,8% количество детей, получивших 4-6 курсов антибактериальных препаратов по сравнению с группой 1.2, что привело в целом к сокращению в 1,2 раза их курсового использования, в т. ч. в 3 раза антибиотиков резерва. Количество детей, нуждающихся в респираторной поддержке (ИВЛ) более 3 суток, уменьшилось на 17%. В 1,4 раза сокращалось количество койко-дней, проведенных в реанимационном отделении и в лечебном учреждении ($p_{1-2} < 0,05$). Летальность в группах детей с ВП, получивших и не получивших ВВИГ, составила 0%.

В группе 2.1 новорожденных с НС после введения ВВИГ в 1,5 раза увеличилось содержание $CD64^+CD16^+CD32^+CD11b^+НГ$ с 50,6 (50,0-64,9) % до 76,3 (68,6; 80,3) % ($p < 0,05$), не достигнув значений здоровых детей ($p < 0,05$), тогда как количество данной доминирующей субпопуляции у детей с ВП, получивших ВВИГ (группа 1.1), полностью восстановилось. Выявлены тенденции модулирующего влияния ВВИГ на уровень экспрессии $CD11b$, $CD16$, $CD32$ ($p_{1-2} > 0,05$). Однако MFI $CD16$ оставался в 2,4 раза ниже, а MFI $CD32$ в 1,5 раза выше показателей группы сравнения ($p_{1-2} < 0,05$) (рис. 4).

В группе 2.2 новорожденных с НС, как и в группе 1.2 новорожденных с ВП, не получивших ВВИГ, отмечался незначительный количественный прирост субпопуляции $CD64^+CD16^+CD32^+CD11b^+НГ$, по отношению к показателям группы 2, оставаясь в 1,8 раза ниже значений группы сравнения ($p < 0,05$). Выявлено незначительное увеличение MFI $CD16$, ($p < 0,05$), на фоне неменяющихся уровней экспрессии $CD32$ и $CD11b$ (рис. 4).

В группе 2.2 новорожденных с НС, получивших ВВИГ, выявлено снижение в 2,6 раза содержания $CD64^+CD16^+CD32^+CD11b^+НГ$ с 67,1 (60,9-70,1) % до 25,8 (20,2-29,6) %, но данный показатель не достиг значений группы сравнения — 1,3 (1,0-2,6) ($p < 0,05$). Касательно плотности экспрессии функционально значимых рецепторов изменения выявлены в отношении MFI $CD64$ и MFI $CD16$ в виде их увеличения с нормализацией плотности экспрессии только $CD64$, а MFI $CD16$ оставался ниже значений группы сравнения ($p < 0,05$) (рис. 5).

Количественные изменения субпопуляции $CD64^+CD16^+CD32^+CD11b^+НГ$ в группе 2.2 новорожденных с НС, не получивших ВВИГ, были однонаправленными по сравнению с группой 2.1, но менее значимыми. Отмечалось снижение содержания данной субпопуляции до 40,9 (35,6-47,3) % против 67,1 (60,9-70,1) % до лечения ($p < 0,05$) и 1,3 (1,0-2,6) % в группе сравнения ($p < 0,05$). По отношению к началу лечения и группе сравнения значимо увеличивались лишь

показатели плотности экспрессии $CD16$ и $CD11b$ (рис. 5).

Исследования фенотипа НГ у детей с НС при использовании в лечении ВВИГ показали более выраженную позитивную направленность в изменении субпопуляционного состава НГ по сравнению с новорожденными с НС, находившимися на традиционной терапии, что связано с увеличением сниженной до лечения субпопуляции $CD64^+CD16^+CD32^+CD11b^+НГ$ и снижением в 2,6 раза диагностически значимой субпопуляции $CD64^+CD16^+CD32^+CD11b^+НГ$, которая была в 52 раза выше до лечения. Данные изменения сопровождалась и позитивной перестройкой мембранной экспрессии, выражающейся в модулирующем характере влияния ВВИГ на уровень плотности экспрессии рецепторов.

Наряду с ремоделированием негативно трансформированных субпопуляций НГ при введении ВВИГ наблюдались позитивные изменения в фагоцитарной и киллинговой активности НГ.

Использование ВВИГ у детей с НС (группа 2.1) привело к увеличению %ФАН с 53,5 (47,25-65,00) % до 56,5 (33,25-64,75) % в пределах группы сравнения ($p > 0,05$). Способность НГ к поглощению снижалась (ФЧ, ФИ), но оставалась активированной в сравнении с показателями здоровых детей ($p_{1-2} < 0,05$). При этом киллинговая активность НГ восстанавливалась (ИП, $p > 0,05$) (рис. 6). Данные изменения свидетельствуют об улучшении согласованной работы поглощительных и переваривающих механизмов НГ у детей группы 2.1.

В группе 2.2 только традиционная терапия, в отличие от новорожденных группы 2.1, получивших ВВИГ, не приводила к нормализации количества НГ, которые оставались повышенными после лечения 61,0 (59,0-62,0) % и $5,3 (5,3-5,3) \times 10^9/л$ против 41,4 (39,1-42,3) % и $4,2 (4,0-4,3) \times 10^9/л$ в группе сравнения ($p_1 < 0,05$; $p_2 < 0,05$). В то же время абсолютное содержание активно фагоцитирующих НГ незначительно снижалось до $3,81 (3,53-3,98) \times 10^9/л$, по-прежнему, превышая показатель в группе сравнения ($p < 0,05$). После лечения сохранялся дисбаланс между процессами поглощения и киллинговой активностью НГ с активацией поглощительных механизмов (ФЧ, ФИ) и восстановлением переваривающей способности НГ (%П и ИП), что указывает на незавершенность фагоцитарной реакции (рис. 6).

Таким образом, при проведении иммунозаместительной и иммуномодулирующей терапии ВВИГ (группа 2.1) дисфункция НГ у новорожденных с НС, проявившаяся дефицитом активно фагоцитирующих клеток и гиперактивированными поглощительными и киллинговыми механизмами более эффективно устранялись. Прове-

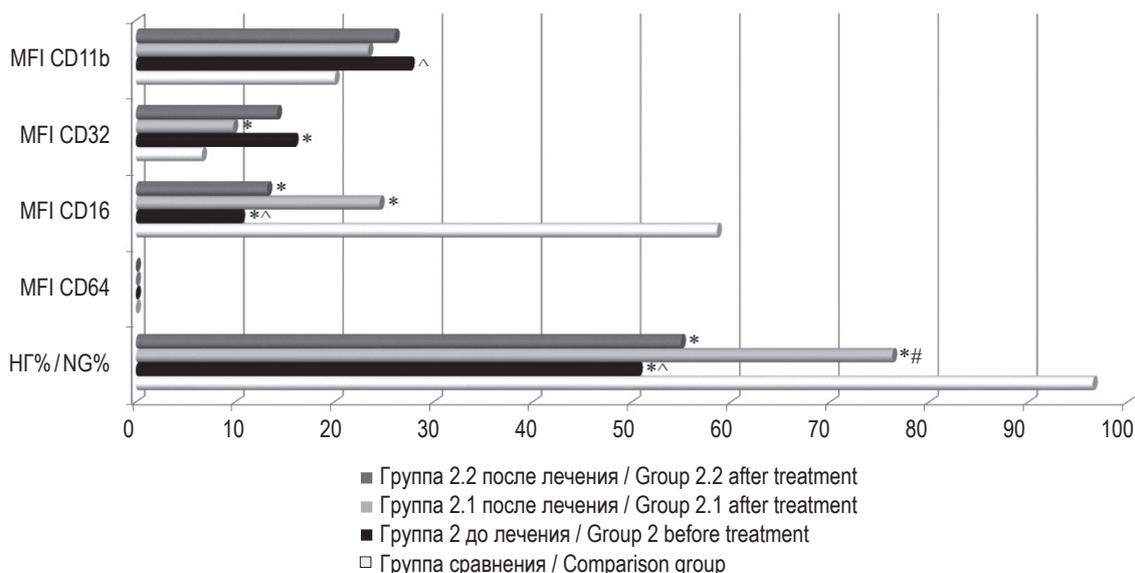


Рисунок 4. Эффекты влияния внутривенных иммуноглобулинов на негативно трансформированную субпопуляцию CD64⁺CD16⁺CD32⁺CD11b⁺ нейтрофильных гранулоцитов у новорожденных с неонатальным сепсисом
Примечание. * – статистически значимые различия по отношению к группе сравнения ($p < 0,05$); # – статистически значимые различия показателей группы 2 до и после лечения ($p < 0,05$); ^ – статистические значимые различия между группой 1 и группой 2 до лечения.

Figure 4. Effects of intravenous immunoglobulins on the negatively transformed CD64⁺CD16⁺CD32⁺CD11b⁺ neutrophilic granulocyte subpopulation in newborns with neonatal sepsis

Note. *, statistically significant differences in relation to the comparison group ($p < 0.05$); #, statistically significant differences in the parameters of group 2 before and after treatment ($p < 0.05$); ^, statistically significant differences between group 1 and group 2 before treatment.

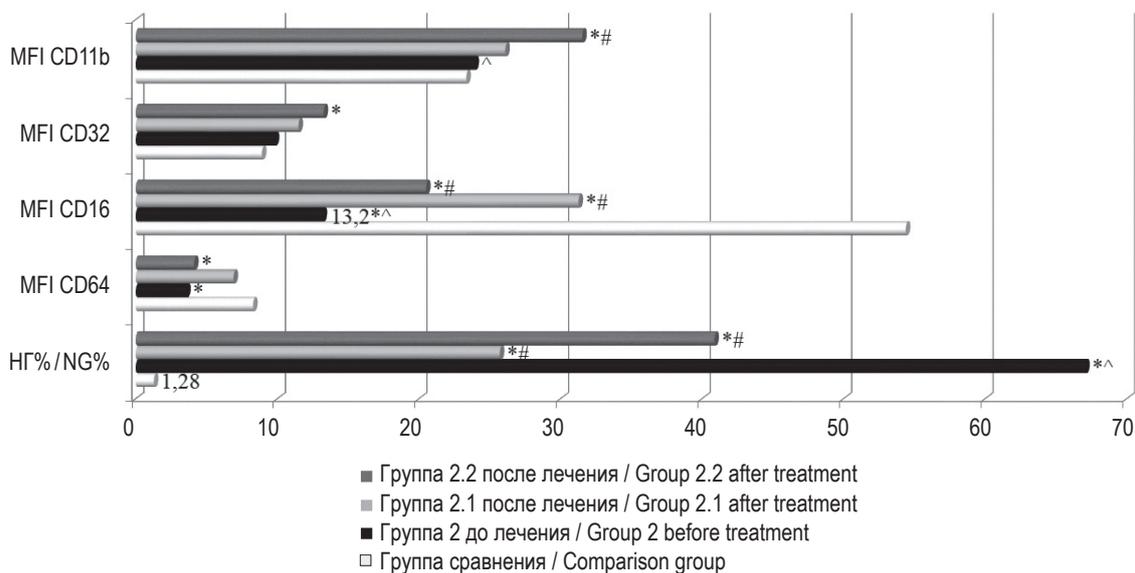


Рисунок 5. Эффекты влияния внутривенных иммуноглобулинов на негативно трансформированную субпопуляцию CD64⁺CD16⁺CD32⁺CD11b⁺НГ у новорожденных с неонатальным сепсисом

Примечание. * – статистически значимые различия по отношению к группе сравнения ($p < 0,05$); # – статистически значимые различия показателей группы 1 и группы 2 до и после лечения ($p < 0,05$).

Figure 5. Effects of intravenous immunoglobulins on the negatively transformed CD64⁺CD16⁺CD32⁺CD11b⁺ neutrophilic granulocyte subpopulation in newborns with neonatal sepsis

Note. *, statistically significant differences in relation to the comparison group ($p < 0.05$); #, statistically significant differences in the parameters of group 2 before and after treatment ($p < 0.05$); ^, statistically significant differences between group 1 and group 2 before treatment.

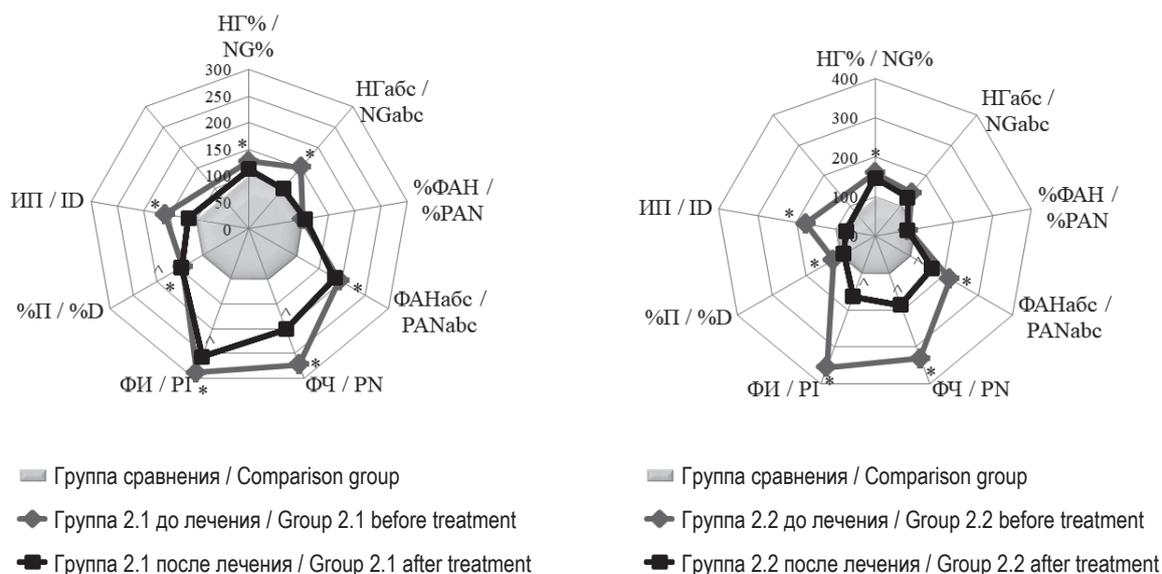


Рисунок 6. Изменение функциональной активности нейтрофильных гранулоцитов у новорожденных детей с неонатальным сепсисом под влиянием внутривенных иммуноглобулинов (процент от группы сравнения)

Примечание. * – статистически значимые различия показателей группы 2.1 и группы 2.2 до лечения по отношению к группе сравнения ($p < 0,05$); ^ – статистически значимые различия показателей группы 2.1 и группы 2.2 после лечения по отношению к группе сравнения ($p < 0,05$).

Figure 6. Changes in the functional activity of neutrophilic granulocytes in newborns with neonatal sepsis under the influence of intravenous immunoglobulins (percentage of the comparison group)

Note. *, statistically significant differences in the indicators of group 2.1 and group 2.2 before treatment in relation to the comparison group ($p < 0.05$); ^, statistically significant differences in the indicators of group 2.1 and group 2.2 after treatment in relation to the comparison group ($p < 0.05$).

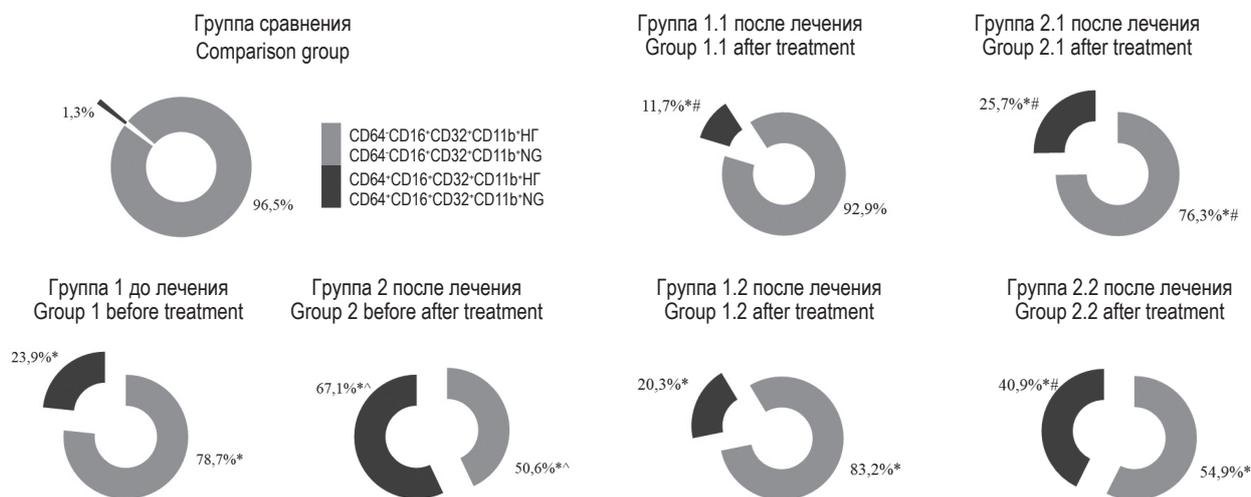


Рисунок 7. Изменение соотношения субпопуляций нейтрофильных гранулоцитов CD64⁺CD16⁺CD32⁺CD11b⁺ и CD64⁺CD16⁺CD32⁺CD11b⁻ у новорожденных с врожденной пневмонией и неонатальным сепсисом до и после лечения

Примечание. * – статистически значимые различия по отношению к группе сравнения ($p < 0,05$); # – статистически значимые различия показателей группы 1 и группы 2 до и после лечения ($p < 0,05$).

Figure 7. Change in the ratio of subpopulations of neutrophilic granulocytes CD64⁺CD16⁺CD32⁺CD11b⁺ и CD64⁺CD16⁺CD32⁺CD11b⁻ in newborns with congenital pneumonia and neonatal sepsis before and after treatment

Note. *, statistically significant differences in relation to the comparison group ($p < 0.05$); #, statistically significant differences between group 1 and group 2 before and after treatment ($p < 0.05$).

дение терапии без включения ВВИГ (группа 2.2) не привело к восстановлению количества НГ, в том числе активно фагоцитирующих, и их функционального микробицидного потенциала, что нарушает клиренс патогенов, способствует более длительному и тяжелому течению НС, ухудшает прогноз и исход заболевания.

Клинический эффект при введении ВВИГ новорожденным с НС (группа 2.1) по сравнению с новорожденными, находящимися на традиционной терапии, заключался в сокращении на 21,4% детей, получавших 4-6 курсов антибактериальной терапии (50%), в 1,2 раза количества курсов антибактериальных препаратов, в том числе в 1,5 раза антибиотиков резерва, уменьшении на 9,3% количества новорожденных с необходимостью респираторной поддержки более 3 дней (ИВЛ). При оценке критериев качества оказания медицинской помощи показатель летальности был на 5% ниже в группе 2.1 детей, которым проводилась инфузия ВВИГ (10,53%) по сравнению с группой 2.2 детей, не получавших ВВИГ в комплексном лечении (15,7%). Отмечено уменьшение на 14% количества койко-дней, проведенных в ЛПУ, в группе новорожденных с НС, получивших ВВИГ.

Обсуждение

Полученные данные свидетельствуют о различной негативной трансформации доминирующей субпопуляций $CD64^+CD16^+CD32^+CD11b^+$ НГ и $CD64^+CD16^+CD32^+CD11b^+$ НГ у новорожденных с ВП и НС, при этом наибольшую диагностическую значимость приобретает количественное увеличение субпопуляции $CD64^+CD16^+CD32^+CD11b^+$ НГ по мере утяжеления бактериального процесса. Результатом проведения комплексного лечения с включением ВВИГ новорожденных с ВП и НС установлено позитивное ремоделирование поверхностной мембраны субпопуляций НГ, что сочетается с улучшением фагоцитарной и микробицидной активности НГ и хорошими клиническими эффектами (рис. 7).

Важно отметить и то, что в группах детей с ВП и НС после лечения не произошло перестройки до полного восстановления негативной фенотипической трансформации исследуемых мажорной и минорной субпопуляций НГ, функциональной состоятельности НГ, особенно на фоне использования только традиционной терапии. Сохраняющаяся дисрегуляция в системе НГ при локальных и генерализованных бактериальных процессах у новорожденных после лечения отражает глубину выявленных дефектов, возникших и усугубленных в период становления иммунных реакций, что обосновывает необходимость даль-

нейшего мониторинга системы НГ и коррекции нарушений.

Заключение

Исследованиями установлены нарушения антибактериального иммунитета у детей с острой бактериальной локальной (ВП) и генерализованной (НС) инфекционно-воспалительной патологией, связанные как с дефектом гуморального иммунитета – дефицит IgG, так и с реализацией дефектного функционирования НГ – негативная трансформация субпопуляций $CD64^+CD16^+CD32^+CD11b^+$ НГ и $CD64^+CD16^+CD32^+CD11b^+$ НГ и их эффекторных функций. Выбор иммунозаместительной и иммуномодулирующей терапии ВВИГ и ранее используемых при тяжелых острых бактериальных инфекциях новорожденных (ВП, НС), протекающих с дефицитом IgG, обоснован дополнительно позитивным модулированием дисфункций НГ. С одной стороны, это связано с непосредственным взаимодействием IgG с Fc-рецепторами ($CD64$, $CD32$, $CD16$) функционально-значимых субпопуляций ($CD64^+CD16^+CD32^+CD11b^+$ НГ и $CD64^+CD16^+CD32^+CD11b^+$ НГ) и последующим улучшением эффекторных функций НГ – фагоцитарной и киллинговой активности. В то же время, получены данные, свидетельствующие об изменении субпопуляционного состава НГ и оснащенности их мембранными рецепторами на фоне проводимого лечения. Установлено, что у новорожденных с ВП сниженное количество субпопуляции $CD64^+CD16^+CD32^+CD11b^+$ НГ после проведения иммунотерапии ВВИГ полностью восстановилось, а при НС увеличилось в 1,5 раза, не достигнув показателей здоровых новорожденных. Количество субпопуляции $CD64^+CD16^+CD32^+CD11b^+$ НГ, имеющей особое диагностическое значение, увеличение которой свидетельствует о тяжести бактериального процесса, после терапии ВВИГ значительно снизилось как при ВП (в 2 раза), так и при НС (в 2,6 раза), оставаясь выше содержания данной субпопуляции у здоровых новорожденных. Существенно менялась в рамках проведения иммунотерапии ВВИГ представленность триггерных молекул на НГ субпопуляций $CD64^+CD16^+CD32^+CD11b^+$ и $CD64^+CD16^+CD32^+CD11b^+$ с нормализацией или модулирующим характером изменений их плотности экспрессии. Однако эффект позитивного ремоделирования субпопуляций НГ и их фенотипа более очевиден при использовании в терапевтической тактике ВВИГ при локальных (ВП) и генерализованных (НС) инфекционно-воспалительных заболеваниях по сравнению с сохраняющейся дезорганизацией поверхностной

мембраны при проведении терапии без включения ВВИГ, что сочеталось с улучшением фагоцитарной и киллинговой активности НГ в большей степени при ВП, чем при НС.

Репрограммирование фенотипа НГ и их функциональной активности на фоне проводимой терапии, в том числе с включением иммунозаместительной и иммуномодулирующей терапии ВВИГ, может быть ориентиром эффективности проводимых лечебных мероприятий. Лимитирование негативной перестройки субпопуляций НГ (CD64⁺CD16⁺CD32⁺CD11b⁺

и CD64⁺CD16⁺CD32⁺CD11b⁺), опосредующих функциональные возможности НГ, сопровождалось позитивными клиническими эффектами у новорожденных с локальной (ВП) и генерализованной (НС) бактериальной инфекцией, связанными с регрессом воспалительного процесса, оптимизацией антибактериальной терапии, сокращением длительности проведения реанимационных мероприятий, уменьшением продолжительности лечения и улучшением показателя летальности, особенно при НС.

Список литературы / References

1. Вельков В.В. Неонатальный сепсис: гемокультуры и биомаркеры – проблемы и перспективы // Педиатрия, 2017. Т. 96, № 1. С. 123-134. [Velkov V.V. Neonatal sepsis: hemocultures and biomarkers – problems and prospects. *Pediatrics = Russian Pediatrics*, 2017, Vol. 96, no. 1, pp. 123-134. (In Russ.)]
2. Иванова О.Н., Григорьев Е.В. Диагностические маркеры раннего неонатального сепсиса – ограничения и перспективы // Вестник анестезиологии и реаниматологии, 2020. Т. 17, № 6. С. 72-79. [Ivanova O.I., Grigoriev E.V. Diagnostic markers of early neonatal sepsis – limitations and perspectives. *Vestnik anesteziologii i reanimatologii = Bulletin of Anesthesiology and Resuscitation*, 2020, Vol. 17, no. 6, pp. 72-79. (In Russ.)]
3. Иванов Д.О. Системный воспалительный ответ при неонатальном сепсисе: одинаков ли он? // Трансляционная медицина, 2014. № 1. С. 53-61. [Ivanov D.O. Systemic inflammatory response in neonatal sepsis: the same whether it? *Translyatsionnaya meditsina = Translational Medicine*, 2014, no. 1, pp. 53-61. (In Russ.)]
4. Кучеров Ю.И., Жиркова Ю.В., Чеботаева Л.И., Шишкина Т.Н. Лабораторные маркеры ранней диагностики неонатального сепсиса // Анестезиология и реаниматология, 2015. № 3. С. 11-15. [Kucherov Y.I., Zhirkova Y.V., Chebotaeva L.I., Shishkina T.V. Laboratory markers for early diagnosis of neonatal sepsis. *Anesteziologiya i reanimatologiya = Anesthesiology and Reanimatology*, 2015, no. 3, pp. 11-15. (In Russ.)]
5. Нестерова И.В., Чудилова Г.А., Ковалева С.В., Ломтатидзе Л.В., Колесникова Н.В., Евлевский А.А. Методы комплексной оценки функциональной активности нейтрофильных гранулоцитов в норме и патологии. Методические рекомендации. Краснодар, 2017. 52 с. [Nesterova I.V., Chudilova G.A., Kovaleva S.V., Lomtadidze L.V., Kolesnikova N.V., Yevlevsky A.A. Methods for comprehensive assessment of the functional activity of neutrophil granulocytes in health and disease (guidelines)]. *Krasnodar*, 2017. 52 p.
6. Нестерова И.В., Чудилова Г.А., Ковалева С.В., Тараканов В.А., Ломтатидзе Л.В., Колесникова Н.В., Русинова Т.В., Евлевский А.А., Малиновская В.В. Нейтрофильные гранулоциты: отражение в зеркале современных представлений. Великобритания, США, Москва: Capricorn Publishing, 2018. 338 с. [Nesterova I.V., Chudilova G.A., Kovaleva S.V., Tarakanov V.A., Lomtadidze L.V., Kolesnikova N.V., Rusinova T.V., Evglevsky A.A., Malinovskaya V.V. Neutrophilic granulocytes: reflection in the mirror of modern concepts]. UK, USA, Moscow: Capricorn Publishing, 2018. 338 p.
7. Перепелица С.А., Голубев А.М., Мороз В.В., Алексеева С.В., Буева Ж.В., Редина Н.В., Шульга Р.А., Салазкина Т.А., Леонтьук Н.В. Провоспалительные и противовоспалительные цитокины у недоношенных новорожденных с ОРДС // Общая реаниматология, 2009. Т. 5, № 6. С. 21-30. [Perepelitsa S.A., Golubev A.M., Moroz V.V., Alekseyeva S.V., Buyeva Z.V., Redina N.V., Shulga R.A., Salazkina T.A., Leontyuk N.V. Proinflammatory and anti-inflammatory cytokines in preterm neonates with acute respiratory distress syndrome. *Obshchaya reanimatologiya = General Reanimatology*, 2009, Vol. 5, no. 6, pp. 21-30. (In Russ.)]
8. Перепелица С.А., Смердова Е.Ф. Дифференциальная диагностика врожденной пневмонии у новорожденных с низкой и экстремально низкой массой тела (морфологическое исследование) // Общая реаниматология, 2018. Т. 14, № 4. С. 5-14. [Perepelitsa S.A., Smerdova E.F. Differential Diagnosis of Congenital Pneumonia in Newborns with Low and Extremely Low Body Weight (Morphological Study). *Obshchaya reanimatologiya = General Reanimatology*, 2018, Vol. 14, no. 4, pp. 5-14. (In Russ.)]
9. Самсыгина Г.А. О предрасполагающих факторах и факторах риска развития неонатального сепсиса и о современных подходах его лечения // Педиатрия, 2012. Т. 91, № 3. С. 32-38. [Samsygina G.A. About predisposing factors and risk factors for the development of neonatal sepsis and about modern approaches to its treatment. *Pediatrics = Russian Pediatrics*, 2012, Vol. 91, no. 3, pp. 32-38. (In Russ.)]
10. Сепсис: классификация, клинико-диагностическая концепция и лечение / Под ред. Гельфанда Б.Р. М.: Медицинское информационное агентство, 2017. 408 с. [Sepsis: classification, clinical and diagnostic concept and treatment. Ed. Gelfand B.R.]. Moscow: MIA-MED, 2017. 408 p.
11. Солдатова И., Панкратьева Л., Дегтярева М., Омеляновский В., Авксентьева М., Свешникова Н., Цфасман Ф., Кулинчик Т., Деркач Е. Клинические и иммунопатогенетические особенности раннего неонатального сепсиса у детей различного гестационного возраста и оценка клинико-экономической эф-

- фективности иммунозаместительной терапии // Вопросы современной педиатрии, 2011. Т. 10, № 6. С. 52-61. [Soldatova I., Pankratyeva L., Degtyareva M., Omelyanovskiy V., Avksentyeva M., Sveishnikova N., Tsfasman F., Kulinchik T., Derkach E. Clinical and immunopathologic characteristics of early neonatal sepsis in infants of different gestational age and clinical and economical evaluation of immunosupportive therapy efficacy. *Voprosy sovremennoy pediatrii = Current Pediatrics*, 2011, Vol. 10, no. 6, pp. 52-61. (In Russ.)]
12. Хаертынов Х.С., Анохин В.А., Халиуллина С.В., Любин С.А., Донцова Н.В., Королева П.В., Кошкина А.Д., Хасанова Г.Р. Клинико-эпидемиологические особенности и органная дисфункция при неонатальном сепсисе // Российский вестник перинатологии и педиатрии, 2019. Т. 64, № 5. С. 176-182. [Khaertynov K.S., Anokhin V.A., Khaliullina S.V., Lubin S.A., Dontsova N.V., Koroleva P.V., Koshkina A.D., Khasanova G.R. Clinical and epidemiological features and organ dysfunction in newborns with neonatal sepsis. *Rossiyskiy vestnik perinatologii i pediatrii = Russian Bulletin of Perinatology and Pediatrics*, 2019, Vol. 64, no. 5, pp. 176-182. (In Russ.)]
13. Шабалов Н.П. Неонатология: учебное пособие. Москва: ГЕОТАР-Медиа, 2016. Т. 2. 733 с. [Shabalov N.P. Neonatology]. Moscow: GEOTAR-Media, 2016. 733 p.
14. Шеголев А.И., Туманова У.Н., Шувалова М.П., Фролова О.Г. Врожденная пневмония как причина перинатальной смертности в Российской Федерации // Неонатология: новости, мнения, обучение, 2016. № 2. С. 61-66. [Schegolev A.I., Tumanova U.N., Shuvalova M.P., Frolova O.I. Congenital pneumonia as a cause of perinatal mortality in the Russian Federation. *Neonatologiya: novosti, mneniya, obuchenie = Neonatology: News, Opinions, Training* 2016, no. 2, pp. 61-66. (In Russ.)]
15. Anderson-Berry A.L., Bellig L.L., Ohning B.L. Neonatal Sepsis Medicine. Medscape, 2011. Available at: <http://emedicine.medscape.com/article/978352-overview>.
16. Bournazos S., Wang T.T., Ravetch J.V. The role and function of Fcγ receptors on myeloid cells. *Microbiol. Spectr.*, 2016, Vol. 4, no. 6, 10.1128/microbiolspec.MCHD-0045-2016. doi: 10.1128/microbiolspec.MCHD-0045-2016.
17. Camacho-Gonzales A., Spearman P.W., Stoll B.J. Neonatal infectious diseases: evaluation of neonatal sepsis. *Pediatr. Clin. North Am.*, 2013, Vol. 60, no. 2, pp. 367-389.
18. Costa S., Rocha G., Leito A., Guimaraes H. Transient tachypnea of the newborn and congenital pneumonia: a comparative study. *J. Matern. Fetal Neonatal Med.*, 2012, Vol. 25, no. 7, pp. 992-994.
19. Eichberger J., Resch E., Resch B. Diagnosis of neonatal sepsis: the role of inflammatory markers. *Front. Pediatr.*, 2022, Vol. 10, 840288. doi: 10.3389/fped.2022.840288.
20. Hellebrekers P., Vriskoop N., Koenderman L. Neutrophil phenotypes in health and disease. *Eur. J. Clin. Invest.*, 2018, Vol. 48, no. 2, e12943. doi: 10.1111/eci.12943.
21. Hotchkiss R.S., Monneret G., Payen D. Immunosuppression in sepsis: novel understanding of the disorder and a new therapeutic approach. *Lancet Infect. Dis.*, 2013, Vol. 13, no. 3, pp. 260-268.
22. Madsen-Bouterse S.A., Romero R., Tarca A.L., Kusanovic J.P., Espinoza J., Kim C.J., Kim J.-S., Edwin S.S., Gomez R., Draghici S. The transcriptome of the fetal inflammatory response syndrome. *Am. J. Reprod. Immunol.*, 2010, Vol. 63, no. 1, pp. 73-92.
23. Raymond S.L., Storz J.A., Mira J.C., Larson S.D., Wynn J.L., Moldawer L.L. Immunological defects in neonatal sepsis and potential therapeutic approaches. *Front. Pediatr.*, 2017, Vol. 5, 14. doi: 10.3389/fped.2017.00014.
24. Reinhart K., Bauer M., Riedemann N.C., Hartog C.S. New Approaches to sepsis: molecular diagnostics and biomarkers. *Clin. Microbiol. Rev.*, 2012, Vol. 25, no. 4, pp. 609-634.
25. Rennie J.M. Textbook of Neonatology E-Book – Elsevier Health Sciences, 2012. 1375 p.
26. Shah B.A., Padbury J.F. Neonatal sepsis: an old problem with new insights. *Virulence*, 2014, Vol. 5, no. 1, pp. 170-178.
27. Singh M., Alsaleem M., Gray C.P. Neonatal sepsis. StatPearls [Internet]. StatPearls Publishing, 2021. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK531478/>.
28. van Well G.T.J., Daalderop L.A., Wolfs T., Kramer B.W. Human perinatal immunity in physiological conditions and during infection. *Mol. Cell. Pediatr.*, 2017, Vol. 4, 4. doi: 10.1186/s40348-017-0070-1.
29. Wynn J., Levy O. Role of innate host defenses in susceptibility to early-onset neonatal sepsis. *Clin. Perinatol.*, 2010, Vol. 37, no. 2, pp. 307-337.

Авторы:

Нестерова И.В. – д.м.н., профессор, главный научный сотрудник отдела клинической и экспериментальной иммунологии и молекулярной биологии Центральной научно-исследовательской лаборатории ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Краснодар; профессор кафедры клинической иммунологии, аллергологии и адаптологии факультета непрерывного медицинского образования Медицинского института ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов», Москва, Россия

Authors:

Nesterova I.V., PhD, MD (Medicine), Professor, Chief Research Associate, Department of Clinical and Experimental Immunology and Molecular Biology, Central Scientific Research Laboratory, Kuban State Medical University, Krasnodar; Professor, Department of Clinical Immunology, Allergology and Adaptology Faculty of Continuing Medical Education of the Medical Institute, Peoples' Friendship University of Russia, Moscow, Russian Federation

Ковалева С.В. — д.м.н., доцент, старший научный сотрудник отдела клинико-экспериментальной иммунологии и молекулярной биологии Центральной научно-исследовательской лаборатории, доцент кафедры клинической иммунологии, аллергологии и лабораторной диагностики ФПК и ППС ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Краснодар, Россия

Чудилова Г.А. — д.б.н., доцент, заведующая отделом клинико-экспериментальной иммунологии и молекулярной биологии Центральной научно-исследовательской лаборатории, профессор кафедры клинической иммунологии, аллергологии и лабораторной диагностики ФПК и ППС ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Краснодар, Россия

Ломтатидзе Л.В. — к.б.н., старший научный сотрудник отдела клинико-экспериментальной иммунологии и молекулярной биологии Центральной научно-исследовательской лаборатории; доцент кафедры клинической иммунологии, аллергологии и лабораторной диагностики ФПК и ППС ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Краснодар, Россия

Смерчинская Т.В. — врач — анестезиолог-реаниматолог отделения реанимации и интенсивной терапии для новорожденных № 1 ГБУЗ «Детская краевая клиническая больница» Министерства здравоохранения Краснодарского края, г. Краснодар, Россия

Чапурина В.Н. — ассистент кафедры клинической иммунологии, аллергологии и лабораторной диагностики ФПК и ППС ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Краснодар, Россия

Kovaleva S.V., PhD (Medicine), Associate Professor, Senior Research Associate, Department of Clinical and Experimental Immunology and Molecular Biology of the Central Scientific Research Laboratory, Associate Professor of the Department of Clinical Immunology, Allergology and Laboratory Diagnostics of FAT and PRS, Kuban State Medical University, Krasnodar, Russian Federation

Chudilova G.A., PhD, MD (Biology), Associate Professor, Head, Department of Clinical and Experimental Immunology and Molecular Biology of the Central Scientific Research Laboratory, Professor of the Department of Clinical Immunology, Allergology and Laboratory Diagnostics of FAT and PRS, Kuban State Medical University, Krasnodar, Russian Federation

Lomtadize L.V., PhD (Biology), Senior Research Associate, Department of Clinical and Experimental Immunology and Molecular Biology of the Central Scientific Research Laboratory, Associate Professor of the Department of Clinical Immunology, Allergology and Laboratory Diagnostics of FAT and PRS, Kuban State Medical University, Krasnodar, Russian Federation

Smerchinskaya T.V., Anesthesiologist-Resuscitator, Intensive Care Unit for Newborns No. 1, Children's Regional Clinical Hospital, Krasnodar, Russian Federation

Chapurina V.N., Assistant Professor, Department of Clinical Immunology, Allergology and Laboratory Diagnostics of FAT and PRS, Kuban State Medical University, Krasnodar, Russian Federation

Поступила 25.10.2022
Принята к печати 16.02.2023

Received 25.10.2022
Accepted 16.02.2023

ВЛИЯНИЕ ЦИТОКИНПРОДУЦИРУЮЩЕЙ АКТИВНОСТИ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК КОСТНОГО МОЗГА НА ЭФФЕКТИВНОСТЬ МОБИЛИЗАЦИИ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК

Попонина Е.А., Пестрикова А.О., Назарова Е.Л., Исаева Н.В.,
Фокина Е.С., Эндакова А.И., Минаева Н.В.

ФГБУН «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Федерального медико-биологического агентства», г. Киров, Россия

Резюме. Трансплантация гемопоэтических стволовых клеток применяется для лечения гемобластозов и некоторых других заболеваний. В зависимости от диагноза используют аутологичные клетки самого пациента, либо аллогенные, полученные от здорового родственного или неродственного донора. Для успешного проведения трансплантации необходимо достаточное количество заготовленных гемопоэтических клеток-предшественников. В настоящее время для их заготовки широко применяется стимуляция выхода в периферическую кровь гранулоцитарным колониестимулирующим фактором (G-CSF) с последующим сбором методом лейкофереза. Гемопоэтические стволовые клетки покидают костномозговую нишу, образованную стромальным микроокружением, после разрыва удерживающих связей. Мезенхимальные стромальные клетки регулируют выход гемопоэтических предшественников, продуцируя различные цитокины и другие биологически активные вещества. Поэтому изучение функциональных свойств мезенхимальных клеток костного мозга может помочь в решении проблемы заготовки недостаточного числа гемопоэтических клеток, что встречается у пациентов с множественной миеломой.

Цель исследования – оценить зависимость результатов мобилизации гемопоэтических стволовых клеток от цитокинпродуцирующей способности мезенхимальных стромальных клеток костного мозга доноров и пациентов с множественной миеломой.

Результаты заготовки гемопоэтических предшественников изучили у 10 доноров (медиана возраста – 27 лет) и 18 пациентов с множественной миеломой (медиана возраста – 57 лет). У доноров выход гемопоэтических стволовых клеток в периферическую кровь стимулировали подкожным введением препарата G-CSF в дозе 10 мкг/кг/сут. Больным множественной миеломой назначали винорельбин в дозе 35 мг/м² поверхности тела с последующим введением препарата G-CSF (10 мкг/кг/сут подкожно). Из костного мозга, взятого до начала мобилизации, получали культуру мезенхимальных стромальных клеток и исследовали содержание интерлейкинов IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, TNF α и IFN γ в супернатантах методом твердофазного иммуноферментного анализа с помощью наборов

Адрес для переписки:

Попонина Елена Александровна
ФГБУН «Кировский научно-исследовательский
институт гематологии и переливания крови
Федерального медико-биологического агентства»
610027, Россия, Кировская обл., г. Киров,
ул. Красноармейская, 72.
Тел.: 8 (8332) 67-33-87.
E-mail: poponinaea@niigpk.ru

Address for correspondence:

Elena A. Poponina
Kirov Research Institute of Hematology
and Blood Transfusion
72 Krasnoarmeyskaya St
Kirov
610027 Russian Federation
Phone: +7 (8332) 67-33-87.
E-mail: poponinaea@niigpk.ru

Образец цитирования:

Е.А. Попонина, А.О. Пестрикова, Е.Л. Назарова,
Н.В. Исаева, Е.С. Фокина, А.И. Эндакова,
Н.В. Минаева «Влияние цитокинпродуцирующей
активности мезенхимальных стромальных клеток
костного мозга на эффективность мобилизации
гемопоэтических стволовых клеток» // Медицинская
иммунология, 2024. Т. 26, № 1. С. 121-126.
doi: 10.15789/1563-0625-EOT-2618

© Попонина Е.А. и соавт., 2024
Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

E.A. Poponina, A.O. Pestrikova, E.L. Nazarova, N.V. Isaeva,
E.S. Fokina, A.I. Endakova, N.V. Minaeva “Effect of the
bone marrow mesenchymal stromal cells cytokine-producing
activity on mobilization of hematopoietic stem cells”, *Medical
Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2024,
Vol. 26, no. 1, pp. 121-126.
doi: 10.15789/1563-0625-EOT-2618

© Poponina E.A. et al., 2024
The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License
DOI: 10.15789/1563-0625-EOT-2618

реагентов производства АО «Вектор-Бест» (г. Новосибирск). Пациенты с множественной миеломой в целом отличались высокой секрецией провоспалительного цитокина IL-2 (4,70 пг/мл vs 3,55 пг/мл у здоровых лиц, $p = 0,003$) и низкой IFN γ (0,41 пг/мл vs 2,14 пг/мл у здоровых лиц, $p < 0,001$). Настоящее исследование показало, что у больных с неэффективной заготовкой гемопоэтических предшественников низкая секреция стромальными клетками IL-8 (308,08 пг/мл vs 561,29 пг/мл у здоровых лиц, $p = 0,04$). Полученные результаты согласуются с литературными данными о важной роли IL-8 в мобилизации гемопоэтических стволовых клеток, что позволяет рассматривать IL-8 как информативный маркер для прогнозирования неэффективности заготовки гемопоэтических предшественников.

Ключевые слова: мезенхимальные стромальные клетки, гемопоэтические стволовые клетки, цитокины, костный мозг, стимуляция, нейтрофилы, множественная миелома

EFFECT OF THE BONE MARROW MESENCHYMAL STROMAL CELLS CYTOKINE-PRODUCING ACTIVITY ON MOBILIZATION OF HEMATOPOIETIC STEM CELLS

Poponina E.A., Pestrikova A.O., Nazarova E.L., Isaeva N.V., Fokina E.S., Endakova A.I., Minaeva N.V.

Kirov Research Institute of Hematology and Blood Transfusion, Kirov, Russian Federation

Abstract. Hematopoietic stem cell transplantation is used to treat hemoblastoses and other diseases. To this purpose, autologous cells, or allogeneic cells from a healthy related or unrelated donor are used, depending on the diagnosis. Sufficient amounts of harvested hematopoietic cells are required for successful transplantation. Their release from bone marrow to peripheral blood is commonly stimulated by granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) then followed by leukapheresis. Hematopoietic cells may leave the bone marrow niche formed by the cells of stromal microenvironment when the contact bonds become weaker. Mesenchymal stromal cells regulate the release of hematopoietic precursors by producing cytokines and other biologically active substances. Therefore, the study of functional properties of bone marrow mesenchymal cells may be helpful in resolving the problem of “poor mobilizers” among patients with multiple myeloma. The aim of our study was to estimate mobilization of hematopoietic stem cells depending on the mesenchymal stromal cell cytokine production in donors and patients with multiple myeloma.

The yields of hematopoietic progenitors were studied in 10 donors (median age 27 years) and 18 patients with multiple myeloma (median age 57 years). In donors, the release of hematopoietic stem cells into the blood was stimulated by subcutaneous administration of G-CSF at a dose of 10 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$, in patients, with vinorelbine at a dose of 35 mg/m^2 , followed by administration of G-CSF (10 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ subcutaneously). Mesenchymal stromal cells were cultured from bone marrow taken before the mobilization. The content of interleukins IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, TNF α and IFN γ in the culture supernatants was studied by enzyme-linked immunosorbent assay (Vector-Best, Novosibirsk).

Patients with multiple myeloma were characterized by high secretion of the pro-inflammatory cytokine IL-2 (4.70 pg/mL vs 3.55 pg/mL in donors, $p = 0.003$) and low IFN γ (0.41 pg/mL vs 2.14 pg/mL in healthy, $p < 0.001$). However, no relationships were found between the cytokine levels and the yields of hematopoietic stem cells. The present study showed that the IL-8 secretion by stromal cells was lower in patients with ineffective harvesting of hematopoietic precursors (308.08 pg/mL vs 561.29 pg/mL in donors, $p = 0.04$).

Our results are consistent with the literature data on the important role of IL-8 in mobilization of hematopoietic stem cells, thus allowing us to consider IL-8 an informative marker to predict insufficient yields of hematopoietic precursors.

Keywords: mesenchymal stromal cells, hematopoietic stem cells, cytokines, bone marrow, mobilization, neutrophils, multiple myeloma

Введение

Трансплантация гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) является важным этапом терапии больных гемобластозами. Аутологичная трансплантация ГСК (ТГСК) выполняется с использованием собственных гемопоэтических клеток

пациента после проведения высокодозной химиотерапии для восстановления функций костного мозга, преимущественно у пациентов с множественной миеломой (ММ), а также с лимфомами. При аллогенной ТГСК больному вводится материал, полученный от гистосовместимых нерод-

ственных доноров-добровольцев или родственных доноров [3].

Успех трансплантации зависит от многих факторов, в том числе от количества, качества и функциональной активности заготовленных ГСК [5]. Гемопоэтические предшественники собираются из периферической крови методом лейкофереза, для их выхода из костного мозга в сосудистое русло применяется гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (Granulocyte colony-stimulating factor, G-CSF). В спокойном состоянии ГСК находятся в костномозговой нише, образованной стромальным микроокружением и регулирующей их рост, выживание, дифференцировку, а также способность к мобилизации в кровь.

Известно, что заготовка аутологичных ГСК у пациентов с ММ не всегда происходит в количестве, достаточном для проведения последующей трансплантации. Согласно литературным данным, частота «неудачных» мобилизаций у больных ММ варьирует от 5 до 40% [1]. В качестве предикторов неэффективности сбора ГСК выступают возраст старше 60 лет, наличие сопутствующей патологии, активная стадия заболевания, состав и объем ранее проведенной химиотерапии [8]. Учитывая, что за выход гемопоэтических предшественников в кровь отвечает стромальное микроокружение костного мозга, представляет интерес исследовать особенности функционального состояния клеток стромы у больных ММ и доноров ГСК.

Цель – оценить эффективность мобилизации гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) в зависимости от цитокинпродуцирующей способности мезенхимальных стромальных клеток (МСК) костного мозга у доноров и пациентов с ММ.

Материалы и методы

Заготовка ГСК выполнена у 10 доноров и 18 пациентов с ММ. Возраст доноров составил от 14 до 48 лет (медиана – 27 лет), больных – от 41 до 68 лет (медиана – 57 лет). У доноров ГСК выход гемопоэтических предшественников в периферическую кровь стимулировали подкожным введением препарата G-CSF в дозе 10 мкг/кг/сут. Больные ММ получали винорельбин в дозе 35 мг/м² поверхности тела с последующим назначением препарата G-CSF (10 мкг/кг/сут подкожно). До заготовки ГСК пациенты с ММ прошли от 4 до 10 курсов терапии по схеме VCD, либо до 4 курсов по схеме PAD. Мониторинг уровня ГСК в периферической крови выполняли ежедневно, при достижении количества 10 и более клеток в мкл проводили аппаратный лейкоцитаферез с применением клеточного сепаратора Spectra Optia (Terumo BCT, США). ГСК идентифицировали и подсчитывали по протоколу ISHAGE на основании экспрессии маркера CD34 методом

лазерной проточной цитофлуориметрии (BD FACS Canto II, Becton Dickinson, США).

МСК получали из костного мозга, взятого путем пункции задней ости подвздошной кости под местной анестезией согласно общепринятой методике до начала мобилизации ГСК. Миелокарициты изолировали центрифугированием на градиенте плотности Lympholite ($\rho = 1,077$) (Cedarlane, Канада), при 400 g 20 мин, при температуре 22 ± 1 °C. Культивирование прикрепившихся к пластиковой поверхности клеток осуществляли в среде α MEM (StemCells, Канада), содержащей богатую тромбоцитами плазму (4%), гепарин (Sigma, США, 2 Ед/мл), L-глутамин 2 мМ (StemCells, Канада) в стандартных условиях 5% углекислого газа и температуре 37 °C до покрытия порядка 80-90% культуральной поверхности. Далее клетки открепляли от поверхности пластика, добавляя в культуральные флаконы 0,25%-ный раствор трипсина с последующим сбором содержимого.

Полученные клетки имели веретеновидную форму и обладали адгезией к пластику, характерным было наличие поверхностных маркеров CD44, CD105, CD73, CD90, отсутствие CD34, CD45, CD31, CD54, CD117, CD133 и HLA-DR. Иммунофенотип МСК определяли методом лазерной проточной цитофлуориметрии (BD FACS Canto II, Becton Dickinson, США).

Уровни интерлейкинов IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, TNF α и IFN γ оценивали методом твердофазного иммуноферментного анализа в питательной среде культур МСК. Для определения концентраций указанных цитокинов использовали наборы реагентов производства АО «Вектор-Бест» (г. Новосибирск), с регистрацией результатов с помощью полуавтоматического анализатора Тесан (Австрия).

Статистическую обработку данных проводили с использованием программы Microsoft Office Excel. Количественные различия показателей в группах оценивали, используя непараметрический критерий Манна–Уитни. Различия считали значимыми при уровне $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Результаты спонтанной продукции цитокинов в супернатантах культур МСК доноров и больных ММ представлены в таблице 1.

Как у доноров, так и у пациентов отмечались высокие уровни IL-6 и IL-8, концентрации остальных цитокинов были значительно ниже. Сравнение показателей продукции цитокинов в группах здоровых лиц и больных ММ продемонстрировало повышенную секрецию провоспалительного цитокина IL-2 у пациентов (4,70 пг/мл vs 3,55 пг/мл у здоровых лиц, $p = 0,003$). Помимо этого, у больных выявлена тенденция к снижению

продукции IL-10, обладающего противовоспалительной активностью (4,54 пг/мл vs 10,16 пг/мл, $p = 0,200$). Таким образом, в супернатантах МСК у пациентов с ММ отмечался сдвиг баланса цитокинов в провоспалительную сторону.

Несмотря на характерные изменения в продукции цитокинов стромальными клетками костного мозга, неэффективная мобилизация наблюдалась только у 22,2% (4 из 18) пациентов. У данных лиц за 3 афереза не заготовлено оптимальное для проведения трансплантации количество ГСК ($Me = 3,25 \times 10^6$ CD34⁺ клеток/кг). Оптимальным числом CD34⁺ для трансплантации считается $4-5 \times 10^6$ клеток/кг [5]. У остальных 14 больных (78,8%) успешно получено достаточное количество ГСК ($Me = 12,25 \times 10^6$ CD34⁺ клеток/кг за 2 афереза), что сопоставимо с результатами заготовки у здоровых лиц ($Me = 9,20 \times 10^6$ CD34⁺ клеток/кг за 1-2 афереза).

Результаты продукции цитокинов клетками стромы при различной эффективности мобилизации ГСК у пациентов с ММ представлены в таблице 2.

При изучении показателей в группе больных ММ с неэффективной заготовкой ГСК выявлено статистически значимое снижение продукции культурой МСК IL-8 (308,08 пг/мл vs 561,29 пг/мл у доноров, $p = 0,04$).

G-CSF стимулирует мобилизацию ГСК не путем прямого воздействия, а опосредованно, через микроокружение [4]. Чтобы произошел выход

ГСК в кровоток, их контакт с мезенхимальной нишей должен быть нарушен. За последние два десятилетия был идентифицирован ряд удерживающих факторов, наиболее значимыми из которых являются механизм молекулярной адгезии (VLA)-4/VCAM1 и хемоаттрактивное взаимодействие CXCL12/CXCR4 [2]. Введение G-CSF вызывает экспансию нейтрофилов и их предшественников, стимулирующую макрофагов костного мозга, периферической симпатической нервной системы, остеоцитов. В результате действия протеолитических ферментов нейтрофилов разрываются удерживающие связи, уменьшается выработка мезенхимальными клетками CXCL12. Экспрессия молекул адгезии МСК регулируется в том числе путем секреции ими различных биологически активных веществ, цитокинов. В совокупности все это приводит к изменению ниши костного мозга и последующему выходу ГСК в периферическую кровь. Настоящее исследование показало, что у больных ММ с неэффективной заготовкой гемопоэтических предшественников снижена секреция стромальными клетками IL-8. Полученные результаты согласуются с литературными данными о важной роли IL-8 в мобилизации ГСК. Он представляет собой цитокин, участвующий в хемотаксисе и активации нейтрофилов, вызывает индукцию высвобождения ферментов и продукцию токсичных метаболитов в нейтрофилах. IL-8 ранее был известен как белок, активирующий нейтрофилы (NAP-1), он

ТАБЛИЦА 1. ПРОДУКЦИЯ ЦИТОКИНОВ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫМИ СТРОМАЛЬНЫМИ КЛЕТКАМИ ДОНОРОВ И БОЛЬНЫХ МНОЖЕСТВЕННОЙ МИЕЛОМОЙ, Me ($Q_{0,25}-Q_{0,75}$)

TABLE 1. CYTOKINE PRODUCTION BY DONOR'S AND MULTIPLE MYELOMA PATIENT'S MESENCHYMAL STROMAL CELLS, Me ($Q_{0,25}-Q_{0,75}$)

Цитокин Cytokine	Концентрация в супернатанте, пг/мл Supernatant level, pg/mL		p
	Доноры Donors n = 10	Больные ММ Patients with MM n = 18	
IL-1 β	2,88 (1,84-3,28)	1,94 (1,91-2,44)	0,195
IL-2	3,55 (1,88-4,45)	4,70 (4,55-4,95)	0,003
IL-4	3,61 (2,89-4,69)	3,96 (3,39-4,79)	0,792
IL-6	709,09 (653,73-762,73)	730,16 (717,80-739,65)	0,564
IL-8	561,29 (473,84-633,95)	459,44 (341,03-555,20)	0,119
IL-10	10,16 (4,13-17,44)	4,54 (1,34-7,26)	0,157
TNF α	4,09 (2,87-4,34)	4,19 (4,10-4,25)	0,487
IFN γ	2,14 (1,60-3,81)	0,41 (0,03-1,01)	< 0,001

ТАБЛИЦА 2. ПРОДУКЦИЯ ЦИТОКИНОВ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫМИ СТРОМАЛЬНЫМИ КЛЕТКАМИ ПРИ ЭФФЕКТИВНЫХ И НЕЭФФЕКТИВНЫХ ЗАГОТОВКАХ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

TABLE 2. CYTOKINE PRODUCTION BY MESENCHYMAL STROMAL CELLS IN EFFECTIVE AND INEFFECTIVE HEMATOPOIETIC STEM CELLS YIELDS, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

Цитокин Cytokine	Концентрация в супернатанте, пг/мл Supernatant level, pg/mL				
	Доноры Donors n = 10	Эффективная мобилизация Sufficient yields n = 14	p*	Неэффективная мобилизация Insufficient yields n = 4	p*
IL-1β	2,88 (1,84-3,28)	1,95 (1,93-2,45)	0,138	1,83 (1,68-2,06)	0,349
IL-2	3,55 (1,88-4,45)	4,77 (4,39-4,95)	0,005	4,61 (4,56-4,74)	0,040
IL-4	3,61 (2,89-4,69)	4,12 (3,68-4,93)	0,482	3,19 (2,62-3,91)	0,396
IL-6	709,09 (653,73-762,73)	731,29 (722,99-738,74)	0,933	716,83 (706,23-730,54)	0,539
IL-8	561,29 (473,84-633,95)	525,15 (371,58-557,05)	0,306	308,08 (125,43-453,17)	0,040
IL-10	10,16 (4,13-17,44)	5,37 (3,20-9,54)	0,364	1,73 (0,00-3,85)	0,056
TNFα	4,09 (2,87-4,34)	4,23 (4,13-4,27)	0,365	4,09 (4,04-4,11)	0,944
IFNγ	2,14 (1,60-3,81)	0,41 (0,03-1,01)	< 0,001	0,44 (0,16-1,07)	0,007

Примечание. p – между показателями группы доноров и пациентов с эффективной / неэффективной мобилизацией.

Note. p, between indicators of the group of donors and patients with sufficient / insufficient yields.

продуцируется различными клетками (моноцитами, нейтрофилами, фибробластами, эпителиальными и эндотелиальными клетками и другими) в ответ на стимуляцию липополисахаридами, TNFα, GM-CSF [7]. Исследования на животных подтвердили мобилизующие свойства IL-8, даже однократное введение данного цитокина приводило к выходу гемопоэтических предшественников в кровотоки [6].

Заключение

Таким образом, IL-8 можно рассматривать как информативный предиктор возможности получения оптимального количества заготавливаемых ГСК у больных ММ. Низкий уровень его секреции клетками мезенхимы костного мозга ассоциируется с неэффективной мобилизацией ГСК.

Список литературы / References

1. Кострома И.И., Жернякова А.А., Чубукина Ж.В., Запreeва И.М., Тиранова С.А., Сельцер А.В., Семенова Н.Ю., Бессмельцев С.С., Четкин А.В., Грицаев С.В. Заготовка гемопоэтических стволовых клеток у больных множественной миеломой: влияние предшествующей аутоТГСК терапии леналидомидом и режима мобилизации // Клиническая онкогематология, 2018. Т. 11, № 2. С. 192-197. [Kostroma I.I., Zhernyakova A.A., Chubukina Zh.V., Zapreeva I.M., Tiranova S.A., Seltser A.V., Semenova N.Yu., Bessmeltsev S.S., Chechetkin A.V., Gritsaev S.V. Hematopoietic stem cell collection in multiple myeloma patients: influence of the lenalidomide-based therapy and mobilization regimen prior to auto-HSCT. *Klinicheskaya onkogematologiya = Clinical Oncohematology*, 2018, Vol. 11, no. 2, pp. 192-197. (In Russ.)]
2. Ругаль В.И., Бессмельцев С.С., Семенова Н.Ю., Грицаев С.В., Кострома И.И., Енукашвили Н.И., Чубарь А.В., Иволгин Д.А. Характеристика микроокружения костного мозга при множественной миеломе до и после терапии // Сибирский научный медицинский журнал, 2019. Т. 39, № 1. С. 112-118. [Rugal V.I., Bessmeltsev S.S., Semenova N.Yu., Gritsaev S.V., Kostroma I.I., Enuashvili N.I., Chubar A.V., Ivogin D.A. Characteristics of bone marrow microenvironment in multiple myeloma before and after treatment. *Sibirskiy nauchnyy meditsinskiy zhurnal = Siberian Scientific Medical Journal*, 2019, Vol. 39, no. 1, pp. 112-118. (In Russ.)]

3. Федык О.В., Саржевский В.О., Мельниченко В.Я., Дубинина Ю.Н., Мочкин Н.Е., Смирнова Е.Г., Колесникова Д.С., Банникова А.Е. Высокодозная химиотерапия и аутологичная трансплантация у пациентов с лимфомами и множественной миеломой: всем ли удастся получить достаточное количество периферических стволовых кроветворных клеток? // Вестник Национального медико-хирургического Центра им. Н.И. Пирогова. Онкогематология, 2018. Т. 13, № 3. С. 67-71. [Fedyk O.V., Sarzhevskiy V.O., Melnichenko V.Ya., Dubinina Yu.N., Mochkin N.E., Smirnova E.G., Kolesnikova D.S., Bannikova A.E. Autologous transplantation in patients with lymphoproliferative diseases: does everyone manage to get a sufficient number of peripheral hematopoietic stem cells? *Vestnik Natsionalnogo mediko-khirurgicheskogo Tsentra im. N.I. Pirogova. Onkogematologiya = Bulletin of Pirogov National Medical and Surgical Center*, 2018, Vol. 13, no. 3, pp. 67-71. (In Russ.)]
4. Bendall L.J., Bradstock K.F. G-CSF: From granulopoietic stimulant to bone marrow stem cell mobilizing agent. *Cytokine Growth Factor Rev.*, 2014, Vol. 25, no. 4, pp. 355-367.
5. Carreras E., Dufour C., Mohty M., Kröger N., editors. The EBMT Handbook: Hematopoietic Stem Cell Transplantation and Cellular Therapies [Internet]. 7th ed. Cham (CH): Springer; 2019.
6. Laterveer L., Lindley I.J.D., Hamilton M.S., Willemze R., Fibbe W.E. Interleukin-8 induces rapid mobilization of hematopoietic stem cells with radioprotective capacity and long-term myelolymphoid repopulating ability. *Blood*, 1995, Vol. 85, Iss. 8, pp. 2269-2275.
7. Matsushima K., Yang D., Oppenheim J.J. Interleukin-8: An evolving chemokine. *Cytokine*, 2022, Vol. 153, 155828. doi: 10.1016/j.cyto.2022.155828.
8. Morris C.L., Siegel E., Barlogie B., Cottler-Fox M., Lin P., Fassas A., Zangari M., Anaissie E., Tricot G. Mobilization of CD34⁺ cells in elderly patients (>/ = 70 years) with multiple myeloma: influence of age, prior therapy, platelet count and mobilization regimen. *Br. J. Haematol.*, 2003, Vol. 120, pp. 413-423.

Авторы:

Попонина Е.А. — к.м.н., заведующая лабораторией клеточных технологий ФГБУН «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Федерального медико-биологического агентства», г. Киров, Россия

Пестрикова А.О. — лаборант-исследователь лаборатории клеточных технологий ФГБУН «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Федерального медико-биологического агентства», г. Киров, Россия

Назарова Е.Л. — к.м.н., заведующая лабораторией клеточной и молекулярной иммунологии ФГБУН «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Федерального медико-биологического агентства», г. Киров, Россия

Исаева Н.В. — к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории клеточной и молекулярной иммунологии ФГБУН «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Федерального медико-биологического агентства», г. Киров, Россия

Фокина Е.С. — к.м.н., врач-гематолог взрослого отделения гематологии и химиотерапии ФГБУН «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Федерального медико-биологического агентства», г. Киров, Россия

Эндакова А.И. — врач-гематолог взрослого отделения гематологии и химиотерапии ФГБУН «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Федерального медико-биологического агентства», г. Киров, Россия

Минаева Н.В. — к.м.н., заместитель директора по лечебной работе ФГБУН «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Федерального медико-биологического агентства», г. Киров, Россия

Authors:

Poponina E.A., PhD (Medicine), Head, Laboratory of Cell Technologies, Kirov Research Institute of Hematology and Blood Transfusion, Kirov, Russian Federation

Pestrikova A.O., Laboratory Assistant Researcher, Laboratory of Cell Technologies, Kirov Research Institute of Hematology and Blood Transfusion, Kirov, Russian Federation

Nazarova E.L., PhD (Medicine), Head, Laboratory of Cell and Molecular Immunology, Kirov Research Institute of Hematology and Blood Transfusion, Kirov, Russian Federation

Isaeva N.V., PhD (Biology), Senior Research Associate, Laboratory of Cell and Molecular Immunology, Kirov Research Institute of Hematology and Blood Transfusion, Kirov, Russian Federation

Fokina E.S., PhD (Medicine), Hematologist, Adult Department of Hematology and Chemotherapy, Kirov Research Institute of Hematology and Blood Transfusion, Kirov, Russian Federation

Endakova A.I., Hematologist, Adult Department of Hematology and Chemotherapy, Kirov Research Institute of Hematology and Blood Transfusion, Kirov, Russian Federation

Minaeva N.V., PhD (Medicine), Deputy Director for Clinics, Kirov Research Institute of Hematology and Blood Transfusion, Kirov, Russian Federation.

Поступила 28.11.2022
Отправлена на доработку 16.12.2022
Принята к печати 16.02.2023

Received 28.11.2022
Revision received 16.12.2022
Accepted 16.02.2023

ВЛИЯНИЕ ПРОБИОТИЧЕСКОГО ШТАММА *LACTOBACILLUS DELBRUECKII* TS1-06 НА РАЗМЕР ИНФАРКТА МИОКАРДА И ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ ПАРАМЕТРЫ У КРЫС WISTAR С СИНДРОМОМ СИСТЕМНОГО ВОСПАЛИТЕЛЬНОГО ОТВЕТА

**Борщев Ю.Ю.¹, Минасян С.М.^{1,2}, Карасева А.Б.³, Буровенко И.Ю.¹,
Борщев В.Ю.², Борщева О.В.¹, Буровенко Д.В.⁴, Суворов А.Н.^{3,5},
Галагудза М.М.^{1,2}**

¹ ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр имени В.А. Алмазова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

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

³ ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

⁴ ФГАОУ ВО «Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)», Москва, Россия

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

Резюме. Экспериментальная медицина предоставляет научной общественности большой массив сведений о терапевтической эффективности пробиотических штаммов. Однако, с позиции доказательной медицины, перечень нозологий, контролируемых пробиотиками, ограничен антибиотико-ассоциированной диареей у взрослых и детей, диареей, ассоциированной с *Clostridium difficile*, острой инфекционной диареей у детей и взрослых, эрадикационной терапией, язвенным колитом и синдромом раздраженной кишки. В последнее время к этим заболеваниям прибавляются обоснованные рекомендации врачей для применения пробиотических препаратов с целью модулирования иммунитета. В продолжение представленного ряда заболеваний, учитывая проницаемость для патогенной и условно-патогенной микробиоты барьеров ЖКТ и иммунной системы, представляется логичным предположение об эффективности пробиотиков, как симбиотических регуляторов, в отношении нервной и сердечно-сосудистой систем. Также необходимо учитывать, что цивилизационным приобретением в человеческой популяции являются нарушения метаболизма в виде ожирения, с воспали-

Адрес для переписки:

Галагудза Михаил Михайлович
ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр имени В.А. Алмазова» Министерства здравоохранения РФ
197341, Россия, Санкт-Петербург, пр. Пархоменко, 15а.
Тел.: 8 (812) 702-37-00.
Факс: 8 (812) 702-37-01.
E-mail: galagudza@almazovcentre.ru

Address for correspondence:

Mikhail M. Galagudza
V. Almazov National Medical Research Center
15a Parkhomenko Ave
St. Petersburg
197341 Russian Federation
Phone: +7 (812) 702-37-00.
Fax: +7 (812) 702-37-01.
E-mail: galagudza@almazovcentre.ru

Образец цитирования:

Ю.Ю. Борщев, С.М. Минасян, А.Б. Карасева, И.Ю. Буровенко, В.Ю. Борщев, О.В. Борщева, Д.В. Буровенко, А.Н. Суворов, М.М. Галагудза «Влияние пробиотического штамма *Lactobacillus delbrueckii* TS1-06 на размер инфаркта миокарда и иммунологические параметры у крыс Wistar с синдромом системного воспалительного ответа» // Медицинская иммунология, 2024. Т. 26, № 1. С. 127-134.
doi: 10.15789/1563-0625-EOL-2611

© Борщев Ю.Ю. и соавт., 2023

Эта статья распространяется по лицензии Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

Yu. Yu. Borshchev, S.M. Minasian, A.B. Karaseva, I. Yu. Burovenko, V. Yu. Borshchev, O.V. Borshcheva, D.V. Burovenko, A.N. Suvorov, M.M. Galagudza "Effects of *Lactobacillus delbrueckii* TS1-06 probiotic strain on the size of myocardial infarction in Wistar rats with systemic inflammatory response syndrome", *Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2024, Vol. 26, no. 1, pp. 127-134.

doi: 10.15789/1563-0625-EOL-2611

© Borshchev Yu. Yu. et al., 2023

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

DOI: 10.15789/1563-0625-EOL-2611

тельным ответом низкой интенсивности, с характерным цитокиновым паттерном. В этой связи, нами предлагается научная гипотеза об эффективности пробиотических штаммов в отношении увеличения устойчивости миокарда к ишемическому-реперфузионному повреждению, благодаря их способности блокирования отдельных звеньев цитокинового каскада при формировании ответной воспалительной реакции, для последующей трансляции в клиническую практику.

Разработка и валидация новой экспериментальной модели синдрома системного воспалительного ответа (ССВО) на крысах самцах стока Wistar, включающей ожирение, острый воспалительный процесс толстой кишки и антибиотик-индуцированный дисбиоз, стала основой для исследования эффективности пробиотических препаратов в отношении устойчивости миокарда к ишемическому-реперфузионному повреждению (ИРП). У крыс с ССВО обнаружено значимое увеличение размера зоны инфаркта на 28% в экспериментах на изолированном перфузируемом сердце при глобальной ишемии-реперфузии. Существенные изменения лейкоцитарной формулы и иммунологических показателей, сопутствующие ССВО, корректировались введением смеси пробиотических штаммов *L. acidophilus* (LA-5) и *B. animalis subsp. lactis* (BB-12), а также изолированного штамма *L. delbrueckii* TS1-06. У крыс обеих групп с пробиотической коррекцией наблюдали уменьшение зоны инфаркта по сравнению с группой ССВО. Отмечены общие и специфические изменения IL-2, трансформирующего фактора роста- β (TGF- β) и фактора некроза опухолей- α (TNF α). Уменьшение размера инфаркта миокарда при помощи пробиотиков может быть связано с блокированием цитокинов первого порядка, что приводит к «разрыву» провоспалительного каскада. Подтверждена необходимость глубокого исследования механизмов кардиопротекции, опосредованной пробиотиками, в связи с перспективами их применения как симбиотической альтернативы биологическим препаратам, блокирующим основные провоспалительные цитокины.

Ключевые слова: ишемия, реперфузия, сердце, размер инфаркта, кардиопротекция, полиморбидность, синдром системной воспалительной реакции, пробиотики

EFFECTS OF *LACTOBACILLUS DELBRUECKII* TS1-06 PROBIOTIC STRAIN ON THE SIZE OF MYOCARDIAL INFARCTION IN WISTAR RATS WITH SYSTEMIC INFLAMMATORY RESPONSE SYNDROME

Borshchev Yu.Yu.^a, Minasian S.M.^{a, b}, Karaseva A.B.^c, Burovenko I.Yu.^a, Borshchev V.Yu.^b, Borshcheva O.V.^a, Burovenko D.V.^d, Suvorov A.N.^{c, e}, Galagudza M.M.^{a, b}

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

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

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

^d Moscow Physico-Technical Institute, Moscow, Russian Federation

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

Abstract. Experimental medicine provides the scientific community with a plethora of information on therapeutic efficacy of probiotic strains. However, from the point of view of evidence-based medicine, the list of disorders controlled by probiotics is limited to antibiotic-associated diarrhea in adults and children, *Clostridium difficile*-associated diarrhea, acute infectious diarrhea in children and adults, eradication therapy, ulcerative colitis and irritable bowel syndrome. Recently, these indications are also amended by well-validated clinical guidelines for the usage of probiotic preparations, in order to modulate immunity. Given the permeability of gastrointestinal and immune system barriers for pathogenic and opportunistic microbiota, it seems logical to assume the effectiveness of probiotics as potential symbiotic regulators of nervous and cardiovascular systems. It should also be taken into account that metabolic disorders, e.g., obesity, with a low-intensity inflammatory response and characteristic cytokine pattern, are acquired as a gain of human civilization. In this regard, we propose a scientific hypothesis about the effectiveness of probiotic microbial strains in increasing myocardial resistance to ischemic-reperfusion injury, due to their ability to block individual links of the cytokine cascade during the development of inflammatory response, for its subsequent translation into clinical practice.

The development and validation of a new experimental model of systemic inflammatory response syndrome (SIRS) in male Wistar rats, including obesity, acute inflammatory process of the colon, and antibiotic-induced

dysbiosis, became basic to the study of efficacy of probiotic drugs in terms of myocardial resistance to ischemic-reperfusion injury (IRI). Rats with SIRS showed a significantly increased size of the infarction area (+28%) upon experiments with isolated perfused heart under global ischemia-reperfusion conditions. Significant changes in the leukocyte formula and immunological parameters associated with SIRS were corrected by introduction of a mixture of probiotic strains *L. acidophilus* (LA-5) and *B. animalis subsp. lactis* (BB-12), and the isolated strain *L. delbrueckii* TS1-06. In both groups with probiotic correction, there was a decrease in the infarction area compared to the SIRS group. General and specific changes in IL-2, transforming growth factor- β (TGF- β) and tumor necrosis factor- α (TNF α) were noted. The reduction of myocardial infarction by probiotics may be related to the blocking of first-order cytokines, which leads to a «break» of proinflammatory cascade. A need for in-depth study of cardioprotective mechanisms mediated by probiotics was confirmed due to their potential usage as a symbiotic alternative to biological drugs which block the main pro-inflammatory cytokines.

Keywords: ischemia, reperfusion, heart, infarction size, cardioprotection, polymorbidity, systemic inflammatory response syndrome, probiotics

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 18-15-00153).

Введение

К настоящему времени накоплены научные данные о том, что антимикробные (АМП) и пробиотические препараты (ПП), используемые в качестве лечебных и лечебно-профилактических средств, а зачастую и в составе продуктов питания, оказывают как прямое, так и опосредованное влияние на сердечно-сосудистую систему. Важнейшим механизмом опосредованного влияния указанных препаратов является изменение состава кишечной микробиоты [10]. Заслуживают внимания сообщения об эффективном применении АМП при лечении острого коронарного синдрома и инфаркта миокарда [15]. При этом данные метаанализа Song и соавт. об использовании АМП для снижения уровня неблагоприятных исходов у пациентов с сердечно-сосудистыми заболеваниями говорят об отсутствии их эффективности [13]. В литературе практически отсутствуют научно обоснованные данные о влиянии ПП на устойчивость миокарда к ишемическому и реперфузионному повреждению. Нами была показана отмена кардиопротективного эффекта тетрациклина, характерного для здоровых животных, при моделировании полиморбидности [6], что послужило основой для гипотезы о взаимосвязи воспалительного статуса макроорганизма, состава его микробиоты и устойчивости миокарда к ишемии-реперфузии. Общей патогенетической базой таких нарушений, как ожирение, химически индуцированный колит и антибиотик-индуцированный дисбиоз (АИД), является системный воспалительный ответ с большей или меньшей степенью интенсивности увеличения концентрации в крови таких провоспалительных цитокинов, как IL-1, IL-6, IL-18, IFN γ и TNF α . С целью изучения кардиотропных эффектов ПП и их возможных механизмов, нами была разработана экспериментальная модель полиморбидности и синдрома системного воспалительного ответа (ССВО) на крысах, которая включает вышеуказанные патологии [1].

Целью данной работы стало изучение терапевтического потенциала пробиотического штамма *L. delbrueckii* TS1-06 на устойчивость миокарда к ишемическому-реперфузионному повреждению, с контролем уровней TNF α , TGF- β , IL-1 β , IL-2 и IL-6 на фоне первичного висцерального ожирения (ПВО), АИД и ВЗК. Рабочей гипотезой стало предположение о возможной модуляции цитокинового каскада, лежащего в основе ССВО, пробиотическими штаммами. В данной работе на модели ССВО на крысах стока Wistar использовали методику перфузии изолированного сердца по Лангендорфу с моделированием глобальной ишемии-реперфузии.

Материалы и методы

Эксперименты выполнены на 40 крысах-самцах стока Wistar (Пушино) в условиях вивария с улучшенным конвенциональным статусом массой 240-270 г, в соответствии с Директивой Европейского Совета по соблюдению этических принципов в работе с лабораторными животными, согласно дизайну эксперимента, утвержденного решением биоэтического комитета ФГБУ НМИЦ им. В.А. Алмазова Минздрава России (протокол-заявка 21-09ПЗ#V1 от 21.05.2021). Животные случайным образом распределялись в одну из четырех групп (n = 10 в каждой группе): 1) контроль (КТР) – крысы получали стандартный корм и питьевую воду *ad libitum*. Все манипуляции с внутрижелудочным (в/ж) введением проводились аналогично с введением адекватных объемов физиологического раствора (ФР); 2) синдром системного воспалительного ответа (ССВО) – крысам с ПВО, индуцированным жироклеточной диетой, осуществляли однократное ректальное введение 1 мл смеси 3%-ной уксусной кислоты и 3% этанола в ФР. Начиная со следующего дня, животным внутрижелудочно вводили смесь АМП (амоксциллин, метронидазол и кларитромицин) в суточной дозе по 15 мг каждого АМП на крысу в течение трех дней, что провоцировало АИД; 3) ССВО + ЛВС – вместо 1 мл ФР в течение 10 дней вводили 1 мл раствора смеси пробиотических штаммов *Lactobacillus acidophilus* (LA-5) и *Bifidobacterium animalis subsp.*

lactis (BB-12), в концентрации не менее 10^8 колониобразующих единиц (КОЕ) каждого штамма на одно животное; 4) ССВО + ЛКД – животным с ССВО внутрижелудочно вводили штамм *L. delbrueckii* TS1-06 в 1 мл ФР в дозе не менее 10^8 КОЕ лиофилизированных микроорганизмов.

За день до выведения из опыта у крыс под краткосрочным изофлурановым наркозом брали 1 мл цельной крови из большой подкожной вены для гематологического и иммунологического анализа. Клинический анализ крови выполняли на автоматическом ветеринарном гематологическом анализаторе (URIT-3000 Vet Plus, Китай). Уровень TNF α , TGF- β , IL-1 β , IL-2 и IL-6 оценивали иммуноферментным методом (MR-96A, Mindray, Китай).

На следующий день крысам под золетил-ксилазиновым наркозом вскрывали грудную клетку и удаляли сердце для последующей перфузии на модернизированной установке по Лангендорфу. В течение 30-минутной глобальной ишемии и 120-минутной перфузии изолированного сердца регистрировали частоту сердечных сокращений (уд/мин), коронарный поток (мл/мин), величины конечно-диастолического (КДДЛЖ, мм рт. ст.) и систолического (СДЛЖ, мм рт. ст.) давления в левом желудочке на персональном компьютере с помощью программы PhysExp 3.0. После завершения реперфузии осуществляли планиметрическую оценку размера инфаркта путем окраски срезов сердца 1%-ным трифенилтетразолием хлоридом. Размер инфаркта выражали в процентах от общей площади среза и вычисляли среднее значение для данного сердца по результатам анализа 5 срезов [12]. Посмертно измерялся массовый коэффициент (МК) депозитов висцерального жира для контроля ПВО. Также отбирались пробы фекалий для генетического исследования толстокишечной микробиоты. Использовали метод ПЦР-РВ с использованием реагентов для выделения ДНК (QIAamp DNA Stool Mini Kit, США, Интерлаб-сервис) и комплекта реагентов «Колонофлор-16» ООО «Альфалаб». В качестве данных для анализа использовались расчетные значения КОЕ/мл для каждой из определяемых групп бактерий методом ПЦР-РВ. На протяжении всего эксперимента, ежедневно с 9 до 10 утра проводили оценку клинического статуса животных, потребления корма и воды, а также массы тела животных.

Данные представлены в виде медианы и интерквартильного размаха – Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$) %. Масса тела, потребление корма и воды представлены в виде «среднее \pm стандартное отклонение». Статистический анализ полученных результатов проводился с использованием критерия ANOVA (программный пакет STATISTICA 12.0), при значимости различий $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Масса тела крыс в группе КТР в течение всего периода наблюдения в среднем увеличивалась на

$1,53 \pm 0,39$ г/сутки, тогда как в группах с высококалорийной диетой – до дня моделирования ОВТК, на $1,71 \pm 0,23$ г/сутки. За 8 дней до окончания опыта в группе КТР масса увеличилась на 4,4%, в группе ССВО – уменьшилась на 1,4%, а в группах ССВО + ЛБС и ССВО + ЛКД – стала больше на 3,2% и 2,4% соответственно. Потребление воды за этот же период из расчета на 100 г массы тела в группе КТР составило $12,4 \pm 4,3$ мл/сутки, а в группе ССВО – $12,7 \pm 3,5$ мл/сутки, тогда как в группах ССВО + ЛБС и ССВО + ЛКД – $10,2 \pm 4,8$ мл/сутки и $9,9 \pm 4,2$ мл/сутки соответственно, что значимо не отличалось от КТР. Потребление корма в группах ССВО, ССВО + ЛБС, ССВО + ЛКД было меньше на 60% по сравнению с КТР ($p < 0,05$). МК депозитов висцерального жира по отношению к КТР в группах ССВО, ССВО + ЛБС и ССВО + ЛКД был больше на 29%, 35% и 23% ($p < 0,05$) соответственно, что подтвердило наличие ПВО.

В таблице 1 приведены показатели клинического анализа крови. В группе ССВО показано увеличение общего числа лейкоцитов (WBC) на 26% ($p < 0,05$), причем существенный вклад внесла субпопуляция лимфоцитов (LYM) с увеличением на 42% ($p < 0,05$), средних лейкоцитов (MID) на 50% ($p < 0,05$) и гранулоцитов (GRAN) на 35% ($p < 0,05$), по отношению к КТР. В группах ССВО + ЛБС и ССВО + ЛКД по сравнению с ССВО значения LYM остались на прежнем уровне, но MID уменьшились до контроля, а GRAN значимо от него не отличались. Во всех группах с моделированием ССВО отмечен значимый рост тромбоцитов более чем на 20% ($p < 0,05$). Значимых изменений числа эритроцитов и их характеристик в опытных группах по отношению к контролю не отмечено.

В группе ССВО по сравнению с КТР было обнаружено значимое ($p < 0,05$) увеличение концентрации в крови TNF α , TGF- β , IL-1 β , IL-2 и IL-6 (табл. 2). Так, концентрация TNF α в крови стала больше на 46%, TGF- β – на 29%, IL-1 β – на 30%, IL-2 – на 56% и IL-6 – на 56%, чем в контроле ($p < 0,05$). В группах ССВО + ЛБС и ССВО + ЛКД уровень TGF- β увеличился более чем на 100% и 23%, а IL-2 – на 47% и 72% соответственно. В группе ССВО + ЛКД, в отличие от ССВО + ЛБС, увеличение концентрации TNF α на 59% было значимым. Показатели для IL-1 β и IL-6 в обеих группах с пробиотической терапией достоверно не отличались от КТР.

В группах с моделированием ССВО под влиянием АМП широкого спектра действия пробиотическая терапия не способствовала увеличению популяций *Faecalibacterium prausnitzii*, *Akkermansia mucinifila* и *Enterobacter* spp.

Очевидно, что увеличение роста *Bacteroides* spp. в группах с введением пробиотиков по отношению к КТР внесло решающий вклад в достоверное увеличение числа общей бактериальной массы, но также значимому росту непатогенных *Escherichia coli*. Во всех группах с моделированием

ТАБЛИЦА 1. ГЕМАТОЛОГИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75}) %

TABLE 1. HEMATOLOGICAL PARAMETERS, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75}) %

Параметр Parameter	Группа Group	КТР CTR	ССВО SIRS	ССВО + ЛБС SIRS + LBS	ССВО + ЛКД SIRS + LCD
WBC 10 ⁹ /л WBC 10 ⁹ /L		7,2 (6,8-7,6)	9,1 (8,0-10,1)* ↑	8,3 (8,4-8,7)	8,2 (7,8-8,6)
LYM 10 ⁹ /л LYM 10 ⁹ /L		1,0 (1,5-1,8)	1,7 (1,5-1,8)* ↑	1,6 (1,5-1,7)* ↑	1,7 (1,5-18,0)* ↑
MID 10 ⁹ /л MID 10 ⁹ /L		0,3 (0,2-0,4)	0,6 (0,5-0,6)* ↑	0,3 (0,3-0,5)** ↓	0,4 (0,3-0,4)** ↓
GRAN 10 ⁹ /л GRAN 10 ⁹ /L		5,1 (4,4-5,4)	6,9 (6,3-7,4)* ↑	6,2 (5,8-6,3)	5,9 (5,2-7,0)
RBC 10 ¹² /л RBC 10 ¹² /L		7,1 (7,0-7,2)	6,8 (6,6-7,1)	6,7 (6,5-6,8)	6,8 (6,5-7,0)
PLT 10 ⁹ /л PLT 10 ⁹ /L		515 (505-522)	688 (631-775)* ↑	700 (682-705)* ↑	616 (610-700)* ↑

Примечание. * – p < 0,05 по отношению к КТР; ** – p < 0,05 по отношению к ССВО (критерий ANOVA). ↑ – увеличение показателя; ↓ – уменьшение показателя. КТР – контроль; ССВО – синдром системной воспалительной реакции; ССВО + ЛБС – ССВО и смесь LA-5 и ВВ-12; ССВО + ЛКД – *L. delbrueckii* TS1-06.

Note. *, p < 0.05 in relation to CTR; **, p < 0.05 in relation to SIRS (ANOVA test). ↑, increase of the index; ↓, decrease of the index. CTR, control; SIRS, systemic inflammatory response syndrome; SIRS + LBS, SIRS and a mixture of LA-5 and BB-12; SIRS + LCD, *L. delbrueckii* TS1-06.

ТАБЛИЦА 2. КОНЦЕНТРАЦИЯ ЦИТОКИНОВ В КРОВИ, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75}) %

TABLE 2. CONCENTRATION OF CYTOKINES IN BLOOD, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75}) %

Параметр Parameter	Группа Group	КТР CTR	ССВО SIRS	ССВО + ЛБС SIRS + LBS	ССВО + ЛКД SIRS + LCD
TNFα (пг/мл) TNFα (pg/mL)		8,2 (7,8-8,5)	12 (10-13)* ↑	10 (8-14)	13 (11-15)* ↑
TGF-β1 (пг/мл) TGF-β1 (pg/mL)		7,1 (6,7-7,5)	9,2 (8,5-9,8)* ↑	15 (14-15)* ↑ **	8,7 (8,2-9,1)* ↑
IL-1β (пг/мл) IL-1β (pg/mL)		40 (39-42)	52 (44-57)* ↑	44 (41-47)** ↓	46 (41-47)
IL-2 (пг/мл) IL-2 (pg/mL)		3,6 (3,5-3,8)	5,6 (4,8-5,9)* ↑	5,3 (5,0-7,1)* ↑	6,2 (5,7-6,4)* ↑
IL-6 (пг/мл) IL-6 (pg/mL)		0,5 (0,4-0,6)	1,0 (0,9-1,1)* ↑	0,7 (0,6-0,8)** ↓	0,7 (0,6-0,8)** ↓

Примечание. См. примечание к таблице 1.

Note. As for Table 1.

ем ССВО по отношению к контролю отмечено уменьшение представительства лактобактерий. Выраженный бифидогенный эффект наблюдали исключительно в группе ССВО + ЛБС, с введением смеси лакто- и бифидобактерий, что показано в таблице 3.

Размер инфаркта в группе КТР составил 43% (39-46). В группе ССВО размер инфаркта 55% (51-60) был выше на 28%, чем в группе КТР (p < 0,05). В группах ССВО + ЛБС и ССВО + ЛКД размер инфаркта миокарда составил 49% (42-56) и 47% (42-52) (p < 0,05 в сравнении с груп-

пой ССВО) соответственно, что указывает на наличие эффекта кардиопротекции в этих группах.

В настоящее время ожирение рассматривается как самостоятельный иммуновоспалительный процесс [7] и признается фактором риска для ряда патологий [14] с характерным паттерном гиперцитокинемии. Степень тяжести язвенного колита наиболее интенсивно коррелирует с концентрацией в крови провоспалительных цитокинов TNFα и IL-6 [2]. TNFα стимулирует выработку IL-6, поэтому функции и биологические эффекты IL-6 совпадают с функциями его активатора.

ТАБЛИЦА 3. БАКТЕРИАЛЬНЫЙ СОСТАВ МИКРОБИОТЫ ФЕКАЛИЙ КРЫС ИЗ РАЗЛИЧНЫХ ГРУПП (ПЦР-РВ)

TABLE 3. BACTERIAL COMPOSITION OF MICROBIOTA IN THE FAECES OF RATS FROM DIFFERENT GROUPS (RT-PCR)

Группа Group	КТР CTR	ССВО SIRS	ССВО + ЛБС SIRS + LBS	ССВО + ЛКД SIRS + LCD
Общее бактериальное число Total bacterial count	8,5 ¹⁰ (3,0 ¹⁰ -1,0 ¹¹)	5,0 ⁹ (3,0 ⁹ -8,0 ⁹)	2,0 ^{12*} , ** ↑ (1,6 ¹² -3,0 ¹²)	1,2 ^{12*} , ** ↑ (6,0 ¹⁰ -2,5 ¹²)
<i>Lactobacillus spp.</i>	1,0 ⁹ (3,0 ⁸ -2,0 ⁹)	2,0 ^{7*} ↓ (1,5 ⁷ -2,5 ⁸)	1,0 ^{8*} ↓ (4,0 ⁷ -1,9 ⁸)	7,5 ^{7*} ↓ (1,0 ⁷ -1,0 ⁸)
<i>Bifidobacterium spp.</i>	3,2 ⁷ (9,5 ⁶ -5,5 ⁷)	1,6 ⁹ (2,5 ⁸ -2,9 ⁹)	4,1 ^{9*} ↑ (3,0 ⁹ -7,5 ⁹)	8,5 ⁸ (2,5 ⁸ -1,7 ⁹)
<i>Escherichia coli</i>	3,2 ⁷ (9,5 ⁶ -5,5 ⁷)	1,6 ⁸ (1,0 ⁸ -3,0 ⁹)	4,9 ^{9*} ↑ (3,0 ⁹ -9,0 ⁹)	8,5 ^{8*} ↑ (2,5 ⁸ -1,7 ⁹)
<i>Bacteroides spp.</i>	4,5 ¹⁰ (1,5 ¹⁰ -1,0 ^{*11})	1,9 ⁹ (8,0 ⁸ -2,0 ⁹)	2,2 ^{12*} ↑ (1,1 ¹² -2,5 ¹²)	1,4 ^{12*} ↑ (5,2 ¹⁰ -2,5 ¹²)

Примечание. См. примечание к таблице 1.

Note. As for Table 1.

Оба цитокина опосредуют воспалительные реакции – лихорадку, лейкоцитоз и индукцию синтеза белков острой фазы [9]. Цитокиновый шторм характеризуется значительным и длительным увеличением концентрации в крови провоспалительных цитокинов – IL-1, IL-6, IL-18, IFN γ и TNF α [8]. Патогенез цитокинового шторма связан с избыточным эффектом цитокинов на клетки и возникающим при этом вторичным повреждением органов-мишеней.

Известно, что острый стресс снижает у пациентов содержание лактобацилл и бифидобактерий в кишечнике в течение нескольких дней [4]. В нашей работе помимо прямой корреляции между уменьшением размера инфаркта и концентрацией IL-1 β и IL-6, наблюдается ассоциативная связь с увеличением общего бактериального числа, представительства *Bifidobacterium spp.*, *Escherichia coli* и *Bacteroides spp.* Установлено, что бифидофлора снижает уровень факторов роста, антилизоцимную активность и формирование биопленок такой патогенной флоры, как *Klebsiella pneumoniae*, *S. aureus*, *C. albicans* [11]. Кишечная нормобиота в норме подавляет рост патогенной флоры, оказывает стимулирующее антигенное воздействие на слизистую оболочку кишечника и потенцирует механизмы общего и локального иммунитета, стимулируя синтез иммуноглобулинов, пропердина, комплемента, лизоцима, посредством таких медиаторов, как короткоцепочечные жирные кислоты, перекись водорода, бактериоцины. По мере роста численности бактерий в колонии концентрация сигнальных молекул в окружающей среде возрастает лавинообразно по принципу положительной обратной связи [3]. Корректно согласуются позитивные иммунотропные и кардиопротективные эффекты с ростом бифидо- и лактобактерий по

сравнению с ССВО в группах ССВО + ЛБС и ССВО + ЛКД. Гармонизация естественного антагонизма с помощью пробиотической терапии подтверждается сочетанным увеличением представительства популяций кишечной палочки и бифидобактерий. Одни и другие грамотрицательные микроорганизмы, потенциальные источники ЛПС, помимо других перекрытий в метаболоме, принимают активное участие в метаболизме первичных желчных кислот и являются продуцентами КЦКЖ, а также янтарной кислоты.

Известны два основных воспалительных фенотипа макрофагов. Фенотип M1 активируется сигналом поляризации от бактериального липополисахарида и провоспалительных Th1-цитокинов, таких как IFN γ , TNF α и IL-1 β , или обоих, в то время как фенотип M2 активируется Th2-цитокинами, такими как IL-4 и IL-13, а также противовоспалительными цитокинами, IL-10 и TGF- β , или глюкокортикоидами. Также интересно, что экспрессия мРНК IL-1 β в макрофагах M1, стимулированных LPS, приводит к активации фактора транскрипции, индуцированного гипоксией, фактора 1 α (HIF-1 α), зависимым от гликолиза. HIF1 α взаимодействует с изоферментом пируваткиназы M2 (PKM2) и способствует экспрессии HIF1 α -индуцированных генов, необходимых для гликолиза. Активация эффекта Варбурга (гликолиз) в LPS-стимулированных макрофагах вызывает накопление промежуточных продуктов цикла ТСА, в частности сукцината, малата и фумарата, из-за отклонения потока или «точки разрыва» пути цикла Кребса [5]. Пробиотически индуцированное уменьшение, в нашем опыте, IL-1 β , подтвержденное снижением уровня IL-6, учитывая общий характер цитокинового сигналинга, может стать базовым в дальнейшем исследовании в отношении кардиомиоцитов,

учитывая увеличение популяции кишечной палочки и бактероидов как источника КЦКЖ. Данные предположения подтверждаются нашими предыдущими исследованиями, показывающими связь между устойчивостью миокарда к ишемии-реперфузии и концентрацией в крови желчных кислот и КЦКЖ [1].

Заключение

По отношению к животным с ССВО, у крыс после введения смеси пробиотических штаммов *L. acidophilus* (LA-5) и *B. animalis subsp. lactis* (BB-12) и изолированного штамма *L. delbrueckii* TS1-06 отмечено общее уменьшение субпопуля-

ции MID и GRAN, концентрации IL-1 β и IL-6 в крови, при увеличении представительства эшерихий и бактероидов в составе кишечной микробиоты с увеличением резистентности миокарда к ишемии-реперфузии, что подтверждает нашу гипотезу о пробиотическом блокировании цитокинов первого порядка, что сопровождается ослаблением интенсивности провоспалительного каскада. Подтверждена необходимость глубокого исследования механизмов пробиотической кардиопротекции в связи с перспективами их применения как симбиотической альтернативы биологическим препаратам, снижающим уровни провоспалительных цитокинов.

Список литературы / References

1. Борщев Ю.Ю., Буровенко И.Ю., Карасева А.Б., Минасян С.М., Борщев В.Ю., Семенова Н.Ю., Борщева О.В., Половинкин В.В., Родионов Г.Г., Суворов А.Н., Галагудза М.М. Моделирование синдрома системной воспалительной реакции химической индукцией травмы толстого кишечника у крыс // Медицинская иммунология, 2020. Т. 22, № 1. С. 87-98. [Borshev Yu.Yu., Burovenko I.Yu., Karaseva A.B., Minasyan S.M., Borshev V.Yu., Semenova N.Yu., Borshcheva O.V., Polovinkin V.V., Rodionov G.G., Suvorov A.N., Galagudza M.M. Modeling of systemic inflammatory response syndrome by chemical induction of colon injury in rats. *Meditinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2020, Vol. 22, no. 1, pp. 87-98. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-MOS-1839.
2. Третьякова Ю.И., Антипова А.А., Шулькина С.Г. Особенности цитокинового профиля у больных язвенным колитом // Современные проблемы науки и образования, 2017. № 6. [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://science-education.ru/ru/article/view?id=27276>. [Tretyakova Yu.I., Antipova A.A., Shulkina S.G. Features of the cytokine profile in patients with ulcerative colitis. *Sovremennye problemy nauki i obrazovaniya = Modern Problems of Science and Education*, 2017, no. 6. [Electronic resource]. Access mode: <https://science-education.ru/ru/article/view?id=27276>. (In Russ.)]
3. Хавкин А.И., Комарова О.Н. Продукты метаболизма кишечной микрофлоры: возможна ли избирательная коррекция? Вопросы современной педиатрии, 2015. Т. 14, № 2. С. 212-218. [Khavkin A.I., Komarova O.N. Products of Metabolism of the Intestinal Microflora: Can We Use the Selective Correction? *Voprosy sovremennoy pediatrii = Current Pediatrics*, 2015, Vol. 14, no. 2, pp. 212-218. (In Russ.)]
4. Bailey M.T., Coe C.L. Maternal separation disrupts the integrity of the intestinal microflora in infant rhesus monkeys. *Dev. Psychobiol.*, 1999, Vol. 35, pp. 146-155.
5. Belizário J.E., Faintuch J., Garay-Malpartida M. Gut microbiome dysbiosis and immunometabolism: new frontiers for treatment of metabolic diseases. *Mediators Inflamm.*, 2018, Vol. 2018, 2037838. doi: 10.1155/2018/2037838.
6. Borshchev Y.Y., Minasian S.M., Protsak E.S., Semenova N.Y., Borshcheva O.V., Galagudza M.M., Burovenko I.Y., Borshchev V.Y. Effects of tetracycline on myocardial infarct size in obese rats with chemically-induced colitis. *PLoS One*, 2019, Vol. 14, no. 11, e0225185. doi: 10.1371/journal.pone.0225185.
7. Breton E., Fotso Soh J., Booi L. Immunoinflammatory processes: Overlapping mechanisms between obesity and eating disorders? *Neurosci. Biobehav. Rev.*, 2022, Vol. 138, 104688. doi: 10.1016/j.neubiorev.2022.104688.
8. de Leeuw A., Oude Luttikhuis M., Wellen A.C., Müller C., Calkhoven C.F. Obesity and its impact on COVID-19. *J. Mol. Med. (Berl.)*, 2021, Vol. 99, no. 7, pp. 899-915.
9. Emmrigh J. Monoclonal antibodies and interleukins. *Falk Sympos. (Innovative concepts in inflammatory bowel disease)*, 2002, no. 105, p. 74.
10. Ettinger G., MacDonald K., Reid G., Burton J.P. The influence of the human microbiome and probiotics on cardiovascular health. *Gut Microbes*, 2014, Vol. 5, no. 6, pp. 719-728.
11. Kumari A., Pasini P., Deo S.K., Flomenhoft D., Shashidhar H., Daunert S. Biosensing systems for the detection of bacterial quorum signaling molecules. *Anal. Chem.*, 2006, Vol. 78, no. 22, pp. 7603-7609.
12. Minasian S.M., Galagudza M.M., Dmitriev Y.V., Kurapeev D.I., Vlasov T.D. Myocardial protection against global ischemia with Krebs-Henseleit buffer-based cardioplegic solution. *J. Cardiothorac. Surg.*, 2013, Vol. 8, 60. doi: 10.1186/1749-8090-8-60.
13. Song Z., Brassard P., Brophy J.M. A meta-analysis of antibiotic use for the secondary prevention of cardiovascular diseases. *Can. J. Cardiol.*, 2008, Vol. 24, no. 5, pp. 391-395.
14. Wise J. Covid-19: Highest death rates seen in countries with most overweight populations. *BMJ*, 2021, Vol. 372, n623. doi: 10.1136/bmj.n623.
15. Zahn R., Schneider S., Frilling B., Seidl K., Tebbe U., Weber M., Gottwik M., Altmann E., Seidel F., Rox J., Höffler U., Neuhaus K.L., Senges J., Working Group of Leading Hospital Cardiologists. Antibiotic therapy after acute myocardial infarction: a prospective randomized study. *Circulation*, 2003, Vol. 107, no. 9, pp. 1253-1259.

Авторы:

Борщев Ю.Ю. — заведующий научно-исследовательским отделом токсикологии Института экспериментальной медицины ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр имени В.А. Алмазова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Минасян С.М. — к.м.н., старший научный сотрудник научно-исследовательского отдела микроциркуляции и метаболизма миокарда ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр имени В.А. Алмазова» Министерства здравоохранения РФ; старший научный сотрудник ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Карасева А.Б. — научный сотрудник научно-исследовательского отдела молекулярной микробиологии ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

Буровенко И.Ю. — младший научный сотрудник научно-исследовательского отдела токсикологии ЦДТИ ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр имени В.А. Алмазова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

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

Борщева О.В. — младший научный сотрудник научно-исследовательского отдела токсикологии ЦДТИ ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр имени В.А. Алмазова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Буровенко Д.В. — начальник управления по довузовской подготовке и международной деятельности МФТИ, ассистент кафедры общей физики ФГАОУ ВО «Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)», Москва, Россия

Суворов А.Н. — д.м.н., член-корр. РАН, заведующий научно-исследовательским отделом молекулярной микробиологии ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины»; заведующий кафедрой фундаментальной медицины и медицинских технологий» ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет», Санкт-Петербург, Россия

Галагудза М.М. — д.м.н., профессор, член-корр. РАН, директор Института экспериментальной медицины ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр имени В.А. Алмазова» Министерства здравоохранения РФ; профессор ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Authors:

Borshchev Yu. Yu., Head, Department of Toxicology, V. Almazov National Medical Research Center, St. Petersburg, Russian Federation

Minasian S. M., PhD (Medicine), Senior Research Associate, Research Laboratory of Microcirculation and Myocardial Metabolism, V. Almazov National Medical Research Center, St. Petersburg; Senior Research Associate, First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Karaseva A. B., Research Associate, Department of Molecular Microbiology, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

Burovenko I. Yu., Junior Research Associate, Department of Toxicology, V. Almazov National Medical Research Center, St. Petersburg, Russian Federation

Borshchev V. Yu., Student, First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Borshcheva O. V., Junior Research Associate, Department of Toxicology, V. Almazov National Medical Research Center, St. Petersburg, Russian Federation

Burovenko D. V., Head, Department for Preuniversity Training and International Affairs, Assistant of the Department of General Physics, Moscow Physico-Technical Institute, Moscow, Russian Federation

Suvorov A. N., PhD, MD (Medicine), Corresponding Member, Russian Academy of Sciences, Head, Research Department of Molecular Microbiology, Institute of Experimental Medicine; Head, Department of Fundamental Medicine and Medical Technologies, St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russian Federation

Galagudza M. M., PhD, MD (Medicine), Professor, Corresponding Member, Russian Academy of Sciences, Director, Institute of Experimental Medicine, V. Almazov National Medical Research Center, St. Petersburg; Professor, First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Поступила 12.11.2022

Отправлена на доработку 20.11.2022

Принята к печати 16.02.2023

Received 12.11.2022

Revision received 20.11.2022

Accepted 16.02.2023

ПОВЫШЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ ТИРОЗИНОВОЙ ПРОТЕИНФОСФАТАЗЫ (CD45) НА ПОВЕРХНОСТИ ГРАНУЛОЦИТОВ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА ПОД ВЛИЯНИЕМ ВАКЦИННОГО ШТАММА *YERSINIA PESTIS* EV НИИЭГ *EX VIVO* И *IN VIVO*

Кравцов А.Л., Ключева С.Н., Кожевников В.А., Бугоркова С.А.

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

Резюме. Тирозиновая протеинфосфатаза (общий лейкоцитарный антиген CD45) регулирует FcγR-опосредованную передачу клеточных сигналов и секреторную функцию нейтрофильных гранулоцитов (НГ) при взаимодействии с иммунными комплексами антиген-антитело. Цель работы – изучить изменения в экспрессии CD45 на поверхности гранулоцитов крови человека при моделировании бактериемии *ex vivo* живыми клетками вакцинного штамма *Yersinia pestis* EV НИИЭГ и оценить праймирующий эффект вакцины чумной живой (ВЧЖ) в условиях *in vivo* по данному показателю. Плотность экспрессии CD45 на НГ определяли методом проточной цитометрии в условных единицах интенсивности флуоресценции (MFI) после окраски клеток реагентом меченых мышинных антител CD45-FITC (Beckman Coulter, США) при иммунофенотипировании лейкоцитов крови по Lyse/No Wash протоколу. У ранее не прививавшихся против чумы доноров (группа 1) значение показателя оценивали до и через 30 мин, 2 ч, 6 ч после добавления в цельную кровь клеток *Y. pestis* EV в дозе 10⁸ мк/мл, а также через 1 и 6 месяцев после противочумной вакцинации. У лиц, ранее неоднократно прививавшихся ВЧЖ по эпидемиологическим показаниям (группа 2), экспрессию CD45 на гранулоцитах крови определяли перед очередной прививкой и через 1, 6 месяцев спустя. Попадая в кровь человека, живые клетки вакцинного штамма *Y. pestis* EV уже через 30 мин индуцировали изменение фенотипа НГ, связанное с повышением в 3,5 раза поверхностной экспрессии CD45, которое сохранялось на достигнутом уровне в течение 6 ч. Интенсивность функциональной активации клеток врожденного иммунитета по исследуемому показателю в опытах *ex vivo* зависела от степени устойчивости чумного микроба к фагоцитозу и киллингу НГ. *In vivo* аналогичный стимулирующий эффект на НГ периферической крови человека оказывала противочумная вакцинация. Под влиянием ВЧЖ экспрессия CD45 повышалась на НГ крови в группах 1 и 2 через месяц после прививки и изменения сохранялись у добровольцев в течение 6 месяцев. Полученные в работе экспериментальные данные могут отражать результат прайминга НГ липополисахаридом и другими антигенами *Y. pestis*. Зарегистрированная функциональная активация

Адрес для переписки:

Ключева Светлана Николаевна
ФКУН «Российский научно-исследовательский
противочумный институт “Микроб”»
410005, Россия, г. Саратов, ул. Университетская, 46.
Тел.: 8 (987) 830-50-75.
E-mail: klyueva.cvetlana@mail.ru

Address for correspondence:

Svetlana N. Klyueva
Russian Research Anti-Plague Institute “Microbe”
46 Universitetskaya St
Saratov
410005 Russian Federation
Phone: +7 (987) 830-50-75.
E-mail: klyueva.cvetlana@mail.ru

Образец цитирования:

А.Л. Кравцов, С.Н. Ключева, В.А. Кожевников,
С.А. Бугоркова «Повышение экспрессии тирозиновой
протеинфосфатазы (CD45) на поверхности
гранулоцитов крови человека под влиянием вакцинного
штамма *Yersinia pestis* EV НИИЭГ *ex vivo* и *in vivo*»
// Медицинская иммунология, 2024. Т. 26, № 1.
С. 135-142. doi: 10.15789/1563-0625-IEO-2649

© Кравцов А.Л. и соавт., 2024

Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

A.L. Kravtsov, S.N. Klyueva, V.A. Kozhevnikov,
S.A. Bugorkova “Increased expression of tyrosine protein
phosphatase (CD45) on the surface of human blood
granulocytes under the influence of the plague microbe vaccine
strain *Yersinia pestis* EV NIIEG *ex vivo* and *in vivo*”, *Medical
Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2024,
Vol. 26, no. 1, pp. 135-142.
doi: 10.15789/1563-0625-IEO-2649

© Kravtsov A.L. et al., 2024

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

DOI: 10.15789/1563-0625-IEO-2649

НГ по экспрессии тирозиновой протеинфосфатазы, вероятно, свидетельствует о формировании под влиянием ВЧЖ «иммунной памяти» на уровне рецепторов клеток врожденного иммунитета, функционированием которой объясняют развитие более быстрого и интенсивного антигенспецифического иммунного ответа на повторное введение в организм чумной вакцины.

Ключевые слова: вакцинный штамм *Yersinia pestis* EV НИИЭГ, тирозиновая протеинфосфатаза CD45, противочумная вакцинация, экспрессия CD45 нейтрофилами, проточная цитометрия

INCREASED EXPRESSION OF TYROSINE PROTEIN PHOSPHATASE (CD45) ON THE SURFACE OF HUMAN BLOOD GRANULOCYTES UNDER THE INFLUENCE OF THE PLAGUE MICROBE VACCINE STRAIN *YERSINIA PESTIS* EV NIIEG *EX VIVO* AND *IN VIVO*

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

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

Abstract. Tyrosine protein phosphatase (common leukocyte antigen CD45) regulates Fc γ R-mediated cell signaling and secretory function of neutrophilic granulocytes (NG) when interacting with antigen-antibody immune complexes. The aim of present work was to study changes in CD45 expression on the surface of human granulocytes in *ex vivo* modeling of bacteremia by live cells of the plague microbe vaccine strain *Yersinia pestis* EV NIIEG, and to evaluate the priming *in vivo* effect of the live plague vaccine (LPV) in terms of this parameter. The expression density of CD45 on NG was determined by flow cytometry as arbitrary units of fluorescence intensity (MFI) after staining the cells with the CD45-FITC labeled murine antibody reagent (Beckman Coulter, USA) upon immunophenotyping of blood leukocytes according to the Lyse/No Wash protocol. This index in blood donors previously not vaccinated against plague (group 1) was quantitatively assessed before and at different terms (30 min, 2 h, 6 h) after the addition of *Y. pestis* EV cells to whole blood at a dose of 10⁸ mc/mL, as well as 1 month and 6 months after the primary anti-plague vaccination. In the individuals previously repeatedly vaccinated with LPV by epidemiological reasons (group 2), CD45 expression was studied on blood granulocytes one year after the last annual vaccination, and then 1 month and 6 months after revaccination. Upon incubation with human blood, the living cells of the *Y. pestis* EV vaccine strain induced a change in the NC phenotype already after 30 minutes, associated with a 3.5-fold increase in the surface expression of CD45, which remained at an elevated level for 6 hours. The studied index depended *ex vivo* on the degree of resistance of plague microbes to phagocytosis and killing of NG. Plague vaccination had a similar stimulating effect on human peripheral blood NG *in vivo*. Under the influence of live plague vaccine, an increased CD45 expression on blood NG in groups 1 and 2 was detected one month after vaccination, and these changes persisted in volunteers for 6 months. The experimental data obtained in this study may reflect the result of NG priming with lipopolysaccharide and other *Y. pestis* antigens. The registered functional activation of NG by expression of tyrosine protein phosphatase probably suggests the formation of "immune memory" at the level of innate immunity cells under the influence of live plague vaccine. Such effect explains the development of faster and more intense antigen-specific immune response to repeated introduction of the plague vaccine into the body.

Keywords: *Yersinia pestis* EV NIIEG, vaccine strain, tyrosine protein phosphatase CD45, anti-plague vaccination, CD45 expression, neutrophils, flow cytometry

Введение

В настоящее время актуальной проблемой медицинской иммунологии является разработка экспериментальной методической основы для оценки напряженности приобретенного противoinфекционного клеточного иммунитета у

людей, базирующейся на использовании современных достижений в области автоматизации цитологических исследований [1]. Успешное решение этой проблемы при совершенствовании схем противочумной вакцинации и ревакцинации требует детального изучения сложных молекулярных механизмов формирования адаптивно-

го иммунитета, связанных с функционированием не только Т- и В-лимфоцитов памяти, но и «иммунной памяти», проявляемой на уровне рецепторов клеток врожденного иммунитета. От «иммунной памяти» зависит, как в последние годы было установлено, развитие более быстрого и интенсивного антигенспецифического иммунного ответа на повторное введение в организм живой чумной вакцины [2].

Первыми на внедрение в организм *Y. pestis* отвечают, как известно, нейтрофильные гранулоциты (НГ) [14], которые в свете современных представлений являются главенствующими клетками противобактериальной защиты, наделенными уникальными возможностями активации и регуляции иммунного ответа [5, 12]. Для этих клеток известны два отчетливо различимых функциональных состояния: исходное, так называемое «gedox», с низким уровнем протекания процессов, и активированное, переход в которое обусловлен взаимодействием с различными стимуляторами. Увеличение функционального потенциала НГ при предварительном воздействии стимулов, в том числе бактерий, бактериальных антигенов (например, липополисахаридов — ЛПС) и/или аллергенов называют праймингом (priming — подготовка, перевод клеток в рабочее состояние) [6, 10].

При прайминге на поверхности НГ повышается плотность экспрессии Fc-рецепторов, при взаимодействии с которыми молекулы специфических антител (IgG) в составе иммунных комплексов антиген-антитело стимулируют бактерицидную функцию НГ при киллинге бактерий [13], а также секреторную функцию этих клеток с высвобождением медиаторов воспаления (IL-6 и лейкоцитарных протеаз) при альтернативных IgG-обусловленных адаптивных аллергических и анафилактических реакциях [12], развивающихся без участия IgE, тучных клеток и базофилов [9]. Установлено, что FcγR-опосредованную передачу клеточных сигналов при функциональной активации НГ регулирует тирозиновая протеинфосфатаза (ТПФ), роль которой в определении исхода взаимодействия иммунных комплексов с клетками врожденного иммунитета недостаточно изучена. Этот гликопротеин (CD45), выполняющий свою сигнальную функцию внутри активированных лейкоцитов, часто называют общим лейкоцитарным антигеном [8, 11].

Цель исследования — изучить изменения в экспрессии ТПФ на гранулоцитах крови человека при моделировании бактериемии *ex vivo* живыми клетками вакцинного штамма *Yersinia pestis* EV НИИЭГ и оценить праймирующий эффект живой чумной вакцины по данному показателю в условиях *in vivo*.

Материалы и методы

В исследованиях использовали вакцинный штамм *Y. pestis* EV НИИЭГ из «Государственной коллекции патогенных бактерий (ФКУН «Российский противочумный институт «Микроб»»). Двухсуточную стационарную культуру *Y. pestis* выращивали на агаре Хоттингера (рН 7,2) при 28 °С (Yp28). Экспоненциальную 18-часовую бактериальную культуру с измененными антигенными свойствами получали путем выращивания с аэрацией на бульоне Хоттингера (рН 7,2) при 37 °С (Yp37). В стерильном фосфатно-солевом буфере (рН 7,4) с 0,9% NaCl (ФСБ) готовили по стандартному образцу мутности ОСО 42-28-59-85П из культур Yp28 и Yp37 взвеси живых бактерий с концентрацией 10⁹ мк/мл. На 1 мл цельной крови человека добавляли 100 мкл миллиардной взвеси (10⁸ бактерий), что соответствовало в среднем микробной нагрузке в крови около 50 мк на фагоцит. Изменения в уровне экспрессии CD45 на поверхности НГ в условиях моделирования бактериемии *ex vivo* живыми клетками Yp28 и Yp37 регистрировали через 30 мин, 2 и 6 ч инкубации крови при 37 °С. Контролем служили результаты анализа крови тех же доноров без добавления бактерий.

Кровь забирали из локтевой вены в пробирки с антикоагулянтом (гепарином) в количестве от 10 до 20 мл и использовали в течение 1-2 ч после выделения. Исследовали образцы крови 10 условно здоровых доноров (4 мужчин и 6 женщин) возрастом от 23 до 50 лет, не прививавшихся ранее против чумы и не проживающих на территориях природных очагов чумы Российской Федерации (группа 1). У лиц данной группы экспрессию CD45 на поверхности НГ оценивали в крови до и в процессе взаимодействия *ex vivo* с клетками живой чумной вакцины (ВЧЖ), спустя 1 и 6 месяцев после вакцинации. Кроме того, объектом исследования была кровь 20 доноров возрастом от 28 до 60 лет, проживающих на территории Прикаспийского песчаного природного очага чумы (группа 2), которые ранее неоднократно (от 2 до 30 раз) по эпидемическим показаниям были привиты ВЧЖ. Экспрессию CD45 на НГ крови лиц из группы 2 определяли перед очередной вакцинацией (через год после последней прививки) и спустя 1 и 6 месяцев. У всех участников исследования забор крови проводили на основании должным образом оформленного добровольного информированного согласия.

В работе использовали ВЧЖ производства ФКУЗ Ставропольского НИПЧИ (серия № 1-15, 12.03.2015-12.03.2018), представляющую собой лиофилизированную живую культуру вакцинного штамма чумного микроба *Y. pestis* EV НИИЭГ со стабилизатором. Вакцинацию проводили на-

кожным способом дозой 3×10^9 микробных клеток в соответствии с инструкцией по применению препарата.

Плотность экспрессии CD45 на поверхности НГ крови человека оценивали методом проточной цитофлуориметрии в условных единицах интенсивности флуоресценции (MFI) на цитометре DakoCytomation (Дания) с программным обеспечением Summit v. 4.3 Built 2445. Лейкоциты в исследуемых образцах цельной крови окрашивали мечеными мышинными моноклональными антителами CD45-FITC (Beckman Coulter, США) согласно Lyse/No Wash протоколу иммунофенотипирования фирмы BD Bioscience (США), обеспечивающему высокую степень стандартизации результатов клинических цитологических исследований [15]. Гранулоциты дифференцировали от других экспрессирующих CD45 клеток крови (лимфоцитов и моноцитов) по интенсивности бокового светорассеяния, зависящей от степени их внутриклеточной гранулярности [3].

Для статистической обработки экспериментальных данных использовали Microsoft Excel 2016 и Statistica 10.0 (StatSoft Inc.). Результаты представляли в виде медианы (Me) и интерквартильного размаха ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$) с расчетом достоверности различий в исследуемых группах с использованием U-критерия Манна-Уитни. Различие групп полагали статистически значимым при значениях $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Попадая в кровь человека, живые клетки вакцинного штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ уже че-

рез 30 мин индуцировали изменение фенотипа НГ, связанное с существенным повышением плотности поверхностной экспрессии на фагоцитах ТПФ (CD45), которое наглядно иллюстрируют цито- и гистограммы, представленные на рисунке 1. Повышенная плотность экспрессии ТПФ сохранялась на НГ, взаимодействующих с чумным микробом в условиях *ex vivo*, в течение 6 ч инкубации и интенсивность изменений по данному показателю зависела от условий выращивания бактериальной культуры (табл. 1), определяющих различия в антигенных и антифагоцитарных свойствах клеток Yp28 и Yp37.

В ответ на клетки Yp28, более чувствительные к фагоцитозу и киллингу НГ [14], в наших исследованиях были зарегистрированы более интенсивные изменения по экспрессии ТПФ, что согласуется с литературными данными об активном участии CD45 в регуляции функции рецепторов НГ, ответственных за распознавание патогенных микроорганизмов [8, 11]. Более интенсивное воздействие Yp28 на регулятор и модулятор функции рецепторов клеток врожденного иммунитета связано, вероятно, с праймирующим эффектом ЛПС Yp28, который стимулирует врожденную иммунную систему организма хозяина, как известно, эффективнее ЛПС Yp37 [14], а также с особенностями структуры и морфологии бактерий, распознаваемыми рецепторами НГ [7]. От состояния рецепторного аппарата НГ, молниеносно реагирующего на сдвиги в иммунном гомеостазе, зависит эффективность функционирования механизмов бактерицидности, используемых самой многочисленной и мобильной популяцией клеток врожденного иммунитета при выборе стра-

ТАБЛИЦА 1. ПОВЫШЕНИЕ ПЛОТНОСТИ ЭКСПРЕССИИ CD45 НА НЕЙТРОФИЛЬНЫХ ГРАНУЛОЦИТАХ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА ПРИ ВЗАИМОДЕЙСТВИИ С КЛЕТКАМИ *Y. PESTIS* EV НИИЭГ *EX VIVO* (ГРУППА 1), Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)

TABLE 1. INCREASE IN CD45 EXPRESSION DENSITY ON HUMAN BLOOD NEUTROPHIL GRANULOCYTES UPON INTERACTION WITH LIVING CELLS OF *Y. PESTIS* EV *EX VIVO* (GROUP 1), Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)

Образцы крови Blood samples	Плотность экспрессии CD45 (у. е.) в различные сроки инкубации CD45 expression density (c. u.) at different incubation times			
	0 мин 0 min	30 мин 30 min	120 мин 120 min	360 мин 360 min
Без бактерий (контроль) Without bacteria (control)	12,8 (11,8-14,8)	16,7 (14,1-18,3)	18,3 (14,9-20,2)	20,7 (18,9-21,8)
с Yp28 with Yp28	—	42,8 (41,3-45,6)***	42,4 (40,2-43,7)***	40,3 (39,2-42,2)***
с Yp37 with Yp37	—	28,5 (27,8-33,7)*	34,7 (32,7-36,1)*	30,0 (28,8-31,2)*

Примечание. * – достоверность различий с контролем; ** – достоверность различий в опытах с Yp28 и Yp37.

Note. *, significance of differences with control; **, significance of differences in experiments with Yp28 and Yp37.

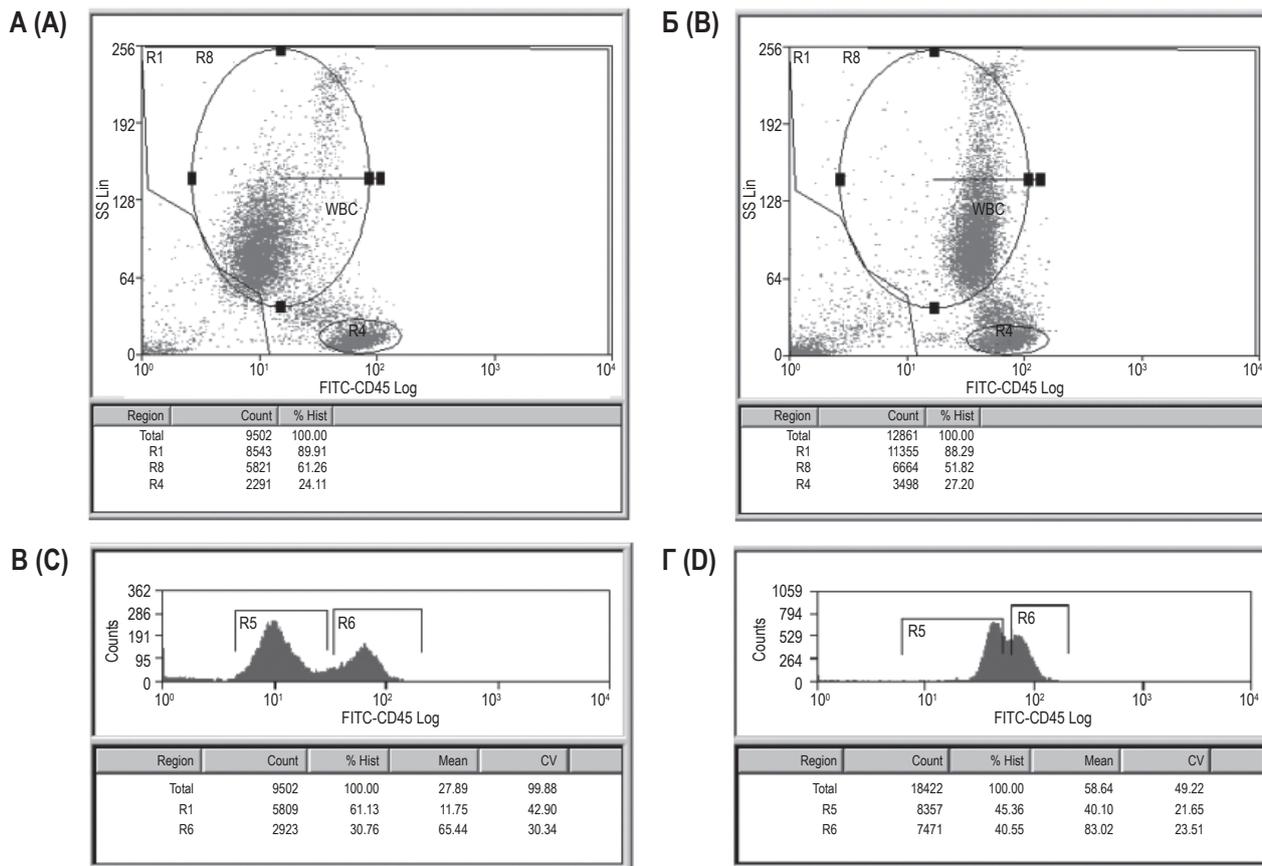


Рисунок 1. Функциональная активация гранулоцитов по маркеру CD45 в крови с добавлением живых микробных клеток вакцинного штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ

Примечание. На цитограммах (сверху, Б – опыт через 30 мин, А – контроль) гранулоциты крови (нейтрофилы) локализируются в регионе R8, отделяясь от лимфоцитов (регион R4) и моноцитов по интенсивности бокового светорассеяния (степени своей гранулярности – SS). Вне региона R1 на цитограммах учитывались сигналы от клеточного дебриса (лизированных лейкоцитов). Под каждой цитограммой представлено соответствующее частотное распределение отдельных лейкоцитов по плотности экспрессии на клетку CD45. Гистограммы В и Г получены без гейтирования по региону R8, чтобы показать выраженные различия (в 5,6 раза) по экспрессии CD45, характерные в норме (контрольная гистограмма С) для гранулоцитов (пик слева в регионе R5, Mean 11,75) и лимфоцитов (пик справа в регионе R6, Mean 65,44). В присутствии чумных микробов экспрессия CD45 на НГ повышалась до 40,1 у. е. (R5 Mean на гистограмме Д).

Figure 1. Functional activation of granulocytes by the marker CD45 in blood contaminated with cells of plague microbe vaccine strain *Y. pestis* EV NIIEG

Note. On cytograms (top, B, experiment after 30 min; A, control) blood granulocytes (neutrophils) are localized in the R8 region, separating from lymphocytes (R4 region) and monocytes according to the intensity of side light scattering (the degree of their granularity – SS). Outside the R1 region on cytograms, signals from cell debris (lysed leukocytes) were taken into account. Under each cytogram, the corresponding frequency distribution of individual leukocytes by expression density per CD45 cell is presented. Histograms C and D were obtained without gating in the R8 region to show pronounced differences (5.6 times) in CD45 expression, characteristic of normal (control histogram C) for granulocytes (peak on the left in the R5 region, Mean 11.7) and lymphocytes (peak on the right in region R6, Mean 65.44). In the presence of plague microbes, CD45 expression on neutrophilic granulocytes increased to 40.1 conventional units (R5 Mean on D histogram).

тегии обезвреживания опсонизированных бактерий: внутриклеточный киллинг (при фагоцитозе) и/или внеклеточный киллинг – секреторная дегрануляция и нетоз [7, 12, 13]. Установлено, что ЛПС грамотрицательных бактерий запускает при прайминге в условиях *in vivo* (при длительном внутривенном введении малых доз) перестройку рецепторного аппарата НГ периферической крови, которая при повторном контакте организма с инфекционным агентом способствует быстрому

«включению» дополнительного механизма внеклеточной бактерицидности (аутолизис НГ – нетоз), существенно повышающего эффективность киллинга бактерий [10].

В исследованиях на лабораторных животных ранее нами было установлено, что такой стимулирующий эффект на бактерицидную функцию НГ оказывает не только ЛПС, но и противочумная иммунизация с использованием вакцинного штамма *Y. pestis*, выращенного при 28 °С [4].

Учитывая, что молекулярным триггером нетоза в организме человека является рецептор НГ FcγRIIb(CD16) [13], был проведен сравнительный анализ экспрессии CD16 на НГ крови привитых и не привитых против чумы людей. Результаты анализа выявили влияние противочумной вакцинации на плотность экспрессии CD16, особенно при повторном контакте НГ крови человека со специфическим антигеном (аллергеном чумного микроба – пестином) [3]. Причем

сдвиги по экспрессии FcγRIIb соответствовали в этом случае сдвигам, характерным, по литературным данным, для развития IgG-обусловленной анафилаксии [9].

В настоящей работе впервые получены экспериментальные данные о плотности экспрессии ТПФ на поверхности гранулоцитов крови привитых против чумы людей, которые представлены в таблице 2 в виде индивидуальных значений этого показателя у лиц двух исследуемых групп до и

ТАБЛИЦА 2. ИНДИВИДУАЛЬНЫЕ И СТАТИСТИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ ЭКСПРЕССИИ CD45 НА ГРАНУЛОЦИТАХ КРОВИ ОБСЛЕДУЕМЫХ ДОНОРОВ ДО И ПОСЛЕ ПРОТИВОЧУМНОЙ ВАКЦИНАЦИИ

TABLE 2. INDIVIDUAL AND STATISTICAL INDICATORS OF THE EXAMINED DONOR BLOOD NEUTROPHIL CD45 EXPRESSION BEFORE AND AFTER ANTI-PLAGUE VACCINATION

№ донора в группе Donor № in the group	Плотность экспрессии CD45 (у. е.) на нейтрофилах крови донора CD45 Expression density (c. u.) on donor blood neutrophils		
Группа 1 Group 1 (n = 5)	До вакцинации Before vaccination	Через 1 месяц 1 month after	Через 6 месяцев 6 months after
1	11,8	24,7 (+12,9)	23,0 (+11,2)
2	14,2	30,6 (+16,4)	26,6 (+12,4)
3	13,5	22,6 (+9,1)	20,5 (+7,0)
4	12,2	25,4 (+13,2)	27,0 (+15,7)
5	11,3	23,3 (+12,0)	20,6 (+9,3)
Me (Q _{0,25} -Q _{0,75}) Me (Q _{0,25} -Q _{0,75})	12,2 (11,8-13,5)*	24,7 (23,3-25,4)**	23,0 (20,6-26,6)**
Группа 2 Group 2 (n = 20)	До вакцинации Before vaccination	Через 1 месяц 1 month after	Через 6 месяцев 6 months after
1	21,2	23,4 (+2,2)	29,4 (+8,2)
2	21,5	24,9 (+3,4)	24,0 (+2,5)
3	21,7	30,4 (+8,4)	33,5 (+11,5)
4	15,8	24,5 (+9,7)	24,6 (+9,6)
5	16,2	26,5 (+10,3)	25,3 (+9,3)
6	21,5	29,8 (+8,3)	27,4 (+5,9)
7	19,5	23,5 (+4,0)	20,5 (+1,0)
8	19,2	31,8 (+12,6)	28,7 (+9,5)
9	22,2	29,3 (+7,1)	26,2 (+4,0)
10	20,6	27,6 (+7,0)	20,5 (0)
11	21,8	33,5 (+11,7)	26,4 (+4,6)
12	21,0	31,0 (+10,0)	22,0 (+1,0)
13	21,5	21,8 (+0,3)	29,6 (+8,1)
14	27,0	27,0 (0)	22,0 (-5,0)
15	20,6	20,4 (-0,2)	23,4 (+3,4)
16	21,0	27,4 (+6,4)	21,5 (+0,5)
17	16,7	29,0 (+12,3)	22,6 (+5,9)
18	19,7	29,1 (+9,4)	21,6 (+1,9)
19	18,5	26,5 (+8,0)	26,3 (+7,8)
20	15,6	19,5 (+4,0)	9,4 (+3,8)
Me (Q _{0,25} -Q _{0,75}) Me (Q _{0,25} -Q _{0,75})	20,8 (18,8-21,5)*	27,2 (24,0-29,5)**	24,3 (21,8-26,9)**

Примечание. (+/-) – положительная/отрицательная разница значений до и после вакцинации; * – достоверность различий между группами 1 и 2; ** – достоверность различий с показателем до вакцинации.

Note. (+/-), positive / negative difference between values before and after vaccination; *, significance of differences between groups 1 and 2; **, significance of differences between values before and after vaccination.

после противочумной вакцинации. Анализ этих данных свидетельствует, что перестройку рецепторного аппарата НГ с повышением плотности экспрессии регулятора функции Fc-рецепторов фагоцитов крови человека вызывает не только контакт с живыми клетками чумного микроба в условиях *ex vivo*, но и взаимодействие с ВЧЖ в процессе иммуногенеза *in vivo*.

Экспрессия CD45 на НГ крови всех доноров из группы 1 через месяц после вакцинации была вдвое выше нормы и сохранялась на том же уровне до 6 месяцев. Более того, из сравнения исходных показателей до вакцинации среди добровольцев из группы 1 и группы 2 следует, что повышенное значение плотности экспрессии ТПФ на гранулоцитах периферической крови может сохраняться у подавляющего большинства привитых против чумы доноров до года после прививки. Очередная ежегодная вакцинация индуцировала у лиц из группы 2 дополнительные индивидуальные изменения по экспрессии CD45 различной интенсивности. Так, повышение показателя (+5 у. е. и более) было зарегистрировано одновременно через 1 месяц и спустя 6 месяцев у 35% доноров (№ 3, 4, 5, 6, 8, 17, 19), только через 1 месяц у 30% (№ 9, 10, 11, 12, 16, 18) и через 6 месяцев у 10% (№ 1, 13). У 25% привитых (№ 2, 7, 14, 15, 20) отмечали сравнительно слабую перестройку по CD45 на НГ (менее +5 у. е.) в течение 6 месяцев после очередной прививки.

Заключение

Проведенное исследование в условиях *ex vivo* и *in vivo* продемонстрировало способность живых клеток вакцинного штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ стимулировать повышение плотности экспрессии ТПФ (CD45) на поверхности гранулоцитов периферической крови человека, зависящее от степени устойчивости бактерий к фагоцитозу и киллингу НГ, которое после первичного контакта со специфическим антигеном может сохраняться на повышенном уровне до года после противочумной вакцинации. Выявленные изменения по исследуемому показателю могут быть связаны с «иммунной памятью», формируемой в процессе иммунологической перестройки на уровне рецепторов клеток врожденного иммунитета, от которой зависит развитие более быстрого и интенсивного антигенспецифического иммунного ответа на повторное введение в организм клеток *Y. pestis*, в том числе и ВЧЖ. В перспективе, полученные в работе экспериментальные данные могут быть использованы для разработки информативных критериев оценки эффективности противочумной вакцинации у людей, в частности, при обосновании изменения индивидуальных сроков проведения очередной вакцинации против чумы по эпидемическим показателям контингенту риска.

Список литературы / References

1. Богачева Н.В., Крючков А.В., Дармов И.В., Воробьев К.А., Печенкин Д.В., Елагин Г.Д., Колесников Д.П. Экспериментальная оценка методом проточной цитофлуориметрии уровня клеточной иммунологической памяти у лиц, вакцинированных против чумы и сибирской язвы // Клиническая лабораторная диагностика, 2013. № 11. С. 48-53. [Bogatcheva N.V., Kryutchkov A.V., Darmov I.V., Vorobiyev K.A., Petchenkin D.V., Elagin G.D., Kolesnikov D.P. The experimental evaluation with flow cytofluorimetry technique of the level of cellular immunologic memory in persons vaccinated against plague and anthrax. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika = Russian Clinical Laboratory Diagnostics*, 2013, no. 11, pp. 48-53. (In Russ.)]
2. Каральник Б.В., Дерябин П.Н., Денисова Т.Г., Пономарева Т.С., Жунусова Г.Б., Закарян С.Б., Мухамедьярова Р.Б. Выявление иммунной памяти на первом этапе антигенспецифического клеточного ответа при повторном введении живой чумной вакцины // Эпидемиология и вакцинопрофилактика, 2019. Т. 18, № 6. С. 26-33. [Karalnik B.V., Deryabin P.N., Denisova T.G., Ponomareva T.S., Zunossova G.B., Zakaryan S.B., Vuchamedyarova R.B. Revelation of immune memory at the first stage of antigen specific cell response after second introduction of the live plague vaccine. *Epidemiologiya i vaksinoprofilaktika = Epidemiology and Vaccinal Prevention*, 2019, Vol. 18, no. 6, pp. 26-33. (In Russ.)]
3. Кравцов А.Л., Бугоркова С.А., Ключева С.Н., Кожевников В.А., Кудрявцева О.М. Определение экспрессии FcγRIIIB (CD16) на поверхности нейтрофилов крови привитых против чумы людей // Молекулярная медицина, 2020. Т.18, № 2. С.33-38. [Kravtsov A.L., Bugorkova S.A., Klyueva S.N., Kozhevnikov V.A., Kudryavtseva O.M. Determination of FcγRIIIB (CD16) expression on the surface of blood neutrophils in antiplague vaccinated people. *Molekulyarnaya meditsina = Molecular Medicine*, 2020, Vol. 18, no. 2, pp. 33-38. (In Russ.)]
4. Кравцов А.Л., Гончарова А.Ю., Бугоркова С.А., Девдариани З.Л., Кожевников В.А. Формирование нейтрофильных внеклеточных ловушек при моделировании чумной инфекции у мышей, иммунизированных *Yersinia pestis* EV НИИЭГ // Проблемы особо опасных инфекций, 2020. № 4, С. 70-74. [Kravtsov A.L., Goncharova A.Yu., Bugorkova S.A., Devdariani Z.L., Kozhevnikov V.A. Formation of neutrophil extracellular traps when modeling plague infection in mice immunized with *Yersinia pestis* EV NIEG. *Problemy osobo opasnykh infektsii = Problems of Particularly Dangerous Infections*, 2020, no. 4, pp. 70-74. (In Russ.)]

5. Нестерова И.В., Колесникова Н.В., Чудилова Г.А., Ломтатидзе Л.В., Ковалева С.В., Евглевский А.А., Нгуен Т.Л. Новый взгляд на нейтрофильные гранулоциты: переосмысление старых догм. Часть 2 // Инфекция и иммунитет, 2018. Т. 8, № 1. С. 7-18. [Nesterova I.V., Kolesnikova N.V., Chudilova G.A., Lomtaticidze L.V., Kovaleva S.V., Evglevsky A.A., Nguyen T.L. The new look at neutrophilic granulocytes: rethinking old dogmas. Part 2. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2018, Vol. 8, no. 1, pp. 7-18. (In Russ.)] doi: 10.15789/2220-7619-2018-1-7-18.
6. Плехова Н.Г. Бактерицидная активность фагоцитов // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии, 2006. № 6. С. 89-96. [Plekhnova N.G. The bactericidal activity of phagocytes. *Zhurnal mikrobiologii i epidemiologii i immunologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*, 2006, no. 6, pp. 89-96. (In Russ.)]
7. Brunzk N., Lubojemska A., Hardison S., Wang Q., Gutierrez M., Brown G.D., Papayannopoulos V. Neutrophils sense microbial size and selectively release neutrophil extracellular traps in response to large pathogens. *Nat. Immunol.*, 2014, Vol. 15, no. 11, pp. 1017-1025.
8. Gao H., Henderson A., Kenneth C., Landreth S., Erisson S.E. Effects of the protein tyrosine phosphatase CD45 on FcγRIIIa signaling and neutrophil function. *Exp. Hematol.*, 2000, Vol. 28, no. 9, pp. 1062-1070.
9. Khodoun M.V., Strait R., Armstrong L., Yanase N., Frankelmann F.D. Identification of markers that distinguish IgE-from IgG-mediated anaphylaxis. *Proc. Natl Acad. Sci.*, 2011, Vol. 108, no. 30, pp. 12413-12418.
10. Landoni V.I., Chiarella P., Martire-Greco D., Schierloh P., van-Rooijen N., Rearte B., Palermo M.S., Isturiz M.A., Fernandez G.C. Tolerance to lipopolysaccharide promotes an enhanced neutrophil extracellular traps formation leading to a more efficient bacterial clearance in mice. *Clin. Exp. Immunol.*, 2012, Vol. 168, no. 1, pp. 153-163.
11. Mitchell G.B., Khandaker M.H., Rahimpour R., Xu L., Lazarovits A.I., Pickering J.G., Suria H., Madrenas J., Pomerantz D.K., Feldman R.D., Kelvin D.J. CD45 modulation of CXCR1 и CXCR2 in human polymorphonuclear leukocytes. *J. Immunology*, 1999, Vol. 29, pp. 1467-1476.
12. Mócsai A. Diverse novel functions of neutrophils in immunity, inflammation, and beyond. *J. Exp. Med.*, 2013. Vol. 210, no. 7, pp. 1283-1299.
13. Rosales C., Uribe-Querol E. Neutrophil activation by antibody receptors. In book: Neutrophils. Ed. Khajah M. London: Intechopen limited, 2019. 85 p.
14. Shannon J.G., Hasenkrug A.M., Dorward D.W., Nair V., Carmody A.B., Hinnebusch B. *Yersinia pestis* subverts the dermal neutrophil response in a mouse model of bubonic plague. *mBio*, 2013, Vol. 5, no. 4, e00170-13. doi: 10.1128/mbio.00170-13.
15. Vera E.J., Chew Y.V., Nicholson L., Bruns H., Anderson P., Chen H.T., Williams L., Keung K., Zanjani N.T., Dervish S., Patrick E., Wang X.M., Yi S., Hawthorne W., Alexander S., O'Connell P.J., Hu M. Standardization of flow cytometry for whole blood immunophenotyping of islet transplant and transplant clinical trial recipients. *PLoS One*, 2019, Vol. 14, no. 5, e0217163. doi: 10.1371/journal.pone.0217163.

Авторы:

Кравцов А.Л. — д.б.н., ведущий научный сотрудник отдела иммунологии ФКУН «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб»», г. Саратов, Россия

Клюева С.Н. — к.б.н., научный сотрудник отдела иммунологии ФКУН «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб»», г. Саратов, Россия

Кожевников В.А. — младший научный сотрудник отдела иммунологии ФКУН «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб»», г. Саратов, Россия

Бугоркова С.А. — д.м.н., и. о. заведующего отделом иммунологии ФКУН «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб»», г. Саратов, Россия

Authors:

Kravtsov A.L., PhD, MD (Medicine), Leading Research Associate, Department of Immunology, Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov, Russian Federation

Klyueva S.N., PhD (Biology), Research Associate, Department of Immunology, Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov, Russian Federation

Kozhevnikov V.A., Junior Research Associate, Department of Immunology, Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov, Russian Federation

Bugorkova S.A., PhD, MD (Medicine), Acting Head, Department of Immunology, Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov, Russian Federation

Поступила 01.02.2023
Принята к печати 16.02.2023

Received 01.02.2023
Accepted 16.02.2023

ИММУНОМОДУЛИРУЮЩИЕ СВОЙСТВА РАСТИТЕЛЬНЫХ ПОЛИФЕНОЛОВ В ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ МОДЕЛИ *IN VITRO*

Долгих О.В.¹, Дианова Д.Г.^{1,2}, Ширинкина А.С.¹, Бомбела Т.В.²

¹ ФБУН «Федеральный научный центр медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения», г. Пермь, Россия

² ФГБОУ ВО «Пермская государственная фармацевтическая академия» Министерства здравоохранения РФ, г. Пермь, Россия

Резюме. Полифенолы обладают широким спектром биологических эффектов, в том числе иммуномодулирующим. Изучение влияния флавоноидов на фагоцитарную активность профессиональных фагоцитов представляется достаточно перспективным направлением для их дальнейшего использования в качестве фармакологического (терапевтического) агента. К наиболее распространенным представителям флавоноидов с плеiotропным действием относятся кверцетин и лютеолин. Углубленное изучение и понимание иммуотропных механизмов (в том числе на примере регуляции фагоцитоза) является необходимым условием для проведения адекватной фармакотерапии при инфекционных процессах, воспалительных заболеваниях неспецифической этиологии, аутоиммунных и онкологических состояниях. Цель работы — изучить влияние флавоноидов на фагоцитарную активность профессиональных фагоцитов (нейтрофилов) в системе *in vitro*. В работе использован биологический материал (венозная кровь) 30 практически здоровых человек (взрослые $n = 15$, дети $n = 15$). Исследование выполнено в соответствии с установленными международными правилами. В опытные пробы вносили 0,5 мг/л Luteolin (содержание основного вещества $\geq 98\%$) и Quercetin (содержание основного вещества $\geq 95\%$) и инкубировали 20 мин при 37 °С. Процент фагоцитоза, фагоцитарное число (количество поглощенных формализированных эритроцитов барана одной клеткой нейтрофила) определяли с помощью световой микроскопии в контрольных и опытных образцах. В системе *in vitro* отмечен однонаправленный характер угнетения фагоцитоза кверцетином и лютеолином. Идентифицировано статистически значимое ($p < 0,05$) ослабление на 10% интенсивности фагоцитоза в опытных образцах крови, полученной от взрослых пациентов, относительно контрольных значений. При добавлении кверцетина и лютеолина в пробы крови, полученной от детей, отмечено статистически значимое ($p < 0,05$) снижение на 30% фагоцитоза по сравнению с контрольными величинами. Вместе с тем среднее значение процента фагоцитоза и фагоцитарного числа в образцах крови после добавления флавоноидов регистрировались в диапазоне референтных значений, что демонстрирует адекватность и физиологичность угнетения чрезмерной агрессивности компартментов врожденного иммунитета кверцетином и лютеолином. Установлено, что в указанной концентрации более выраженное супрессорное действие флавоноиды оказывали на фагоцитарную активность у детей. Моделирование

Адрес для переписки:

Долгих Олег Владимирович
ФБУН «Федеральный научный центр медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения»
614045, Россия, г. Пермь, ул. Монастырская, 82.
Тел.: 8 (342) 236-39-30.
E-mail: oleg@fcrisk.ru

Address for correspondence:

Oleg V. Dolgikh
Federal Research Center for Medical and Preventive
Technologies for Public Health Risk Management
82 Monastyrskaya St
Perm
614045 Russian Federation
Phone: +7 (342) 236-39-30.
E-mail: oleg@fcrisk.ru

Образец цитирования:

О.В. Долгих, Д.Г. Дианова, А.С. Ширинкина, Т.В. Бомбела «Иммуномодулирующие свойства растительных полифенолов в экспериментальной модели *in vitro*» // Медицинская иммунология, 2024, Т. 26, № 1. С. 143-150.
doi: 10.15789/1563-0625-IPO-2655

© Долгих О.В. и соавт., 2024
Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

O.V. Dolgikh, D.G. Dianova, A.S. Shirinkina, T.V. Bombela
“Immunomodulatory properties of plant polyphenols shown
in an *in vitro* experimental model”, *Medical Immunology
(Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2024, Vol. 26, no. 1,
pp. 143-150.
doi: 10.15789/1563-0625-IPO-2655

© Dolgikh O.V. et al., 2024
The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License
DOI: 10.15789/1563-0625-IPO-2655

иммунного ответа на примере индикаторных показателей фагоцитоза с его верификацией на экспериментальных моделях *in vitro* на нейтрофилах, полученных у практически здоровых взрослых и детей, позволяет расширить понимание механизма иммуотропного эффекта флавоноидов кверцетина и лютеолина для задач коррекции иммунопатологических состояний.

Ключевые слова: иммуномодулирующая активность, кверцетин, лютеолин, фагоцитоз, нейтрофилы, эксперимент *in vitro*

IMMUNOMODULATORY PROPERTIES OF PLANT POLYPHENOLS SHOWN IN AN *IN VITRO* EXPERIMENTAL MODEL

Dolgikh O.V.^a, Dianova D.G.^{a, b}, Shirinkina A.S.^a, Bombela T.V.^b

^a Federal Research Center for Medical and Preventive Technologies for Public Health Risk Management, Perm, Russian Federation

^b Perm State Academy of Pharmacy, Perm, Russian Federation

Abstract. Polyphenols exert a wide range of biological effects, including immunomodulatory action. Studying the effects of flavonoids on phagocytic activity of specialized phagocytic cells seems to be a rather promising direction for their further usage as pharmacological (therapeutic) agents. Quercetin and luteolin are the most commonly studied flavonoid substances with pleiotropic action. In-depth study and understanding of immunotropic mechanisms (e.g., regulation of phagocytosis) is a prerequisite for adequate pharmacotherapy in infectious conditions, nonspecific inflammatory diseases, autoimmune and oncological disorders. The aim of our work is to study the effect of flavonoids upon phagocytic activity of professional phagocytes (neutrophils) using an *in vitro* test system. The biological material (venous blood) from 30 practically healthy people (adults $n = 15$, children $n = 15$) was used in the present work. The study was carried out in accordance with established international regulations. 0.5 mg/L of Luteolin (basic substance content $\geq 98\%$) and Quercetin (basic substance content $\geq 95\%$) were added to experimental samples and incubated for 20 min at 37 °C. The percentage of phagocytosis, phagocytic number (mean number of formalin-treated sheep erythrocytes engulfed per one neutrophil) was determined in control and experimental samples using light microscopy. The unidirectional nature of phagocytosis inhibition by quercetin and luteolin was noted in the test experiments. A statistically significant ($p < 0.05$) decrease in the phagocytosis intensity by 10% was shown in experimental blood samples obtained from adult patients compared with control values. When quercetin and luteolin were added to blood samples obtained from children, a statistically significant ($p < 0.05$) decrease in phagocytosis by 30% was noted against control values. At the same time, the mean percentage of phagocytosis and phagocytic number in blood samples after the addition of flavonoids were found to be in the range of reference values, thus suggesting adequacy and physiological suppression of excessive activities of innate immunity compartments by quercetin and luteolin. At this concentration, the flavonoids were found to exert a more pronounced suppressive effect on phagocytic activity in children. Modeling of immune response using the phagocytosis indices assayed in experimental *in vitro* models with neutrophils from practically healthy adults and children enables us to expand the knowledge of mechanisms underlying the immunotropic effects of flavonoids (quercetin and luteolin), in order to correct immunopathological conditions.

Keywords: immunomodulatory activity, quercetin, luteolin, phagocytosis, neutrophils, *in vitro* study

Введение

Биофлавоноиды (кемпферол, кемпферид, апигенин, байкалейн, кверцетин, лютеолин, рутин и др.), являющиеся вторичными метаболитами многих растений или растительными полифенолами, обладают значительным разнообразием биологической активности, в том числе, иммуномодулирующими свойствами. У многих представителей флавоноидов обнаружены антиоксидантный, иммуномодулирующий, про-

тивовоспалительный, противоаллергический, противовирусный, гепатопротективный, анти-эластазный, противораковый, антиноцицептивный, жаропонижающий, противоартритный эффекты, многие из которых являлись дозозависимыми [3, 4, 6, 12, 13, 17]. В системе *in vitro* установлено, что лютеолин, кемпферол, апигенин, фезетин и кверцетин (50, 100 и 200 мкМ) снижали продукцию NO и ослабляли фагоцитоз, при этом ингибирующее влияние положительно коррелировало с антиоксидантной активностью

флавоноидов [13]. Установлено снижение LPS-индуцированной продукции IL-6 нейтрофилами человека после внесения в культуру клеток кверцетина (80 мкМ). Уменьшение дегрануляции нейтрофилов, выделенных из периферической крови человека, выявлено после добавления в культуру кверцетина, при этом отмечен дозозависимый характер эффекта. Показано ингибирующее действие кверцетина (в диапазоне концентраций 0,625-100 мкмоль/л) на миграцию полиморфноядерных лейкоцитов [6]. В экспериментах на клеточных культурах микроглии установлено, что кверцетин (5 мМ и 10 мМ) подавлял фагоцитоз, инкубация клеток аденокарциномы легкого человека (A549) с кверцетином (25 мМ и 50 мкМ) уменьшала высвобождение миелопероксидазы из нейтрофилов. Вместе с тем показано, что введение кверцетина (2 мг/кг и 4 мг/кг) мышам линии BALB/c дозозависимо стимулировало фагоцитоз перитонеальных макрофагов [15]. Инкубация нейтрофилов, выделенных из крови крупного рогатого скота, в течение 30 мин с кверцетином (50 мкМ) стимулировала фагоцитоз, однако при увеличении инкубации до 90 мин отмечено угнетение фагоцитарной активности клеток [12]. В двойном плацебо-контролируемом исследовании не обнаружено влияния флавоноидов (кверцетин) на показатели врожденного иммунитета при их длительном приеме (12 недель) [7]. Введение лютеолина мышам вызывало снижение выделения клетками O_2 и H_2O_2 , дозозависимые антиоксидантные и противовоспалительные свойства лютеолина подтверждены в экспериментальных моделях клеточной линии альвеолярных макрофагов мыши (MH-S). При совместном культивировании клеток человеческой миеломы линии H929 с макрофагами из костного мозга мыши добавление лютеолина способствовало макрофагальному фагоцитозу раковых клеток. Показано, что лютеолин вызывал гибель опухолевых клеток, подавляя экспрессию bcl-2, активацию STAT3 и повышая активность baх, каспазы-3. В условиях эксперимента доказан антиканцерогенный эффект кверцетина, характеризующийся активацией ферроптоза, некроптоза и пироптоза патологических клеток [14]. Множественные и разнообразные эффекты флавоноидов зависят не только от их химического строения, но и особенностей экспериментальной модели и различных условий проведения эксперимента (уровень pH, время инкубации, температурный режим, доза/концентрация и т. д.). Различия спектра биологической активности кверцетина и лютеолина, обнаруженные у человека и животных, в значительной степени связаны с фармакокинетическими параметрами веществ, которые детерминированы генетическим профилем организма. В случае использования в качестве модели *in vitro* нейтрофильных гранулоцитов следует учитывать

гетерогенность популяции нейтрофилов, что обуславливает значительную их функциональную вариабельность и инициацию ими разноплановых процессов в организме. Перспективным является решение задачи управления профилем иммуномодулирующей активности флавоноидов, потенциально действующие на различные биологические мишени и сайты связывания, для поиска и разработки иммунофармакологических агентов.

Специализированные клетки, так называемые профессиональные фагоциты, к которым относятся макрофаги, нейтрофилы, моноциты, дендритные клетки и остеокласты, осуществляют наиболее эффективный фагоцитоз. Нейтрофилы представляют основную популяцию фагоцитирующих гранулоцитов и составляют 50-70% циркулирующих лейкоцитов. В последние годы появляются данные, указывающие на то, что нейтрофильные гранулоциты обладают фенотипической и функциональной пластичностью. Нейтрофилы, являясь важнейшими клетками врожденного иммунитета, первыми реагируют на повреждение тканей и оказывают регуляторное влияние на клетки адаптивного иммунитета. При скоплении нейтрофилов в очагах инфекции/воспаления происходит реализация их антимикробной эффекторной функции (фагоцитоз, дегрануляция с высвобождением целого ряда антимикробных пептидов и ферментов, формирование нейтрофильных внеклеточных ловушек (NET), генерация активных форм кислорода (ROS)), что ускоряет разрешение воспаления, связанного с инфекцией. Между тем в результате реверсивной миграции из тканей обратно в сосуды нейтрофилы способны доставлять живые патогены из очага поражения в сосудистое русло, что благоприятствует генерализации инфекционного процесса и формированию септического состояния. Показана роль полиморфонуклеарных нейтрофилов в патогенезе аутоиммунных заболеваний, аутовоспалительного процесса и канцерогенеза. Так, зрелые нейтрофилы, выступая в роли антигенпрезентирующих клеток, опосредуют развитие Th1 или Th17 поляризацию иммунного ответа, а перепроизводство NET и сохранение недеградированных NET дополнительно способствуют выработке аутоантител против клеток хозяина. Нейтрофилы, экспрессируя BAFF, облегчают выживание В-клеток и их дифференцировку в плазматические клетки. У пациентов с COVID-19 в случае развития нейтрофилии отмечено значительное образование ROS и неконтролируемое производство NET, что усугубляет повреждение легочной ткани с развитием пневмонии, осложненной фиброзом. Нейтрофильные гранулоциты, секретировав иммунные медиаторы для рекрутирования и активации противоопухолевых эффекторных клеток, унич-

тожают злокачественные клетки. В то же время нейтрофилы облегчают онкогенез, опосредуют иммуносупрессию. Нейтрофилы, генерируя выработку ROS, обуславливают повреждение ДНК и развитие опухоли; высвобождая нейтрофильную эластазу, поддерживают злокачественный рост; высвобождая протеиназы (катептин G, эластаза) и VEGF, облегчают и усиливают метастазирование. Установлена роль нейтрофилов в патогенезе хронических неинфекционных заболеваний – сахарный диабет, неалкогольная жировая болезнь печени, нейтрофильная астма, хроническая обструктивная болезнь легких, муковисцидоз, нейродегенеративные заболевания, показано значение клеток в образовании и дестабилизации атеросклеротической бляшки. Нейтрофилы постоянно рекрутируются в очаг хронического воспаления, что способствует поддержанию патологического процесса за счет высвобождения сериновых протеаз и образования внеклеточных ловушек нейтрофилов, а также активации других иммунных клеток. Важнейшей функцией фагоцитоза является поддержание тканевого гомеостаза. Появление фосфатидилсерина на поверхности мембраны клетки дает команду фагоциту «съешь меня». Полагают, что апоптотические клетки, экспонирующие высокий уровень фосфатидилсерина, в отличие от некротических клеток значительно быстрее и эффективнее поглощаются фагоцитами. Однако есть сообщения о противоположных результатах. Возможно, при осуществлении фагоцитоза клеток, погибших по различным сценариям, используются отличные системы лиганд/рецептор и механизмы реализации поглощения. Независимо от типа клеточной смерти, быстрое удаление умирающих клеток профессиональными фагоцитами остается первостепенным для поддержания физиологического гомеостаза, а механизмы, с помощью которых реализуется фагоцитоз погибших клеток, в настоящее время активно изучается. Показано, что количественный баланс и функциональная активность нейтрофилов во многом обуславливает условия для нормальной работы организма, позволяя своевременно и адекватно реагировать

на различные негативные факторы. Очевидно, регуляция механизмов фагоцитоза представляет научный и практический интерес, поскольку реализуется возможность потенциально усиливать уничтожение патогенов или защищать хозяина от повреждения собственных тканей.

Цель работы – изучить влияние биофлавоноидов на фагоцитарную активность профессиональных фагоцитов (нейтрофилов) в системе *in vitro* (на примере лютеолина и кверцетина).

Материалы и методы

При выполнении исследования учтены требования, изложенные в Хельсинкской декларации ВМА (1964, 2013). Для изучения иммуномодулирующего эффекта флавоноидов выполнена оценка фагоцитарной активности лейкоцитов периферической крови. Образцы цельной крови были получены от практически здоровых взрослых ($n = 15$) и детей ($n = 15$) (табл. 1). Информированное согласие на участие в исследовании и использование персональных данных подписано всеми взрослыми участниками исследования и родителями (опекунами) детей. Критериями включения являлось: молодой и средний возраст (35-50 лет), младший школьный возраст и подростковый возраст (7-17 лет); критериями исключения: обострение хронических заболеваний, участие в другом исследовании. Выполнен расчет процента фагоцитоза, фагоцитарного числа (ФЧ). В качестве объектов фагоцитоза использовали диагностикумы на основе тщательно отмытых несенсибилизированных формализованных эритроцитов барана. Критерием оценки фагоцитоза и фагоцитарного числа являлись референтные уровни (35-60% и 0,8-1,2 у. е. соответственно). Для определения иммунотропного действия использовали образец Luteolin (5,7,3,4-tetrahydroxyflavone) с содержанием основного вещества $\geq 98\%$ (CAS 49-70-3) и Quercetin (5,7,3',4'-tetrahydroxyflavonol-3) с содержанием основного вещества $\geq 95\%$ (CAS 117-39-5) фирмы Sigma-Aldric. Контрольные пробы – пробы без добавления лютеолина (Lu) и кверцетина (Qu), опытные пробы – пробы с до-

ТАБЛИЦА 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ОБЪЕКТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

TABLE 1. CHARACTERISTICS OF STUDY OBJECTS

Обследуемые Subjects	Возраст, лет Age, years		Мужчины Men		Женщины Women	
	М (σ)	95% ДИ 95% CI	n	%	n	%
Взрослые Adults	41,00 (8,20)	36,46-45,54	10	66,7	5	33,3
Дети Children	12,53 (3,22)	10,75-14,31	9	60,0	6	40,0

бавлением Lu и Qu в концентрации 0,5 мг/л, что соответствует терапевтической концентрации.

Процедуры статистического анализа данных осуществляли с использованием пакета STATISTICA 6.0 (StatSoft, США). Для проверки статистических гипотез о виде распределения был применен критерий Колмогорова–Смирнова. Во всех случаях распределение признаков соответствовало закону нормального распределения. Количественные признаки представлены как среднее арифметическое значение, стандартное отклонение и 95%-ный доверительный интервал для среднего (M (σ) 95% ДИ). Для оценки значимости различий зависимых выборок использовали t-критерий Стьюдента. Проверка нулевых гипотез об отсутствии различий между долями выполнена с помощью критерия хи-квадрат (χ^2). Критическое значение уровня статистической значимости при проверке нулевых гипотез принималось равным 0,05. Если значение p было меньше 0,001, то p указывали в формате $p < 0,001$.

Результаты и обсуждение

Результаты эксперимента продемонстрировали, что внесение флавоноидов в образцы цельной крови вызывало супрессорный эффект на отдельные показатели неспецифической резистентности (табл. 2). После добавления в пробы крови, полученной от взрослых обследуемых, кверцетина и лютеолина отмечено статистически значимое ($p = 0,008-0,018$) снижение в 1,1 раза процентного содержания фагоцитирующих клеток и

в 1,2 раза – фагоцитарного числа по отношению к исходным значениям. Установлено, что при инкубации периферической крови, полученной от детей, с Lu и Qu происходило статистически значимое ($p < 0,001$) ингибирование в 1,25 раза относительного фагоцитоза и снижение в 1,6 раза фагоцитарного числа по сравнению к спонтанному уровню.

Установлено, что в образцах цельной крови, полученной от взрослых, доля проб со сниженной фагоцитарной активностью нейтрофилов относительно минимальных нормативных величин после инкубации с флавоноидами возросла в 1,9 раза ($p = 0,571$), что составило 6,7% и 13,3% соответственно. Доля проб со значением ФЧ выше верхнего диапазона референтного интервала в пробах крови взрослых в условиях экспозиции Qu и Lu снизилась в 1,6 раза ($p = 0,270$), что составило 53,3% и 33,3% соответственно. После внесения флавоноидов в пробы крови, полученной от детей, доля проб с пониженным значением фагоцитоза, относительно референтного интервала, увеличилась в 2,7 раза ($p = 0,059$), что составило 20% и 53,3% соответственно. Обнаружено, что в опытных образцах детской крови доля проб со значениями ФЧ выше регистровой границы уменьшилась по сравнению со спонтанным уровнем в 6,8 раза ($p = 0,014$), что составило 46,7% и 6,7% соответственно. Таким образом, результаты оценки иммуномодулирующего влияния кверцетина и лютеолина на показатели врожденного иммунитета продемонстрировали, что данные

ТАБЛИЦА 2. ЭФФЕКТ ФЛАВОНОИДОВ НА ПОКАЗАТЕЛИ ФАГОЦИТОЗА В ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ УСЛОВИЯХ IN VITRO, M (Σ) 95% ДИ (n = 15)

TABLE 2. EFFECT OF FLAVONOIDS ON INDICATORS OF PHAGOCYTOSIS UNDER EXPERIMENTAL CONDITIONS IN VITRO, M (Σ) 95% CI (n = 15)

Показатель Index	Контрольная проба Control sample	Проба с нагрузкой Load test		p ¹	p ²
		Qu	Lu		
Показатели неспецифической резистентности у взрослых (n = 15) Indicators of nonspecific resistance in adults (n = 15)					
Фагоцитоз, % Phagocytosis, %	49,73 (10,78) 43,76-55,70	45,46 (12,28) 38,66-52,26	46,20 (12,58) 39,23-53,17	0,018	0,010
ФЧ, у. е. FC, c. u.	1,28 (0,42) 1,05-1,51	1,07 (0,36) 0,87-1,27	1,02 (0,37) 0,82-1,22	0,008	0,001
Показатели неспецифической резистентности у детей (n = 15) Indicators of nonspecific resistance in children (n = 15)					
Фагоцитоз, % Phagocytosis, %	46,00 (15,41) 37,47-54,53	36,80 (14,44) 28,80-44,80	36,80 (14,18) 28,95-44,65	< 0,001	0,010
ФЧ, у. е. FC, c. u.	1,39 (0,69) 1,01-1,77	0,91 (0,57) 0,59-1,23	0,86 (0,48) 0,59-1,13	< 0,001	< 0,001

Примечание. p¹ – сравнение с кверцетином; p² – сравнение лютеолином.

Note. p¹, comparison with quercetin; p², comparison with luteolin.

флавоноиды в концентрации 0,5 мг/л вызывали однонаправленный ингибирующий эффект на фагоцитарную активность нейтрофилов и их поглощательную способность. Установлено, что в указанной концентрации более выраженное супрессорное действие флавоноиды оказывали на функциональную активность фагоцитов у детей.

Согласно различным источникам с учетом воздействия различных факторов диапазон референтных значений показателей фагоцитоза значительно различается. Так, в соответствии с рекомендациями ряда авторов референтные нормативы для фагоцитоза предлагаются в диапазоне значений от 60 до 80% [1], отдельных исследователей – от 7 до 68% [2]. Широкий диапазон референтного интервала также обусловлен существенной вариабельностью иммунологических показателей. Рядом исследователей установлена связь фагоцитоза с возрастными и гендерными особенностями индивидуумов, а другими исследователями данная причинно-следственная зависимость не выявлена [16]. Однако следует отметить, что у взрослых вторичный адаптивный иммунный ответ модифицирует ответную реакцию на антиген, которая у детей компартментами врожденного иммунного ответа может формироваться в виде воспаления как альтерация. Учитывая возрастные особенности реализации иммунной защитной стратегии организма, существует необходимость в использовании растительных полифенолов как фармакологических агентов, модулирующих ответ иммунной системы, в том числе посредством модификации механизма неспецифической защиты с участием нейтрофильных гранулоцитов.

Установлено, что значительная роль в запуске фагоцитоза принадлежит высоко реакционно-способным формам кислорода. Во время окислительного взрыва фагоциты, продукция ROS, повышают эффективность фагоцитоза. Являясь участником фосфорилирования/дефосфорилирования белковых молекул, ROS контролируют внутриклеточные сигнальные каскады, координируют экспрессию генов, регулируют активность потенциалзависимых кальциевых каналов и др. Однако избыток ROS может стать причиной нарушения внутриклеточного гомеостаза, фактором изменения функциональной активности клетки и в итоге пусковым механизмом местного повреждения тканей или хронического воспаления. Необходимо оптимальное соотношение между генерацией и утилизацией ROS, обеспечивающее полезные и необходимые для клетки эффекты, что требует вовлечения в процесс регуляции механизмов окислительного взрыва антиоксидантов. Кверцетин и лютеолин обладают значительным потенциалом поглощения свободных радикалов [8, 13, 17].

Инкубация нейтрофилов периферической крови человека с кверцетином (100 мкмоль/л) уменьшала их форбол-миристан-ацетат-индуцированное образование супероксидного радикала на 42%, при этом не отмечено влияния на интактные клетки. Ингибирующий эффект Qu вызван подавлением фосфорилирования белков по аминокислотным остаткам серин/треонин и транслокацией цитозольных белков p47 phox и p67 phox через клеточную мембрану [11]. В системе *in vivo* лютеолин (70 мкмоль/кг) снижал интенсивность респираторного взрыва и ослаблял хемотаксис нейтрофилов [10]. Показано модулирующее влияние Qu и Lu на активность Ca^{2+} АТФазы и Na^+/K^+ АТФазы, участвующих во внутриклеточных сигнальных процессах [11]. Уровень цитозольного Ca^{2+} интактного нейтрофила (0,1 мкМ) в 10 000 раз ниже, чем во внеклеточной среде. Повышение цитозольной концентрации Ca^{2+} активированного нейтрофила достаточно быстро происходит за счет высвобождения Ca^{2+} из внутриклеточных запасов и/или за счет притока внеклеточного Ca^{2+} . Внутриклеточный Ca^{2+} увеличивает как образование ROS (стимуляция в митохондриях ферментов цикла Кребса и окислительного фосфорилирования), так и процессы клиренса ROS (повышение активности каталазы, GSH-редуктазы, SOD). Образование фагосом также зависит от уровня кальция, что обуславливает сокращение нитей вакуоли.

Экспериментально установлено модифицирующее влияние лютеолин и кверцетина на MAPK, Wnt, PI3K/AKT/mTOR, JAK/STAT [3, 4, 5, 10, 17, 18]. Данные сигнальные каскады принимают участие в реализации респираторного взрыва и хемотаксиса, их молекулярная перестройка в результате воздействия, например, кверцетина или лютеолина, являются причиной изменения фагоцитарной активности лейкоцита. Состояние JAK/STAT-сигнальной трансдукции во многом определяет эффективность фагоцитоза. Кверцетин подавляет фосфорилирование P38/ERK/JNK, блокирует фосфорилирование mTOR, что приводит к уменьшению продукции IL-6, IL-1 β , TNF α и снижению чрезмерно выраженной воспалительной реакции. MAPK-сигнальный путь взаимодействует с PI3K/AKT/mTOR-сигнальным каскадом. Следует отметить, что на mTOR замыкаются многие сигнальные пути [17]. PI3K/AKT/mTOR-сигнальный путь в раковых клетках выполняет интегративную функцию между пролиферативными сигналами и активацией биосинтеза белка. Значительная роль в развитие ангиогенеза, индуцированного фагоцитами, отводится активированному mTOR и STAT3. Обнаружено регулирующее влияние Qu на фосфорилирование STAT3, ингибирующее влияние на активность NF- κ B [17]. Показана роль STAT3 в производстве митохондриальных

ROS и гомеостазе Ca^{2+} клетки. Установлено, что активация STAT3 усиливает фагоцитарную активность клетки, а mTORC1 отвечает за фосфорилирование данного белка. На клетках глиомы крысы (C6) показано, что кверцетин угнетал JAK2/STAT3-каскад и образование митохондриальных ROS, проявляя антиоксидантную и противоопухолевую активность, что характеризовалось снижением продукции IL-6, TNF α (активаторы JAK/STAT) и IL-1 β [18]. Кверцетин (25, 50 мкМ) в клетках линии HeLa ингибировал Wnt/ β -катениновый сигнальный путь и ERK1/2-зависимый каскад [1]. Кверцетин дозозависимо (10, 20, 40, 80, 160, 320 мкМ) блокировал Wnt-путь в клетках глиобластомы человека (U87) и эпителиоподобных клетках глиобластомы человека (T98 G) [5]. Ингибирующий эффект, зависящий от дозы лютеолина (18, 35, 70 мкмоль/кг), отмечен в системе *in vivo*. В присутствии Lu снижалось LPS-индуцированное MEK, ERK и Akt фосфорилирование в нейтрофилах. Инактивация p38 MAPK наблюдалась только при максимальной дозе лютеолина [10]. Установлено регулирующее влияние кверцетина и лютеолина на активность кальций-зависимой протеинкиназы C. Сообщалось, что в клетках линии базофильной лейкемии крыс (RBL-2H3) Lu (50 мкМ) ингибировал NF- κ B, в тучных клетках человека (HMC-1) снижал высвобождение Ca^{2+} из внутреннего депо необходимого для активации MAPK [9]. При суточной экспозиции клеточной линии MH-S с взвешенными частицами размером до 2,5 мкм (25, 50, 100 мкг/мл), добавление в опытные пробы лютеолина (80, 40, 20, 10, 5 мкМ) снижало активность JAK2/STAT1/NF- κ B сигнального пути. В эксперименте обнаружено антиоксидантное действие (повышение экспрессии HO-1) и противовоспалительный эффект (снижение экспрессии COX-2, IL-6, TNF α) лютеолина [8]. В экспериментальной модели продемонстрировано, что STAT1, являясь трансдуктором сигналов от рецепторов IFN γ и вызывая трансактивацию Fc γ RI и Fc γ RIV, повышает фагоцитарную активность макрофагов (селезенки человека и мыши соответственно). В системе *in vivo* отмечен

инактивирующий эффект лютеолина на JAK/STAT3 и NF- κ B [4]. Очевидно, научные сведения, полученные в различных экспериментальных моделях, подтверждают наличие иммуномодулирующего эффекта кверцетина и лютеолина.

В целом результаты настоящего эксперимента согласуются с результатами исследований, представленных другими авторами, о прямом/косвенном влиянии кверцетина и лютеолина на отдельные показатели иммунитета. Ослабление фагоцитоза указывает на потенциальное участие иммуномодулирующего механизма в лютеолин-опосредованном и кверцетин-опосредованном эффекте, обусловленном, возможно, выраженной антиоксидантной активностью флавоноидов. В системе *in vitro* модулирующий эффект, оказываемый флавоноидами на нейтрофильные лейкоциты практически здоровых людей, имел однонаправленный ингибирующий характер. Установлено, что кверцетин и лютеолин в концентрации 0,5 мг/л статистически значимо ($p < 0,05$) в среднем на 20% снижали интенсивность фагоцитоза относительно контрольных величин, однако средние значения показателей (процент фагоцитоза, фагоцитарное число) идентифицированы в диапазоне референтного интервала, что позволяет говорить о терапевтическом, а не токсическом эффекте Qu и Lu. При этом более выраженную ответную реакцию на флавоноиды продемонстрировали клетки периферической крови, полученные у детского населения. Вместе с тем следует отметить необходимость дальнейших исследований как *in vitro*, так и *in vivo* для детализации иммуномодулирующего механизма и определения молекул-мишеней Qu и Lu. Таким образом, использование экспериментальной модели *in vitro* для изучения влияния биофлавоноидов на показатели врожденного иммунитета позволило получить дополнительные научные сведения об иммуномодулирующих свойствах растительных полифенолов, необходимые для создания новых эффективных фармакологических препаратов, модифицирующих механизм неспецифической защиты с участием нейтрофильных гранулоцитов.

Список литературы / References

1. Кетлинский С.А., Калинина Н.М. Иммунология для врача. СПб.: Гиппократ, 1998. 156 с. [Ketlinsky S.A., Kalinina N.M. Immunology for the doctor]. St. Petersburg: Gippokrat, 1998. 156 p.
2. Селянина Г.А. Оценка состояния иммунной системы у жителей Челябинской области // Медицинская иммунология. 2006. Т. 8, № 5-6. С. 741-744. [Selyanina G.A. Evaluation of the state of the immune system in residents of the Chelyabinsk region. *Meditinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2006. Vol. 8, no. 5-6, pp. 741-744. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2006-5-6-741-744.
3. Almatroodi S.A., Alsahli M.A., Almatroudi A., Verma A.K., Aloliqui A., Allemailem K.S., Khan A.A., Rahmani A.H. Potential therapeutic targets of quercetin, a plant flavonol, and its role in the therapy of various types of cancer through the modulation of various cell signaling pathways. *Molecules*, 2021, Vol. 26, no. 5, 1315. doi: 10.3390/molecules26051315.
4. Caporali S., de Stefano A., Calabrese C., Giovannelli A., Pieri M., Savini I., Tesaro M., Bernardini S., Minieri M., Terrinoni A. Anti-inflammatory and active biological properties of the plant-derived bioactive compounds luteolin and luteolin 7-glucoside. *Nutrients*, 2022, Vol. 14, no. 2, 1155. doi: 10.3390/nu14061155.

5. Chen B., Li X., Wu L., Zhou D., Song Y., Zhang L., Wu Q., He Q., Wang G., Liu X., Hu H., Zhou W. Quercetin suppresses human glioblastoma migration and invasion via GSK3 β / β catenin/ZEB1 signaling pathway. *Front. Pharmacol.*, 2022, Vol. 13, 963614. doi: 10.3389/fphar.2022.963614.
6. Han L., Fu Q., Deng C., Luo L., Xiang T., Zhao H. Immunomodulatory potential of flavonoids for the treatment of autoimmune diseases and tumour. *Scand. J. Immunol.*, 2022, Vol. 95, e13106. doi: 10.1111/sji.13106.
7. Heinz S., Henson, D., Nieman, D., Austin, M., Jin F. A 12-week supplementation with quercetin does not affect natural killer cell activity, granulocyte oxidative burst activity or granulocyte phagocytosis in female human subjects. *Br. J. Nutr.*, 2010, Vol. 104, no. 6, pp. 849-857.
8. Hsieh W.C., Lai C.Y., Lin H.W., Tu D.G., Shen T.J., Lee Y.J., Hsieh M.C., Chen C.C., Han H.H., Chang Y.Y. Luteolin attenuates PM2.5-induced inflammatory responses by augmenting HO-1 and JAK-STAT expression in murine alveolar macrophages. *Food Agricult. Immunol.*, 2022, Vol. 33, pp. 1, 47-64.
9. Kang O., Choi J., Lee J.H. Luteolin isolated from the flowers of *Lonicer japonica* suppresses inflammatory mediator release by blocking NF- κ B and MAPKs activation pathways in HMC-1 cells. *Molecules*, 2020, Vol. 15, no. 1, pp. 385-398.
10. Lee J., Li Y., Chen H., Lin R., Huang S., Chen H., Kuan P., Liao M., Chen C., Kuan Y. Protective effects of luteolin against lipopolysaccharide-induced acute lung injury involves inhibition of MEK/ERK and PI3K/Akt pathways in neutrophils. *Acta. Pharmacol. Sin.*, 2010, Vol. 31, pp. 831-838.
11. Pečivová J., Mačičková T., Svitekova K., Nosál R. Quercetin inhibits degranulation and superoxide generation in PMA stimulated neutrophils. *Interdiscip. Toxicol.*, 2012, Vol. 5, no. 2, pp. 81-83.
12. Srikok S., Nambut S., Wongsawan K., Chuammitri P. Quercetin promotes the expression of genes involved in phagocytosis in bovine neutrophils. *Am. J. Anim. Vet. Sci.*, 2017, Vol. 12, no. 2, pp. 85-95.
13. Tian C., Liu X., Chang Y., Wang R., Lv T., Cui C., Liu M. Investigation of the anti-inflammatory and antioxidant activities of luteolin, kaempferol, apigenin and quercetin. *S. Afr. J. Bot.*, 2021, Vol. 137, pp. 257-264.
14. Yang H., Xu S., Tang L., Gong J., Fang H., Wei J., Su D. Targeting of nonapoptotic cancer cell death mechanisms by quercetin: Implications in cancer therapy. *Front. Pharmacol.*, 2022, Vol. 13, 1043056. doi: 10.3389/fphar.2022.1043056.
15. Yu C.S., Lai K.C., Yang J.S., Chiang J.H., Lu C.C., Wu C.-L., Lin J.P., Liao C.L., Tang N.Y., Wood W.G., Chung J.G. Quercetin inhibited murine leukemia WEHI-3 cells in vivo and promoted immune response. *Phytother. Res.*, 2010, Vol. 24, pp. 163-168.
16. Verhoeven D. Immunometabolism and innate immunity in the context of immunological maturation and respiratory pathogens in young children. *J. Leukoc. Biol.*, 2019, Vol. 106, pp. 301-308.
17. Wang X., Fu Y., Botchway B.O.A., Zhang Y., Zhang Y., Jin T., Liu X. Quercetin can improve spinal cord injury by regulating the mTOR signaling pathway. *Front. Neurol.*, 2022, Vol. 13, 905640. doi: 10.3389/fneur.2022.905640.
18. Zalpoor H., Nabi-Afjadi M., Forghaniesfidvajani R., Tavakol C. Farahighasreaboonasr F., Pakizeh F., Dana V.G., Seif F. Quercetin as a JAK-STAT inhibitor: a potential role in solid tumors and neurodegenerative diseases. *Cell. Mol. Biol. Lett.*, 2022, Vol. 27, no. 1, 60. doi: 10.1186/s11658-022-00355-3.

Авторы:

Долгих О.В. — д.м.н., заведующий отделом иммунобиологических методов диагностики ФБУН «Федеральный научный центр медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения», г. Пермь, Россия

Дианова Д.Г. — д.м.н., доцент, старший научный сотрудник лаборатории методов клеточных технологий отдела иммунобиологических методов диагностики ФБУН «Федеральный научный центр медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения»; профессор кафедры фармакологии ФГБОУ ВО «Пермская государственная фармацевтическая академия» Министерства здравоохранения РФ, г. Пермь, Россия

Ширинкина А.С. — младший научный сотрудник лаборатории методов клеточных технологий отдела иммунобиологических методов диагностики ФБУН «Федеральный научный центр медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения», г. Пермь, Россия

Бомбела Т.В. — д.фарм.н., доцент, профессор кафедры ботаники и фармацевтической биологии ФГБОУ ВО «Пермская государственная фармацевтическая академия» Министерства здравоохранения РФ, г. Пермь, Россия

Authors:

Dolgikh O.V., PhD, MD (Medicine), Head, Department of Immunobiological Diagnostic Methods, Federal Research Center for Medical and Preventive Technologies for Public Health Risk Management, Perm, Russian Federation

Dianova D.G., PhD, MD (Medicine), Associate Professor, Senior Research Associate, Laboratory of Cell Technology Methods of the Department of Immunobiological Diagnostic Methods, Federal Research Center for Medical and Preventive Technologies for Public Health Risk Management; Professor, Department of Pharmacology, Perm State Academy of Pharmacy, Perm, Russian Federation

Shirinkina A.S., Junior Research Associate, Laboratory of Cell Technology Methods of the Department of Immunobiological Diagnostic Methods, Federal Research Center for Medical and Preventive Technologies for Public Health Risk Management, Perm, Russian Federation

Bombela T.V., PhD, MD (Pharmacy), Associate Professor, Professor of the Department of Botany and Pharmaceutical Biology, Perm State Academy of Pharmacy, Perm, Russian Federation

Поступила 09.02.2023
Принята к печати 24.02.2023

Received 09.02.2023
Accepted 24.02.2023

ОСОБЕННОСТИ ВОЗДЕЙСТВИЯ ПЫЛЬЦЫ АМБРОЗИИ НА ОРГАНИЗМ ЧЕЛОВЕКА С ТОЧКИ ЗРЕНИЯ ПЕПТИДОМИКИ

Янченко В.В.¹, Аляхнович Н.С.¹, Семерник О.Е.², Лебеденко А.А.²

¹ УО «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет», г. Витебск, Республика Беларусь

² ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Ростов-на-Дону, Россия

Резюме. Самым сильным аллергеном амброзии (*Ambrosia artemisiifolia*) является antigen E (Amb a 1). У 97% пациентов с пыльцевой аллергией на амброзию в сыворотке крови обнаруживаются антитела IgE класса к Amb a 1 аллергену в совокупности с положительным кожным прик-тестом с аллергеном Amb a 1. В результате контакта сенсибилизированного человека с данным аллергеном в организме происходит одномоментное высвобождение из тучных клеток фермента — Homo sapiens tryptase alpha/beta 1 (TPSAB1). Особенностью этого фермента является отсутствие в организме человека его ингибитора. Нами были предприняты попытки определить наиболее значимые точки воздействия TPSAB1 после расщепления его на пептидные фрагменты. Пептидазное расщепление осуществлялось с использованием компьютерной программы Биоскан 9.14 ОДО «НИКП Ресан» (Беларусь) и базы данных Национального центра биотехнологической информации США (NCBI). Для вычислений и представления результатов использовали международный однобуквенный код аминокислотной последовательности. Данные о взаимодействии пептидов с белками человека получены с помощью программы SwissTargetPrediction. Исследуемый образец: *Ambrosia artemisiifolia* antigen E (Amb a 1) GenBank: AAA32665.1. Расщепление образца проведено с 1-й по последнюю — 396-ю аминокислоту. Длина фрагментов расщепления не задана. Фермент: Homo sapiens tryptase alpha/beta 1 (TPSAB1) Gene ID: 7177, updated on 13-May-2022. Тип фермента: эндопептидаза. Позиции расщепления: 1 r|x и 2 k|x. Аминокислотная последовательность *Ambrosia artemisiifolia* antigen E (Amb a 1) GenBank: AAA32665.1. Установлено, что в состав *Ambrosia artemisiifolia* antigen E (Amb a 1) входят 396 аминокислотных остатка. Получены 40 пептидных фрагментов расщепленного образца. Анализ лиганд-рецепторного взаимодействия подвергнуты пептиды длиной от 2 до 4 аминокислотных остатков, как имеющие наиболее сильный регуляторный потенциал (p1-4 mgik, p56-57 gk, p127-129 ldk, p143-145 gak, p274-276 mpr). Показано, что каждый из пептидов, входящих в состав Amb a 1, действует как лиганд для специфических рецепторов, опосредующих влияние на те или иные механизмы в организме больного. Дальнейшее изучение указанных взаимодействий позволило выявить наиболее значимые белки (ферменты), воздействие на которых антигена *Ambrosia artemisiifolia* antigen E (Amb a 1) приводит к изменению функциональной активности регуляторных систем организма человека, страдающего от аллергии.

Ключевые слова: амброзия, пыльца, пептиды, аллергия, диагностика, ферменты

Адрес для переписки:

Семерник Ольга Евгеньевна
ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ
346720, Россия, г. Аксай, ул. Гагарина, 196.
Тел.: 8 (918) 569-26-81.
E-mail: semernick@mail.ru

Address for correspondence:

Olga E. Semernik
Rostov State Medical University
196 Gagarin St
Aksai
346720 Russian Federation
Phone: +7 (918) 569-26-81.
E-mail: semernick@mail.ru

Образец цитирования:

В.В. Янченко, Н.С. Аляхнович, О.Е. Семерник, А.А. Лебеденко «Особенности воздействия пыльцы амброзии на организм человека с точки зрения пептидомиики» // Медицинская иммунология, 2024. Т. 26, № 1. С. 151-158.
doi: 10.15789/1563-0625-FOR-2596

© Янченко В.В. и соавт., 2024

Эта статья распространяется по лицензии Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

U.V. Yanchanka, N.S. Aliakhnovich, O.E. Semernik, A.A. Lebedenko "Features of ragweed pollen effect on humans in terms of peptidomics", *Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2024, Vol. 26, no. 1, pp. 151-158.
doi: 10.15789/1563-0625-FOR-2596

© Yanchanka U.V. et al., 2024

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

DOI: 10.15789/1563-0625-FOR-2596

FEATURES OF RAGWEED POLLEN EFFECT ON HUMANS IN TERMS OF PEPTIDOMICS

Yanchanka U.V.^a, Aliakhnovich N.S.^a, Semernik O.E.^b, Lebedenko A.A.^b

^a Vitebsk State Medical University, Vitebsk, Republic of Belarus

^b Rostov State Medical University, Rostov-on-Don, Russian Federation

Abstract. The E antigen of *Ambrosia artemisiifolia* (Amb a1) is the most potent ragweed allergen. In 97% of patients with ragweed pollen allergy, IgE antibodies to the Amb a1 are detected in blood serum, being associated with a positive skin prick test for the Amb a1 allergen. In humans, the tryptase alpha/beta 1 (TPSAB1) enzyme is simultaneously released from mast cells resulting from contact of sensitized person with this allergen. Absence of tryptase inhibitor in humans is the typical feature of this enzyme. We have attempted to determine the most significant points of TPSAB1 effects after its splitting into peptide fragments. Peptidase cleavage was carried out using the Bioscan 9.14 computer program ODO NICP Resan (Belarus), and the US National Center for Biotechnology Information (NCBI) database. The international one-letter amino acid sequence code was used for calculations and presentation of results. The data on peptide interactions with human proteins were obtained using the SwissTargetPrediction program. The test specimen was as follows: *Ambrosia artemisiifolia* antigen E (Amb a1) GenBank: AAA32665.1. Cleavage of the sample was carried out from position 1 to the last amino acid (No. 396). The length of split fragments is not specified. The studied enzyme was *Homo sapiens* tryptase alpha/beta 1 (TPSAB1) Gene ID: 7177, updated: 13-May-2022; enzyme type: endopeptidase. Split positions: 1 r|x and 2 k|x. The following amino acid sequence was analyzed: *Ambrosia artemisiifolia* antigen E (Amb a1) GenBank: AAA32665.1. It has been found that the E antigen from *Ambrosia artemisiifolia* (Amb a1) contains 396 amino acid residues. The 40 peptide fragments of the split sample were obtained. The ligand-receptor interaction was analyzed for peptides with a length of 2 to 4 amino acid residues, which had the strongest regulatory potential (p1-4 mgik, p56-57 gk, p127-129 ldk, p143-145 gak, p274-276 mpr). It has been shown that each peptide from the Amb a1 sequence acts as a ligand for specific receptors mediating the effects upon certain mechanisms in the patient's body. Further study of these interactions enables identification of the most significant proteins (enzymes), which, upon impact of E antigen from *Ambrosia artemisiifolia* (Amb a1) may lead to changed functional activity of regulatory systems in humans suffering from allergies.

Keywords: ragweed, pollen, peptides, allergy, diagnostics, enzymes

Введение

Во всех живых организмах имеются очень эффективно работающие по выполнению строго определенных функций клеточные и молекулярные машины. Работа таких машин регулируется специальными биологическими программами управления. Эти программы управления хранятся в ДНК, написаны в виде нуклеотидных последовательностей, множатся через РНК и реализуются белками и продуктами их ферментативного расщепления — пептидами. Коды этих программ универсальны, и поэтому программы управления одних организмов могут влиять на работу других. Конечным этапом реализации управления является лиганд-рецепторное взаимодействие и, как следствие, изменение параметров работы управляемых структур.

Если рассматривать пыльцевую аллергию, то возникает вопрос: почему пыльца ветроопыляемых растений (помимо размера пыльцевых зерен) имеет разные аллергенные свойства, и одной из самых аллергенных является пыльца амброзии?

На наш взгляд ответ на этот вопрос лежит в понимании того, как могут модифицироваться белковые молекулы пыльцевых зерен при попадании в организм человека и к чему это приводит.

Самым сильным аллергеном амброзии (*Ambrosia artemisiifolia*) является antigen E (Amb a1). У 97% пациентов с пыльцевой аллергией на амброзию в сыворотке крови обнаруживаются антитела IgE класса к Amb a1 аллергену и положительный результат кожного прик-теста с аллергеном Amb a1.

В результате контакта сенсibilизированного человека с аллергеном Amb a1 в организме происходит одномоментное высвобождение из тучных клеток фермента — *Homo sapiens* tryptase alpha/beta 1 (TPSAB1). Особенностью этого фермента является то, что в организме человека он не имеет своего ингибитора, поэтому действует фактически без контроля. В рамках данного исследования нами были предприняты попытки определить наиболее значимые точки воздействия TPSAB1 после расщепления его на пептидные фрагменты.

Материалы и методы

Пептидазное расщепление самого сильного аллергена амброзии для *in silico* осуществлялось с использованием компьютерной программы Биоскан 9.14 ОДО «НИКП Ресан» (Беларусь) и базы данных Национального центра биотехнологической информации США (NCBI). Для вычислений и представления результатов использовали международный однобуквенный код аминокислотной последовательности. Данные о взаимодействии пептидов с белками человека получены с помощью программы Swiss Target Prediction [3].

Исследуемый образец: *Ambrosia artemisiifolia* antigen E (Amb a 1) GenBank: AAA32665.1. Расщепление образца проведено с 1 по последнюю – 396 аминокислоту. Длина фрагментов расщепления не задана. Фермент: Homo sapiens trypsin alpha/beta 1 (TPSAB1) Gene ID: 7177, updated on 13-May-2022. Тип фермента: эндопептидаза. Позиции расщепления: 1 r|x и 2 k|x. Аминокислотная последовательность *Ambrosia artemisiifolia* antigen E (Amb a 1) GenBank: AAA32665.1, представленная в виде международного однобуквенного кода; вертикальные линии | – мест разрезания аллергена ферментом; цифры – позиции пептидных фрагментов в аллергене; числа в прямоугольных скобках – длина образовавшегося фрагмента после разрезания аллергена ферментом.

Результаты и обсуждение

Установлено, что в состав *Ambrosia artemisiifolia* antigen E (Amb a 1) входят 396 аминокислотных остатка.

mgik|hccyilyftlalvtllqpvr|saedlqeilpvnetr|ltsgayni
idgcwr|gk|adwaenr|k|al
adcaqgfgk|gtvggk|dgdiytvtseiddvdvanpk|egt|lrfgaaqn
r|plwiifer|dmvir|ldk|emvvn
sdd|tidgr|gk|veiinagftlngvk|nviihninmhdvk|vnpngglik|
s|ndgpaapr|agsgdaisisgs
sqiuidhcsk|svdglvdak|lgttr|ltsvnslftqhqvllfgagden
iedr|gmlatvafntftdndvqr
|mpr|cr|hgfqvvnnnydk|wgsyaiggsasptilsqgnr|fcapde
r|sk|k|nvlgr|hgeaaaesmk|wn
wr|tnk|dvlengafvasgvdvltpeqsagmipaepgesalsltsa
gvlscqpgapc

Получены 40 пептидных фрагментов расщепленного образца (по порядку):

- 1-4 mgik [4]
- 5-24 hccyilyftlalvtllqpvr [20]
- 25-39 saedlqeilpvnetr [15]
- 40-40 r [1]
- 41-55 ltsgayniidgcwr [15]
- 56-57 gk [2]
- 58-64 adwaenr [7]
- 65-65 k [1]
- 66-76 aladcaqgfgk [11]
- 77-82 gtvggk [6]

- 83-101 dgdiytvtseiddvdvanpk [19]
- 102-106 egtl [5]
- 107-113 fgaaqn [7]
- 114-121 plwiifer [8]
- 122-126 dmvir [5]
- 127-129 ldk [3]
- 130-137 emvvn [8]
- 138-142 tidgr [5]
- 143-145 gk [3]
- 146-159 veiinagftlngvk [14]
- 160-172 nviihninmhdvk [13]
- 173-180 vnpngglik [8]
- 181-189 sndgpaapr [9]
- 190-214 agsgdaisisgsqiwidhcsk [25]
- 215-223 svdglvdak [9]
- 224-228 lgttr [5]
- 229-255 ltsvnslftqhqvllfgagdeniedr [27]
- 256-273 gmlatvafntftdndvqr [18]
- 274-276 mpr [3]
- 277-278 cr [2]
- 279-291 hgffqvvnnnydk [13]
- 292-311 wgsyaiggsasptilsqgnr [20]
- 312-318 fcapder [7] 321-321 k [1]
- 322-326 nvlgr [5]
- 327-336 hgeaaaesmk [10]
- 337-340 wnwr [4]
- 341-343 tnk [3]
- 344-396 dvlengafvasgvdvltpeqsagmipaepgesalsltsa
gvlscqpgapc [53]
- 319-320 sk [2]

Далее анализу лиганд-рецепторного взаимодействия были подвергнуты пептиды длиной от 2 до 4 аминокислотных остатков, как имеющие наиболее сильный регуляторный потенциал (табл. 1).

Если рассматривать не прямое, а опосредованное влияние, то представленные выше пептиды суммарно будут влиять на работу более тысячи белков человека, так, например, на схеме ниже представлено регуляторное взаимодействие только одного белка-рецептора – C3a anaphylatoxin chemotactic receptor (C3AR1) (рис. 1, см. 3-ю стр. обложки).

Дальнейшее изучение указанных взаимодействий позволило выявить наиболее значимые белки (ферменты), воздействие на которых антигена *Ambrosia artemisiifolia* antigen E (Amb a 1) приводит к изменению функциональной активности регуляторных систем организма человека, страдающего от аллергии. Так, например, в настоящее время изучено влияние молекул циклооксигеназы 2 (ЦОГ2) и фосфолипазы A2 (ФЛА2) на поддержание процессов воспаления в тканях [2, 6]. Долгое время считалось, что именно ЦОГ2 играет ключевую роль в патогенезе воспаления дыхательных путей при респираторных заболеваниях, включая бронхиальную астму. Установлено, что ЦОГ2 может экспрессироваться в

ТАБЛИЦА 1. НАИБОЛЕЕ ЗНАЧИМЫЕ ПЕПТИДНЫЕ ФРАГМЕНТЫ РАСЩЕПЛЕННОГО БЕЛКА *AMBROSIA ARTEMISIIFOLIA* ANTIGEN E (Amb a 1)

TABLE 1. MOST SIGNIFICANT PEPTIDE FRAGMENTS OF THE CLEAVED PROTEIN ARE THE *AMBROSIA ARTEMISIIFOLIA* ANTIGEN (Amb a 1)

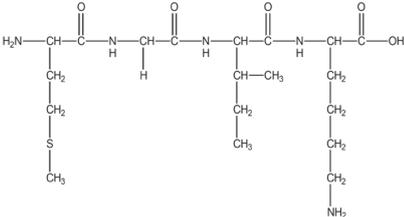
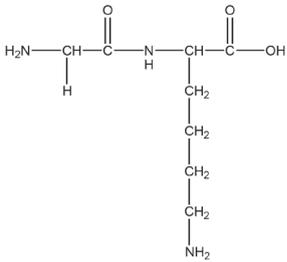
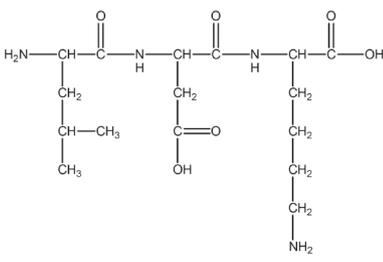
<p>Позиция пептида в белке Аминокислотная последовательность «Каноническая SMILES» Position of the peptide in the protein Amino acid sequence is "Canonical SMILES"</p>	<p>Формула Formula</p>	<p>Количество белков, на которые он влияет Number of proteins it affects</p>	<p>Наиболее значимые белки, на которые оказывает влияние пептид Most significant proteins affected by peptides</p>
<p>p1-4 mgik NC(CCSC)C(NC([H])C(NC(C(CC)C)C(NC(CCCCN)C(O)=O)=O)=O</p>		<p>38</p>	<p>Angiotensin-converting enzyme; Beta-3 adrenergic receptor; Cyclooxygenase-2; Calcium sensing receptor; Lipoxin A4 receptor; Renin; Thrombin; Thromboxane-A synthase; TNF-alpha; Matrix metalloproteinase 3; Matrix metalloproteinase 9</p>
<p>p56-57 gk NC([H])C(NC(CCCCN)C(O)=O)=O</p>		<p>56</p>	<p>Angiotensin-converting enzyme; Cyclooxygenase-2; Lipoxin A4 receptor; Renin; Thrombin; Matrix metalloproteinase 3. Ещё и: Calpain 1; Cathepsin (B and K); Cathepsin D; Matrix metalloproteinase 1; Matrix metalloproteinase 2; Phospholipase A2 group IIA; Phospholipase A2 group V; Bile acid receptor FXR</p>
<p>p127-129 ldk NC(CC(C)C)C(NC(CC(O)=O)C(NC(CCCCN)C(O)=O)=O</p>		<p>75</p>	<p>TRAIL receptor-1; Acyl-CoA: dihydroxyacetone phosphate acyltransferase; Cathepsin E; Cathepsin L; ADAM9; Leukocyte elastase; Granzyme B; Caspase-8; Caspase-2; Caspase-3; Caspase-6; Caspase-7; Caspase-1; Elastase 1</p>

Таблица 1 (продолжение)
Table 1 (continued)

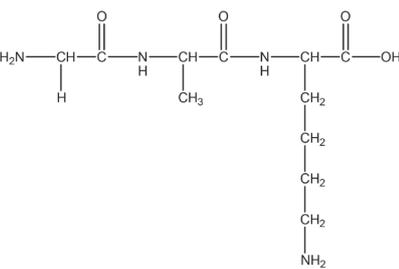
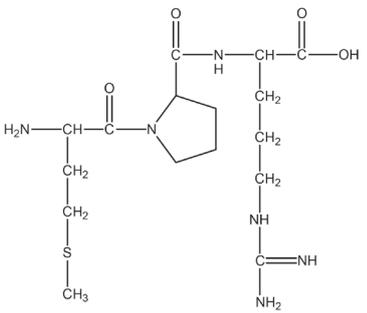
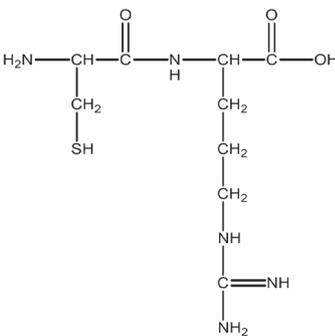
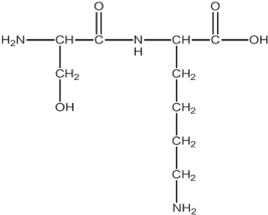
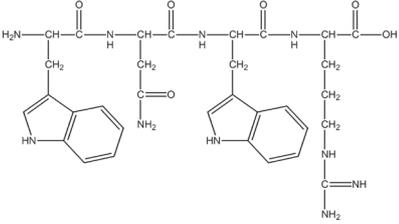
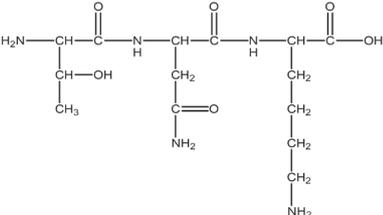
<p>Позиция пептида в белке Аминокислотная последовательность «Каноническая SMILES» Position of the peptide in the protein Amino acid sequence is "Canonical SMILES"</p>	<p>Формула Formula</p>	<p>Количество белков, на которые он влияет Number of proteins it affects</p>	<p>Наиболее значимые белки, на которые оказывает влияние пептид Most significant proteins affected by peptides</p>
<p>p143-145 gak NC([H])C(NC(C)C(NC(CCCCN)C(O)=O)=O)=O</p>		<p>90</p>	<p>Neurotensin receptor 2; Complement factor B; Endothelin-converting enzyme 1; Thyrotropin-releasing hormone receptor (by homology); Fibroblast activation protein alpha (by homology); Beta-glucocerebrosidase; Estradiol 17-beta-dehydrogenase 3; Nitric oxide synthase, inducible; N-acylsphingosine-amidohydrolase</p>
<p>p274-276 mpr NC(CCSC)C(N1C(C(NC(CCCNC(N)=N)C(O)=O)=O)CCC1)=O</p>		<p>52</p>	<p>Lysine-specific histone demethylase 1; Furin; Complement factor B; Thrombin and coagulation factor X; Neuropilin-1 (by homology); Thrombin; Neurotensin receptor 1; Protein farnesyltransferase; Hepatocyte growth factor activator; Integrin alpha-5/beta-1; Integrin alpha-V/beta-3; Integrin alpha-V/beta-1; Integrin alpha-4; Inhibitor of apoptosis protein 3; Ghrelin receptor; Matrix metalloproteinase 12; Coagulation factor VII/tissue factor</p>
<p>p277-278 cr* NC(CS)C(NC(CCCNC(N)=N)C(O)=O)=O</p>		<p>29</p>	<p>Complement factor B, Furin, Neurotensin receptor 2, Subtilisin/kexin type 6, Hepatocyte growth factor activator, Neuropilin-1, WD repeat-containing protein 5, Angiotensin-converting enzyme, Renin, Epoxide hydratase, Neprilysin, Inhibitor of apoptosis protein 3, Proteinase-activated receptor 2, Transmembrane protease serine 6, Integrin alpha-IIb/beta-3</p>

Таблица 1 (окончание)
Table 1 (continued)

<p>Позиция пептида в белке Аминокислотная последовательность «Каноническая SMILES» Position of the peptide in the protein Amino acid sequence is "Canonical SMILES"</p>	<p>Формула Formula</p>	<p>Количество белков, на которые он влияет Number of proteins it affects</p>	<p>Наиболее значимые белки, на которые оказывает влияние пептид Most significant proteins affected by peptides</p>
<p>p319-320 sk NC(CO) C(NC(CCCCN)C(O)=O)=O</p>		<p>114</p>	<p>HLA class I histocompatibility antigene, n A-3 Disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 8, Renin, Cathepsin E, L, B, K, Pepsin A, ADAM9, Aminopeptidase N, Lipoxin A4 receptor, Beta-secretase 1, Pepsinogen C, Aminopeptidase A</p>
<p>p337-340 wnwr NC(CC1=CNC2=C1C=CC=C2) C(NC(CC(N)=O) C(NC(CC3=CNC4=C3C=CC=C4) C(NC(CCCNC(N)=N) C(O)=O)=O)=O</p>		<p>87</p>	<p>Melanocortin receptor 4; C3a anaphylatoxin chemotactic receptor; Neurotensin receptor 1</p>
<p>p341-343 tnk NC(C(C)O) C(NC(CC(N)=O)C(NC(CCCCN) C(O)=O)=O)=O</p>		<p>90</p>	<p>HLA class I histocompatibility antigene, n A-3 Disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 8, Renin, Cathepsin E, L, B, K, Pepsin A, ADAM9, Aminopeptidase N, Lipoxin A4 receptor, Beta-secretase 1, Pepsinogen C</p>

Примечание. * – пептид обладает мутагенным действием с вероятностью 0,56.

Note. *, peptide has a mutagenic effect with a probability of 0.56.

ответ на широкий спектр провоспалительных цитокинов и медиаторов, но и оказывать противовоспалительное, бронхопротекторное действие в дыхательных путях в дополнение к их провоспалительному действию [6, 7]. Таким образом, воздействие на молекулу ЦОГ2 антигена Amb a 1 в свою очередь может привести к изменению патофизиологии респираторных аллергических заболеваний, характеризующихся нарушением регуляции воспаления. Кроме того, достаточно

подробно изучена роль матриксных металлопротеиназ в патогенезе аллергических заболеваний, а также показано их влияние на процессы ремоделирования тканей у людей с аллергией [1, 4, 5, 8]. Таким образом, изучение особенностей воздействия фрагментов Amb a 1 на ферменты организма человека необходимо для понимания механизмов острого и поддержания хронического воспаления в тканях.

Важно понимать, что каждый из пептидов, входящих в состав Amb a 1, действует как лиганд для специфических рецепторов, опосредующих влияние на те или иные механизмы в организме больного. Это еще раз показывает, что продукты распада данного антигена играют важную роль не только в иммунных реакциях, но и в механизмах гуморального гомеостаза.

Наличие столь разнообразных данных о влиянии приведенных пептидов на организм человека с пыльцевой сенсибилизацией, а также отсутствие сведений о взаимовлиянии фрагментов Amb a 1 в литературе, диктует необходимость продолжения исследований в данном научном направлении.

Заключение

Пептидазное расщепление самого сильного аллергена амброзии Amb a 1 позволило выделить 40 пептидных фрагментов, входящих в состав данного антигена. Дальнейший анализ лиганд-рецепторного взаимодействия, которому были подвергнуты пептиды длиной от 2 до 4 аминокислотных остатков, установил пептиды, имеющие наиболее сильный регуляторный потенциал. Тщательное изучение особенностей воздействия данных пептидов на организм больных с аллергопатологией позволит найти ключ к пониманию самых тонких механизмов патогенеза пыльцевой аллергии.

Список литературы / References

1. Лебедеко А.А., Семерник О.Е., Дударева М.В., Тюрина Е.Б. Роль матриксной металлопротеиназы-9 в генезе хронического воспаления бронхов у детей с бронхиальной астмой // Российский вестник перинатологии и педиатрии, 2020. Т. 65, № 2. С. 49-54. [Lebedenko A.A., Semernik O.E., Dudareva M.V., Tyurina E.B. The role of matrix metalloproteinase-9 in the genesis of chronic bronchial inflammation in children with bronchial asthma. *Rossiyskiy vestnik perinatologii i pediatrii = Russian Bulletin of Perinatology and Pediatrics*, 2020, Vol. 65, no. 2, pp. 49-54. (In Russ.)]
2. Huang E., Ong P.Y. Severe atopic dermatitis in children. *Curr. Allergy Asthma Rep.*, 2018, Vol. 18, no. 6, 35. doi: 10.1007/s11882-018-0788-4.
3. <http://swisstargetprediction.ch/>
4. Kuo C.-H.S., Pavlidis S., Zhu J., Loza M., Baribaud F., Rowe A., Pandis I., Gibeon D., Hoda U., Sousa A., Wilson S.J., Howarth P., Shaw D., Fowler S., Dahlen B., Chanez P., Krug N., Sandstrom T., Fleming L., Corfield J., Auffray C., Djukanovic R., Sterk P.J., Guo Y., Adcock I.M., Chung K.F., U-BIOPRED Project Team. Contribution of airway eosinophils in airway wall remodeling in asthma: Role of MMP-10 and MET. *Allergy*, 2019, Vol. 74, no. 6, pp. 1102-1112.
5. Naik S.P., Mahesh P.A., Jayaraj B.S., Madhunapantula S.V., Jahromi S.R., Yadav M.K. Evaluation of inflammatory markers interleukin-6 (IL-6) and matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) in asthma. *J. Asthma*, 2017, Vol. 54, no. 6, pp. 584-593.
6. Rumzhum N.N., Ammit A.J. Cyclooxygenase 2: its regulation, role and impact in airway inflammation. *Clin. Exp. Allergy*, 2016, Vol. 46, no. 3, pp. 397-410.
7. Yu Y., Li X., Qu L., Chen Y., Dai Y., Wang M., Zou W. DXXK exerts anti-inflammatory effects by inhibiting the lipopolysaccharide-induced NF- κ B/COX-2 signalling pathway and the expression of inflammatory mediators. *J. Ethnopharmacol.*, 2016, Vol. 178, pp. 199-208.
8. Zhou Y., Xu M., Gong W., Kang X., Guo R., Wen J., Zhou D., Wang M., Shi D., Jing Q. Circulating MMP-12 as Potential Biomarker in Evaluating Disease Severity and Efficacy of Sublingual Immunotherapy in Allergic Rhinitis. *Mediators Inflamm.*, 2022, Vol. 2022, 3378035. doi: 10.1155/2022/3378035.

Авторы:

Янченко В.В. — к.м.н., доцент кафедры клинической иммунологии и аллергологии с курсом ФПК и ПКУО «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет», г. Витебск, Республика Беларусь

Аляхнович Н.С. — к.м.н., доцент кафедры клинической иммунологии и аллергологии с курсом ФПК и ПКУО «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет», г. Витебск, Республика Беларусь

Authors:

Yanchanka U.V., PhD (Medicine), Associate Professor, Department of Clinical Immunology and Allergology, Vitebsk State Medical University, Vitebsk, Republic of Belarus

Aliakhnovich N.S., PhD (Medicine), Associate Professor, Department of Clinical Immunology and Allergology, Vitebsk State Medical University, Vitebsk, Republic of Belarus

Семерник О.Е. — д.м.н., доцент кафедры детских болезней № 2 ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Ростов-на-Дону, Россия

Semernik O.E., PhD, MD (Medicine), Associate Professor, Department of Children's Diseases No. 2, Rostov State Medical University, Rostov-on-Don, Russian Federation

Лебеденко А.А. — д.м.н., профессор, заведующий кафедрой детских болезней № 2 ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Ростов-на-Дону, Россия

Lebedenko A.A., PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Department of Children's Diseases No. 2, Rostov State Medical University, Rostov-on-Don, Russian Federation

Поступила 21.10.2022
Отправлена на доработку 24.10.2022
Принята к печати 08.11.2022

Received 21.10.2022
Revision received 24.10.2022
Accepted 08.11.2022

АНТИИДИОТИПИЧЕСКИЕ АНТИТЕЛА ПРОТИВ ЭСТРАДИОЛА И ГЕНЕТИЧЕСКИЙ ПОЛИМОРФИЗМ ЭСТРОГЕНОВЫХ РЕЦЕПТОРОВ α И β У БОЛЬНЫХ РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Глушков А.Н.¹, Поленок Е.Г.¹, Гордеева Л.А.¹, Мун С.А.¹,
Антонов А.В.², Байрамов П.В.², Вержбицкая Н.Е.²,
Колпинский Г.И.^{3, 4}, Вафин И.А.⁵

¹ ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр угля и углехимии Сибирского отделения Российской академии наук», г. Кемерово, Россия

² ГБУЗ «Кузбасский клинический онкологический диспансер имени М.С. Раппопорта», г. Кемерово, Россия

³ ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный медицинский университет», г. Кемерово, Россия

⁴ ГАУЗ «Клинический консультативно-диагностический центр имени И.А. Колпинского», г. Кемерово, Россия

⁵ ГКУЗ «Кузбасский центр крови», г. Кемерово, Россия

Резюме. Идентификация маркеров риска возникновения ER⁺/PR⁺ рака молочной железы (РМЖ) и конверсии ER⁺/PR⁺ опухолей в ER⁻/PR⁻ необходима для повышения эффективности профилактики и лечения РМЖ селективными модуляторами ER. Цель исследования – выявить предполагаемые ассоциации полиморфизма генов *ESR1* rs2234693 и *ESR2* rs4986938, а также антиидиотипических антител к эстрадиолу (IgG₂-E2) с риском возникновения ER⁺/PR⁺ РМЖ и конверсией ER⁺/PR⁺ опухолей в ER⁻/PR⁻ и ER⁻/PR⁺; установить, имеются ли взаимосвязи между генетическими вариантами *ESR* и IgG₂-E2 у здоровых женщин и больных РМЖ. Полиморфные локусы в генах *ESR1* rs2234693 и *ESR2* rs4986938 исследовали с помощью ПЦР в реальном времени у 370 здоровых женщин и 1169 больных РМЖ. ER и PR в ткани опухоли определяли стандартным иммуногистохимическим методом. Сывороточные IgG₂-E2 исследовали с помощью неконкурентного иммуноферментного анализа. Генотипы TT, TC и CC гена *ESR1* rs2234693 встречались с одинаковой частотой у здоровых женщин и больных РМЖ I стадии. Генотип GG гена *ESR2* обнаруживали реже, а генотип AA *ESR2* чаще у больных РМЖ I стадии с ER⁺/PR⁺ опухолями, чем у здоровых женщин (44,0% и 14,2% против 52,7% и 8,4% соответственно, $p = 0,005$). Низкие уровни IgG₂-E2 встречались реже, а высокие – чаще у больных РМЖ I стадии с ER⁺/PR⁺ опухолями, чем у здоровых (39,8% и 60,2% против 58,0% и 42,0% соот-

Адрес для переписки:

Мун Стелла Андреевна
Институт экологии человека ФГБНУ «Федеральный
исследовательский центр угля и углехимии Сибирского
отделения Российской академии наук»
650065, Россия, г. Кемерово, Ленинградский пр., 10.
Тел.: 8 (3842) 57-50-79.
E-mail: stellamun@yandex.ru

Address for correspondence:

Stella A. Mun
Institute of Human Ecology, Federal Research Center
of Coal and Coal Chemistry
10 Leningradsky Ave
Kemerovo
650065 Russian Federation
Phone: +7 (3842) 57-50-79.
E-mail: stellamun@yandex.ru

Образец цитирования:

А.Н. Глушков, Е.Г. Поленок, Л.А. Гордеева, С.А. Мун,
А.В. Антонов, П.В. Байрамов, Н.Е. Вержбицкая,
Г.И. Колпинский, И.А. Вафин «Антиидиотипические
антитела против эстрадиола и генетический
полиморфизм эстрогеновых рецепторов α и β у
больных раком молочной железы» // Медицинская
иммунология, 2024. Т. 26, № 1. С. 159-168.
doi: 10.15789/1563-0625-AIA-2598

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

For citation:

A.N. Glushkov, E.G. Polenok, L.A. Gordeeva, S.A. Mun,
A.V. Antonov, P.V. Bayramov, N.E. Verzhbitskaya,
G.I. Kolpinskiy, I.A. Vafin "Antiidiotypic antibodies to estradiol
and gene polymorphisms of α and β estrogenic receptors in
breast cancer patients", *Medical Immunology (Russia)/
Meditsinskaya Immunologiya*, 2024, Vol. 26, no. 1, pp. 159-168.
doi: 10.15789/1563-0625-AIA-2598

© Glushkov A.N. et al., 2023
The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License
DOI: 10.15789/1563-0625-AIA-2598

ветственно, $p = 0,0002$). Снижение удельного веса ER⁺/PR⁺ опухолей и повышение удельного веса ER⁻/PR⁻ опухолей у больных РМЖ II-IV стадий по сравнению с больными РМЖ I стадии (58,9% и 23,1% против 71,7% и 13,9% соответственно, $p = 0,006$) имело место только у гетерозигот TC *ESR1*. Аналогичная конверсия ER⁺/PR⁺ опухолей в ER⁻/PR⁻ наблюдалась у гомозигот GG *ESR2* ($p = 0,004$). Такие же изменения при росте РМЖ имели место у больных с высокими уровнями IgG₂-E2 (57,6% и 25,0% против 74,7% и 11,3% соответственно, $p < 0,0001$). Высокие и низкие уровни IgG₂-E2 встречались с одинаковой частотой при любом генотипе генов *ESR1* и *ESR2* у здоровых женщин и больных РМЖ. Полиморфизм генов *ESR1-2* и уровни сывороточных IgG₂-E2 могут быть использованы как независимые маркеры риска возникновения ER⁺/PR⁺ РМЖ и конверсии ER⁺/PR⁺ опухолей в ER⁻/PR⁻ при прогрессии РМЖ.

Ключевые слова: рак молочной железы, стероидные рецепторы, антиидиотипические антитела, эстрадиол

ANTIIDIOTYPIC ANTIBODIES TO ESTRADIOL AND GENE POLYMORPHISMS OF α AND β ESTROGENIC RECEPTORS IN BREAST CANCER PATIENTS

Glushkov A.N.^a, Polenok E.G.^a, Gordeeva L.A.^a, Mun S.A.^a,
Antonov A.V.^b, Bayramov P.V.^b, Verzhbitskaya N.E.^b, Kolpinskiy G.I.^{c, d},
Vafin I.A.^e

^a Federal Research Center of Coal and Coal Chemistry, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Kemerovo, Russian Federation

^b Kuzbass Clinical Oncology Dispensary, Kemerovo, Russian Federation

^c Kemerovo State Medical University, Kemerovo, Russian Federation

^d Kemerovo Clinical Diagnostic Center, Kemerovo, Russian Federation

^e Kuzbass Center of Blood, Kemerovo, Russian Federation

Abstract. Markers for identification of ER⁺/PR⁺ breast cancer (BC) risks and conversion of ER⁺/PR⁺ to ER⁻/PR⁻ tumors are necessary for effective prevention and therapy of BC by the selective ER modifying drugs. Our purpose was to reveal the suggested associations of gene polymorphisms of *ESR1* and *ESR2* and antiidiotypic antibodies to estradiol (IgG₂-E2) with ER⁺/PR⁺ BC risk, and conversion of ER⁺/PR⁺ to ER⁻/PR⁻ tumors and to study interrelations between gene variants of *ESR* and IgG₂-E2 in healthy women and BC patients. Polymorphic loci of *ESR1* (rs2234693) and *ESR2* (rs4986938) were studied by the real-time PCR in 370 healthy women and 1169 BC patients. ER and PR in the tumor tissues were detected by standard immunohistochemical techniques. Serum IgG₂-E2 were studied using non-competitive enzyme immunoassay. TT, TC and CC genotypes of *ESR1* were revealed at the equal frequency in healthy women and stage I BC patients. GG homozygotes of *ESR2* were detected rarely, but AA were more frequent in BC patients with ER⁺/PR⁺ tumors (stage I) than in healthy women (44.0% and 14.2% vs 52.7% and 8.4%, respectively; $p = 0.005$). Low levels of IgG₂-ES were revealed more rarely but high levels were detected more frequently in BC patients with ER⁺/PR⁺ tumors (stage I) than in healthy persons (39.8% vs 60.2%, and 58.0% vs 42.0%, respectively; $p = 0.0002$). Decreasing proportion of ER⁺/PR⁺ tumors and corresponding increase of ER⁻/PR⁻ tumors from stage I to II–IV (71.7% to 58.9% and 13.9% to 23.1%; $p = 0.006$) were revealed only for the TC heterozygotes of *ESR1*. The same conversion of ER⁺/PR⁺ tumors to ER⁻/PR⁻ was detected for the GG homozygotes of *ESR2* ($p = 0.004$). A similar ER/PR changes were revealed in BC patients with high IgG₂-E2 levels (74.7% to 57.6% and 11.3%, to 25.0%, respectively, $p < 0.0001$). High and low IgG₂-E2 levels showed similar frequency at any genotypes of *ESR1* and *ESR2*, either among healthy women, or in BC patients. *ESR1-2* gene polymorphisms and serum IgG₂-E2 levels may be used as independent markers for prediction of ER⁺/PR⁺ breast cancer, and for assessment of ER⁺/PR⁺ to ER⁻/PR⁻ tumor conversion during BC progression.

Keywords: breast cancer, steroid receptors, antiidiotypic antibodies, estradiol

Работа выполнена в рамках проекта VI.59.1.1 Программы фундаментальных научных исследований СО РАН (гос. задание АААА-А21-121011590009-9).

Введение

Рак молочной железы (РМЖ) остается самым распространенным онкологическим заболеванием у женщин в России и за рубежом [2, 14]. В комплексном лечении РМЖ широко применяются селективные модуляторы эстрогеновых рецепторов – тамоксифен, ралоксифен, лазофоксифен и др. Обсуждаются и перспективы их использования для профилактики РМЖ [10, 13, 15]. Считается, что эффективность этих препаратов и благоприятный исход терапии и профилактики РМЖ определяется наличием в опухоли рецепторов эстрадиола и прогестерона (ER и PR). Между тем у некоторых больных РМЖ стероидные рецепторы могут отсутствовать в опухоли уже при I стадии, а при последующих стадиях удельный вес рецептор-негативных опухолей возрастает [8]. Конверсия рецептор-положительных первичных опухолей в рецептор-отрицательные метастазы рассматривается как один из механизмов опухолевой прогрессии [3].

Поэтому поиск информативных маркеров риска возникновения ER⁺/PR⁺ РМЖ у здоровых женщин и конверсии ER⁺/PR⁺ опухолей в ER⁺/PR⁻ и ER⁻/PR⁻ у больных РМЖ является актуальной практической задачей. В связи с этим, особый интерес представляют исследования полиморфных вариантов генов ER α и β (*ESR1* и *ESR2*), поскольку показаны их ассоциации с риском возникновения РМЖ [4, 6, 9, 16]. Однако при этом осталось неизвестным, связаны ли эти генетические полиморфизмы с возникновением именно ER⁺/PR⁺ РМЖ и с конверсией ER⁺/PR⁺ опухолей в ER⁺/PR⁻ и ER⁻/PR⁻.

В нашем предварительном исследовании обнаружено, что высокие уровни сывороточных антиидиотипических антител, специфичных к эстрадиолу (IgG₂-E2), способных связываться с мембранным ER, встречаются чаще у больных РМЖ по сравнению со здоровыми женщинами, и у больных РМЖ с ER⁺/PR⁺ опухолями по сравнению с больными РМЖ ER⁻/PR⁻ опухолями [1]. Поскольку анти-ER антитела, выделенные из сыворотки крови больных РМЖ, способны распознавать поверхностные ER и индуцировать пролиферацию ER⁺ MCF-7 клеток молочной железы *in vitro* [12], можно предположить, что обнаруженные нами IgG₂-E2 тоже стимулируют пролиферацию ER⁺ нормальных и опухолевых клеток молочной железы и таким образом участвуют в конверсии ER⁺/PR⁺ опухолей в ER⁻/PR⁻. Однако ассоциации IgG₂-E2 с конверсией стероидных рецепторов при росте РМЖ остались неизучен-

ными. Не был выполнен и анализ взаимосвязей генетических полиморфизмов *ESR1* и *ESR2* с образованием IgG₂-E2 у здоровых женщин и больных РМЖ.

Цель исследования – выявить предполагаемые ассоциации IgG₂-E2 и генетических полиморфизмов *ESR1* и *ESR2* с риском возникновения ER⁺/PR⁺ РМЖ и с конверсией ER⁺/PR⁺ опухолей в ER⁺/PR⁻ и ER⁻/PR⁻, установить, имеются ли взаимосвязи между генетическими вариантами *ESR1-2* и IgG₂-E2 у здоровых женщин и больных РМЖ.

Материалы и методы

В настоящее исследование были включены 1539 женщин в постменопаузе. В исследуемую группу вошли 1169 женщин с диагнозом «инвазивная карцинома молочной железы», все женщины поступили на лечение в Кузбасский клинический онкологический диспансер г. Кемерово. Согласно TNM классификации, I стадию РМЖ выявили у 40,2% женщин, II стадию – у 41,7% женщин, III+IV стадии – у 18,1% женщин. Наличие эстрогеновых и прогестероновых рецепторов в опухоли (ER⁺/-, PR⁺/-) у больных РМЖ определяли иммуногистохимически по стандартной методике в патологоанатомическом отделении. У больных I стадией РМЖ ER⁺/PR⁺ опухоли обнаружены в 69,1%; ER⁺/PR⁻ в 15,5%; ER⁻/PR⁻ в 15,3% случаев. У больных II-IV стадиями, соответственно, в 58,5%; 17,0% и 24,5% случаев. Медиана возраста всех женщин с РМЖ составила 63 года (интерквартильный размах 58-69).

В группу сравнения были включены 370 условно здоровых женщин в постменопаузе без патологии молочной железы. Медиана возраста в этой группе составила 57 лет (интерквартильный размах 53-61).

Венозную кровь у обследуемых женщин забирали согласно этическим стандартам в соответствии с Хельсинкской декларацией (редакция 2013 г.) и в соответствии с «Правилами клинической практики в Российской Федерации», утвержденными Приказом Минздрава РФ № 266 от 19.06.2003 г. Информированное письменное согласие было получено от всех участниц исследования.

Антиидиотипические антитела IgG₂-E2 определяли на коммерческих наборах «ИммуноФА-Эстрадиол» («Иммунотех», Москва) с иммобилизованными на пластике моноклональными антителами против E2 в качестве антигена согласно методике [1]. Уровни IgG₂-E2 выражали в относительных единицах и рассчитывали по отношению связывания сывороточных антител с иммобилизованными на пластике антителами против E2 (за вычетом фонового связывания с

отрицательным контролем) к отрицательному контролю.

Образцы ДНК выделяли из лимфоцитов периферической крови с помощью метода фенол – хлороформной экстракции с последующим осаждением этанолом, образцы ДНК хранили при -20°C .

Генотипирование однонуклеотидных замен rs2234693 *ESR1* и rs4986938 *ESR2* выполняли методом ПЦР в режиме реального времени с использованием конкурирующих TaqMan-зондов. Реакцию амплификации проводили в следующих условиях: начальная денатурация ($96^{\circ}\text{C} - 3$ мин); затем 50 циклов, включающих денатурацию при $96^{\circ}\text{C} - 8$ с, отжиг праймеров при $58^{\circ}\text{C} - 40$ с и последующую элонгацию при $72^{\circ}\text{C} - 8$ с. Общий объем реакционной смеси был 20 мкл. Смесь содержала: 65 мМ Трис-НСl (рН 8,9), 24 мМ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 3,0 мМ MgCl_2 , 0,05% Tween 20, 0,2 мМ dNTP, 20-100 нг ДНК; 300 мМ каждого праймера (прямой: 5'-cagggttatgtgccaatgac-3' и обратный: 5'-accaatgctcatcccaactc-3' для rs2234693 *ESR1*; прямой: 5'-cacagtctcagtgacgacct-3' и обратный: 5'-cccaggctcctgacacact-3' для rs4986938 *ESR2*); 100-200 мМ TaqMan-зондов (для rs2234693 *ESR1*: 5'-Fam-agcataaaacagctgggacat-BHQ-3' и 5'-Hex-agcataaaacggctgggacat-BHQ-3'; для rs4986938 *ESR2*: 5'-Fam-cttcagctgtgacctgt-BHQ-3' и 5'-Hex-cttcagctgtgacct-BHQ-3'); 0,5 единиц активности термостабильной Taq-полимеразы. Амплификацию проводили с помощью термоциклера CFX-96 (Bio-Rad, США).

Для статистической обработки экспериментальных данных использовали Statistica 8.0 (StatSoft Inc., USA), онлайн-калькулятор <https://www.snpstats.net/start.htm>. Соответствие частот генотипов изучаемых генов равновесию Харди-Вайнберга (HWE) оценивали с помощью критерия χ^2 Пирсона. Нулевую гипотезу отвергали при $p < 0,05$. Тип распределения качественных признаков оценивали с помощью W-критерия Шапиро-Уилка. Так как распределение признаков имело ненормальный характер, в дальнейшем использовали непараметрический критерий χ^2 с поправкой Йейтса (Yates) на непрерывность вариации для выявления различий между исследуемыми группами. Критический уровень значимости принимался $p < 0,05$. Пороговые значения уровней антител (cut-off) были рассчитаны с помощью ROC-анализа [7]. Ассоциации антиидиотипических антител IgG₂-E2 и генетических полиморфизмов *ESR1* и *ESR2* с РМЖ оценивали с помощью показателя отношения шансов (OR) с доверительным интервалом (CI) при 95%-ном уровне значимости. В качестве базовой модели использовали аддитивную модель наследования признака.

Результаты и обсуждение

На первом этапе исследовали предполагаемые ассоциации IgG₂-E2 и генетических полиморфизмов *ESR1* и *ESR2* с риском возникновения РМЖ, учитывая статус стероидных рецепторов опухоли.

Выявлены статистически значимые различия между здоровыми женщинами и больными РМЖ I стадии с ER⁺/PR⁺ опухолями по содержанию в сыворотке крови IgG₂-E2 (табл. 1). Пороговым уровнем исследованных антител, по которому эти группы имели наибольшее различие (cut-off), оказался IgG₂-E2 = 3,5. Низкие уровни IgG₂-E2 $\leq 3,5$ встречались у больных реже (39,8%), а высокие IgG₂-E2 $> 3,5$ – чаще (60,2%), чем у здоровых (58,0% и 42,0% соответственно, $p = 0,0002$). В аналогичном сравнении больных РМЖ I стадии с ER⁺/PR⁻ и ER⁻/PR⁻ опухолями со здоровыми женщинами не было значимых различий ($p = 0,782$ и $p = 0,686$ соответственно). Таким образом, высокие уровни IgG₂-E2 оказались маркером высокого риска возникновения только ER⁺/PR⁺ РМЖ.

Сравнительный анализ полиморфизма генов *ESR1-2* у здоровых женщин и больных РМЖ I стадии с учетом статуса стероидных рецепторов опухоли в аддитивной модели наследования показал следующее (табл. 2). Исследованные группы не имели статистически значимых различий по удельному весу отдельных генотипов и аллелей гена *ESR1* rs2234693. Искомые различия обнаружены между здоровыми женщинами и больными РМЖ I стадии с ER⁺/PR⁺ опухолями по распределению вариантов гена *ESR2* (rs4986938) с высоким уровнем статистической значимости ($p = 0,005$). Маркером риска возникновения ER⁺/PR⁺ РМЖ (OR = 1,4) оказался аллель +1730A. У больных с ER⁺/PR⁺ опухолями он обнаружен в 35,1%, а у здоровых женщин – в 27,8%, в то время как +1730G-аллель обнаружен в 64,9% и 72,2% соответственно. Больные с опухолями ER⁺/PR⁻ и ER⁻/PR⁻ не отличались от здоровых женщин по удельному весу отдельных генотипов и аллелей гена *ESR2* ($p = 0,335$ и $p = 0,162$ соответственно).

На втором этапе исследовали предполагаемые ассоциации IgG₂-E2 и генетических полиморфизмов *ESR1* и *ESR2* с конверсией ER⁺/PR⁺ опухолей в ER⁻/PR⁻ при прогрессии РМЖ. Учитывая относительно небольшое количество женщин III+IV стадией заболевания (18,1%), объединили пациенток II и III+IV стадиями РМЖ в отдельную подгруппу для сопоставления с больными начальной стадией прогрессии опухоли.

Анализ особенностей статуса стероидных рецепторов опухоли у больных РМЖ I и II-IV стадии без учета полиморфизма генов *ESR1-2* и пер-

ТАБЛИЦА 1. ЧИСЛО (n) И УДЕЛЬНЫЙ ВЕС (%) ЗДОРОВЫХ ЖЕНЩИН И БОЛЬНЫХ РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ (РМЖ) I СТАДИИ С НИЗКИМИ (\leq) И ВЫСОКИМИ ($>$) УРОВНЯМИ СЫВОРОТОЧНЫХ АНТИИДИОТИПИЧЕСКИХ АНТИТЕЛ, СПЕЦИФИЧНЫХ К ЭСТРАДИОЛУ (IgG₂-E2), С УЧЕТОМ СТАТУСА СТЕРЕОИДНЫХ РЕЦЕПТОРОВ В ОПУХОЛИ

TABLE 1. CASES (n) AND FREQUENCY (%) OF HEALTHY WOMEN AND BREAST CANCER PATIENTS (BCP) I STAGE WITH LOW (\leq) AND HIGH ($>$) LEVELS OF ANTIIDIOTYPIC ANTIBODIES, SPECIFIC TO ESTRADIOL (IgG₂-E2), ACCORDING TO TUMOR STEROID RECEPTORS STATUS

Антитела Antibodies	Здоровые женщины Healthy women (n = 181)	Больные РМЖ I стадии BCP I stage (n = 397)					
		ER ⁺ /PR ⁺ (n = 274)		ER ⁺ /PR ⁻ (n = 69)		ER ⁻ /PR ⁻ (n = 54)	
		n/%	n/%	p-value OR (95% CI)	n/%	p-value OR (95% CI)	n/%
IgG ₂ -E2 \leq 3,5	105/58,0	109/39,8	0,0002 0,5 (0,3-0,7)	38/55,1	0,782 0,5 (0,5-1,6)	29/53,7	0,686 0,8 (0,5-1,5)
IgG ₂ -E2 $>$ 3,5	76/42,0	165/60,2	0,0002 2,1 (1,4-3,1)	31/44,9	0,782 1,1 (0,6-2,0)	25/46,3	0,686 1,2 (0,6-2,2)

ТАБЛИЦА 2. ЧИСЛО (n) И УДЕЛЬНЫЙ ВЕС (%) ПОЛИМОРФНЫХ ЛОКУСОВ ГЕНОВ ESR1 (rs2234693) И ESR2 (rs4986938) У ЗДОРОВЫХ ЖЕНЩИН И БОЛЬНЫХ РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ (РМЖ) I СТАДИИ С УЧЕТОМ СТАТУСА СТЕРЕОИДНЫХ РЕЦЕПТОРОВ В ОПУХОЛИ

TABLE 2. CASES (n) AND FREQUENCY (%) OF GENES ESR1 (rs2234693) AND ESR2 (rs4986938) POLYMORPHIC LOCI IN HEALTHY WOMEN AND BREAST CANCER PATIENTS (BCP) I STAGE ACCORDING TO TUMOR STEROID RECEPTORS STATUS

Полиморфный локус ESR Polymorphic locus ESR	Здоровые женщины Healthy women (n = 370)	Больные РМЖ I стадии BCP I stage (n = 470)					
		ER ⁺ /PR ⁺ (n = 325)		ER ⁺ /PR ⁻ (n = 73)		ER ⁻ /PR ⁻ (n = 72)	
		n/%	n/%	p-value OR (95% CI)	n/%	p-value OR (95% CI)	n/%
ESR1 rs2234693							
TT	102/27,6	91/28,0		23/31,5		22/30,6	
TC	183/49,5	160/49,2		32/43,8		31/43,1	
CC	85/22,9	74/22,8	0,948	18/24,7	0,874	19/26,4	0,965
T	387/52,3	342/52,6	1,0 (0,8-1,3)	78/53,4	1,0 (0,7-1,5)	75/52,1	1,0 (0,7-1,4)
C	353/47,7	308/47,4	1,0 (0,8-1,2)	68/46,6	1,0 (0,7-1,4)	69/47,9	1,0 (0,7-1,4)
HWE	0,92	0,82		0,35		0,24	
ESR2 rs4986938							
GG	195/52,7	143/44,0		33/45,2		32/44,4	
GA	144/38,9	136/41,8		33/45,2		31/43,1	
AA	31/8,4	46/14,2	0,005	7/9,6	0,335	9/12,5	0,162
G	534/72,2	422/64,9	0,7 (0,6-0,9)	99/67,8	0,8 (0,6-1,2)	95/66,0	0,7 (0,5-1,1)
A	206/27,8	228/35,1	1,4 (1,1-1,7)	47/32,2	1,2 (0,8-1,8)	49/34,0	1,3 (0,9-2,0)
HWE	0,52	0,14		1,0		0,79	

сональных уровней IgG₂-E2 показал следующее. Удельный вес ER⁺/PR⁺ опухолей у больных РМЖ II-IV стадий был меньше (58,5%), чем у больных I стадии заболевания (69,1%). Соответственно, удельный вес ER⁻/PR⁻ опухолей у больных РМЖ

II-IV стадий был выше (24,5% против 15,3%). Частота ER⁺/PR⁻ опухолей в данном сравнении была примерно одинаковой (17,0% и 15,5% соответственно). Обнаруженные различия были статистически достоверными (p < 0,0001).

ТАБЛИЦА 3. ЧИСЛО (n) И УДЕЛЬНЫЙ ВЕС (%) БОЛЬНЫХ РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ (РМЖ) I СТАДИИ И II-IV СТАДИЙ С НИЗКИМИ (\leq) И ВЫСОКИМИ ($>$) УРОВНЯМИ СЫВОРОТОЧНЫХ АНТИИДИОТИПИЧЕСКИХ АНТИТЕЛ, СПЕЦИФИЧНЫХ К ЭСТРАДИОЛУ (IgG₂-E2), С УЧЕТОМ СТАТУСА СТЕРОИДНЫХ РЕЦЕПТОРОВ В ОПУХОЛИ

TABLE 3. CASES (n) AND FREQUENCY (%) OF BREAST CANCER PATIENTS (BCP) I STAGE AND II-IV STAGES WITH LOW (\leq) AND HIGH ($>$) LEVELS OF ANTIIDIOTYPIC ANTIBODIES, SPECIFIC TO ESTRADIOL (IgG₂-E2), ACCORDING TO TUMOR STEROID RECEPTORS STATUS

Антитела Antibodies	Больные РМЖ I стадии BCP I stage (n = 397)			Больные РМЖ II-IV стадии BCP II-IV stages (n = 556)			χ^2 , (p) df = 2
	ER ⁺ /PR ⁺	ER ⁺ /PR ⁻	ER ⁻ /PR ⁻	ER ⁺ /PR ⁺	ER ⁺ /PR ⁻	ER ⁻ /PR ⁻	
	n/%	n/%	n/%	n/%	n/%	n/%	
IgG ₂ -E2 \leq 3,5	109/61,9	38/21,6	29/16,5	141/56,0	44/17,5	67/26,6	6,3 (0,040)
IgG ₂ -E2 $>$ 3,5	165/74,7	31/14,0	25/11,3	175/57,6	53/17,4	76/25,0	19,2 (< 0,0001)
χ^2 , (p) df = 2	7,4 (0,025)			0,19 (0,906)			

Результаты анализа стероидных рецепторов опухоли у больных РМЖ с различными уровнями IgG₂-E2 представлены в таблице 3. У больных с низкими уровнями IgG₂-E2 \leq 3,5 различия по удельному весу ER⁺/PR⁺, ER⁺/PR⁻ и ER⁻/PR⁻ опухолей между I и II-IV стадиями были статистически мало значимыми (p = 0,040). Напротив, при высоких уровнях IgG₂-E2 $>$ 3,5 ER⁺/PR⁺ опухоли при I стадии встречались чаще, чем при II-IV стадиях (74,7% против 57,6%), а ER⁻/PR⁻, соответственно, реже (11,3% против 25,0%, p < 0,0001). Кроме того, у больных РМЖ I стадии с высоким уровнем IgG₂-E2 $>$ 3,5 ER⁺/PR⁺ опухоли встречались чаще (74,7%), а ER⁺/PR⁻ и ER⁻/PR⁻ опухоли реже (14,0% и 11,3%), чем у больных с низкими уровнями IgG₂-E2 \leq 3,5 (61,0%, 21,6% и 16,5% соответственно, p = 0,025).

Далее исследовали наличие стероидных рецепторов в ткани опухоли с учетом полиморфизма генов *ESR1-2* (табл. 4). Выяснилось, что низкий удельный вес ER⁺/PR⁺ опухолей и высокий удельный вес ER⁻/PR⁻ опухолей у больных РМЖ II-IV стадий по сравнению с больными РМЖ I стадии имел место только при генотипах TT и TC гена *ESR1* (p = 0,022 и p = 0,006 соответственно). При генотипе CC *ESR1* разница между больными I и II-IV стадий заболевания по статусу стероидных рецепторов отсутствовала (p = 0,481). Наиболее статистически значимые различия между больными I и II-IV стадиями РМЖ по статусу стероидных рецепторов оказались у носителей аллеля -397T гена *ESR1* (p < 0,0001). У носителей аллеля -397C различия были менее достоверными (p = 0,003).

Высокий удельный вес ER⁺/PR⁺ опухолей и низкий ER⁻/PR⁻ у больных РМЖ I стадии по сравнению с II-IV имел место только у носителей генотипа GG *ESR2* (p = 0,004). При генотипах GA и AA статистически значимых различий

между больными I и II-IV стадий не обнаружено (p = 0,086 и p = 0,436). У носителей аллеля +1730G *ESR2* особенности статуса стероидных рецепторов в опухоли при РМЖ II-IV стадий по сравнению с I стадией оказались более достоверными (p < 0,0001), чем у носителей аллеля +1730A (p = 0,022).

Следует отметить, что указанные результаты получены только при сравнении больных РМЖ I и II-IV стадий. Если рассматривать каждую из этих групп больных РМЖ по-отдельности, то распределение ER⁺/PR⁺, ER⁺/PR⁻ и ER⁻/PR⁻ опухолей не зависело от принадлежности больных к тому или иному генотипу *ESR1* и *ESR2* (p > 0,05).

На заключительном этапе исследовали ассоциации IgG₂-E2 с отдельными генотипами и аллелями *ESR1* и *ESR2* у здоровых женщин и больных РМЖ. Высокие и низкие уровни IgG₂-E2 обнаруживали с одинаковой частотой у носителей каждого отдельного генотипа и аллеля *ESR1* и *ESR2* в каждой отдельной группе женщин.

Предполагается, что биологические эффекты связывания E2 с ER, кодируемыми разными полиморфизмами генов *ESR1-2*, могут быть различными. Этим объясняется поиск ассоциаций полиморфизма генов *ESR* с РМЖ и другими стероид-зависимыми опухолями. Результаты исследований в этом направлении противоречивы. В одних работах описаны ассоциации вариантов генов *ESR1* и *ESR2* с РМЖ [4, 6, 9, 16], другим авторам не удалось обнаружить искомым взаимосвязей [5, 11]. В этих исследованиях не учитывался статус стероидных рецепторов в опухоли в начале заболевания и его изменения в процессе роста, хотя было известно, что терапевтическое действие селективных модуляторов ER, в том числе превентивное, наиболее эффективно в отношении именно ER⁺ опухолей [10, 13, 15].

ТАБЛИЦА 4. ЧИСЛО (n) И УДЕЛЬНЫЙ ВЕС (%) ПОЛИМОРФНЫХ ЛОКУСОВ ГЕНОВ *ESR1* (rs2234693) И *ESR2* (rs4986938) У БОЛЬНЫХ РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ (РМЖ) I СТАДИИ И II-IV СТАДИЙ С УЧЕТОМ СТАТУСА СТЕРОИДНЫХ РЕЦЕПТОРОВ В ОПУХОЛИ

TABLE 4. CASES (n) AND FREQUENCY (%) OF GENES *ESR1* (rs2234693) AND *ESR2* (rs4986938) POLYMORPHIC LOCI IN BREAST CANCER PATIENTS (BCP) I STAGE AND II-IV STAGES ACCORDING TO TUMOR STEROID RECEPTORS STATUS

Полиморфный локус <i>ESR</i> Polymorphic locus <i>ESR</i>	Больные РМЖ I стадии BCP I stage (n = 470)			Больные РМЖ II-IV стадии BCP II-IV stages (n = 699)			χ^2 , (p) df = 2
	ER ⁺ /PR ⁺ (n = 325)	ER ⁺ /PR ⁻ (n = 73)	ER ⁻ /PR ⁻ (n = 72)	ER ⁺ /PR ⁺ (n = 409)	ER ⁺ /PR ⁻ (n = 119)	ER ⁻ /PR ⁻ (n = 171)	
	n/%	n/%	n/%	n/%	n/%	n/%	
<i>ESR1</i> rs2234693							
TT	91/66,9	23/16,9	22/16,2	101/56,4	25/14,0	53/29,6	7,7 (0,022)
TC	160/71,7	32/14,3	31/13,9	196/58,9	60/18,0	77/23,1	10,4 (0,006)
CC	74/66,7	18/16,2	19/17,1	112/59,9	34/18,2	41/21,9	1,5 (0,481)
χ^2 , (p) df = 4	1,4 (0,843)			4,2 (0,380)			
T	342/69,1	78/15,8	75/15,2	398/57,6	110/15,9	183/26,5	23,1 (< 0,0001)
C	308/69,2	68/15,3	69/15,5	420/59,4	128/18,1	159/22,5	12,2 (0,003)
χ^2 , (p) df = 2	0,05 (0,974)			3,5 (0,178)			
<i>ESR2</i> rs4986938							
GG	143/68,8	33/15,9	32/15,4	171/55,0	58/18,6	82/26,4	11,3 (0,004)
GA	136/68,0	33/16,5	31/15,5	191/60,6	50/15,9	74/23,5	4,9 (0,086)
AA	46/74,2	7/11,3	9/14,5	47/64,4	11/15,1	15/20,5	1,7 (0,436)
χ^2 , (p) df = 4	1,2 (0,886)			3,3 (0,515)			
G	422/68,5	99/16,1	95/15,4	533/56,9	166/17,7	238/25,4	26,0 (< 0,0001)
A	228/70,4	47/14,5	49/15,1	285/61,8	72/15,6	104/22,6	7,7 (0,022)
χ^2 , (p) df = 2	0,5 (0,797)			3,1 (0,212)			

В настоящей работе проведено сравнение распределения аллелей и генотипов генов *ESR1* и *ESR2* у здоровых женщин и больных РМЖ I стадии с учетом статуса стероидных рецепторов в опухоли. Не обнаружили значимой разницы по удельному весу отдельных аллелей и генотипов гена *ESR1* rs2234693 между сравниваемыми группами. В то же время генотип GG гена *ESR2* rs4986938 у больных РМЖ I стадии встречался реже, а генотип AA – чаще, чем у здоровых женщин. Аллель +1730A был ассоциирован с риском РМЖ (OR = 1,4) в аддитивной модели наследования. Эти особенности были характерными только для ER⁺/PR⁺ опухолей, но не для ER⁺/PR⁻ и ER⁻/PR⁻ опухолей. Полученные результаты подтверждают значимость анализа полиморфизма гена *ESR2* rs4986938 как маркера риска РМЖ.

Заключение

На основании результатов наших предыдущих исследований [1] провели анализ антиидиотипических антител IgG₂-E2 в сыворотке крови женщин, указанных выше сравниваемых групп. Оказалось, что низкие уровни IgG₂-E2 у больных РМЖ I стадии встречались реже, а высокие уровни – чаще, чем у здоровых женщин. Эти разли-

чия проявились только в случае с ER⁺/PR⁺ опухолями, но не ER⁺/PR⁻ и ER⁻/PR⁻. Таким образом, избыточное образование IgG₂-E2 можно считать маркером высокого риска возникновения ER⁺/PR⁺ РМЖ. Вероятно, IgG₂-E2 действуют как агонисты E2, связываясь с мембранными ER, и стимулируют пролиферацию иницированных ER⁺/PR⁺ клеток молочной железы, способствуя их трансформации в ER⁺/PR⁺ злокачественные клетки, то есть выступают в роли промоторов канцерогенеза.

Исследование предполагаемых ассоциаций полиморфизма генов *ESR* и IgG₂-E2 с изменениями статуса стероидных рецепторов в процессе роста опухоли выполняли путем сравнения больных РМЖ I и II-IV стадий. Строго говоря, такое сравнение отражает процесс конверсии лишь в первом приближении. В идеале было бы корректнее проследить изменение статуса стероидных рецепторов в процессе роста РМЖ одной и той же пациентки, в том числе с учетом схемы лечения. Поэтому полученные результаты можно рассматривать как предварительные, доказывающие перспективность данного направления исследования.

Снижение удельного веса ER⁺/PR⁺ опухолей и соответствующее повышение ER⁺/PR⁻ и ER⁻/PR⁻ опухолей имело место только у носителей генотипов TC *ESR1* и GG *ESR2*. У носителей других генотипов *ESR1* rs2234693 и *ESR2* rs4986938 изменения статуса стероидных рецепторов при росте РМЖ были статистически недостоверными. Таким образом, получены первые подтверждения предполагаемых взаимосвязей конверсии ER и PR с полиморфизмом генов *ESR*.

В аналогичном сравнении снижение частоты ER⁺/PR⁺ опухолей и соответствующее повышение частоты ER⁺/PR⁻ и особенно ER⁻/PR⁻ опухолей при росте РМЖ были выявлены только у больных с высокими уровнями IgG₂-E2, но не у больных с низкими уровнями IgG₂-E2. Тем самым подтвердили ранее полученные данные об участии антиидиотипических антител к ER в прогрессии РМЖ.

Поскольку выяснилось, что возникновение ER⁺/PR⁺ опухолей и конверсии ER⁺/PR⁺ опухолей в ER⁺/PR⁻ и ER⁻/PR⁻ в процессе роста РМЖ взаимосвязаны с полиморфизмом генов *ESR1-2* и с образованием IgG₂-E2, сочли целесообразным исследовать особенности IgG₂-E2 у носителей отдельных генотипов генов *ESR1-2*. Оказалось, что удельных вес низких и высоких уровней IgG₂-E2 одинаков при любом из генотипов *ESR1* rs2234693 и *ESR2* rs4986938 как у здоровых женщин, так и у больных РМЖ. Следовательно, образование IgG₂-E2 не зависело от исследованных полиморфизмов α и β *ESR*.

Полученные результаты могут оказаться полезными в изучении механизмов канцерогенеза молочной железы, поскольку антиидиотипические антитела к сывороточным гормонам, очевидно, принимают участие в регуляции гормон-рецепторных взаимодействий. Дальнейшие исследования гаплотипов генов *ESR1* и *ESR2* в комплексе с анализом IgG₂-E2 позволят определить их наиболее информативные сочетания в плане доклинической диагностики РМЖ и прогноза конверсии стероидных рецепторов при его прогрессии. Перспективным представляется и аналогичный алгоритм изучения генетических полиморфизмов рецепторов прогестерона в комбинации с анализом антител и анти-антител, специфичных к прогестерону.

Эти методы могут найти применение в определении индивидуальных рисков возникновения не только РМЖ, но и других стероид-зависимых злокачественных новообразований с проведением их целенаправленной гормоно-профилактики, а также в определении прогноза конверсии стероидных рецепторов опухолей и коррекции их гормонотерапии.

Благодарности

Авторы благодарят академика Л.И. Иванову за поддержку выбранного направления исследований, а также сотрудников лаборатории иммунохимии Института экологии человека ФИЦ УУХ СО РАН Аносову Т.П., Аносова М.П., Гурова Е.А., Чернокульскую К.С. за техническую поддержку настоящей работы.

Список литературы / References

1. Глушков А.Н., Поленок Е.Г., Костянко М.В., Антонов А.В., Вержбицкая Н.Е., Вафин И.А., Рагожина С.Е. Ассоциации сывороточных антител к эстрадиолу с рецепторами эстрогенов в опухоли у больных раком молочной железы // Российский иммунологический журнал, 2016. Т. 10, № 2. С. 166-173. [Glushkov A.N., Polenok E.G., Kostyanko M.V., Antonov A.V., Verzhbitskaya N.E., Vafin I.A., Ragozhina S.E. Associations of the serum antibodies to estradiol and the tumor estrogen receptors at the breast cancer patients. *Rossiyskiy immunologicheskiy zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2016, Vol. 10, no. 2, pp. 166-173. (In Russ.)]
2. Злокачественные новообразования в России в 2020 году (заболеваемость и смертность) / Под ред. Каприна А.Д., Старинского В.В., Шахзадовой А.О. М.: МНИОИ им. П.А. Герцена – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, 2021. 252 с. [Malignant neoplasms in Russia in 2020 (morbidity and mortality). Ed. Kaprin A.D., Starinsky V.V., Shakhzadova A.O.]. Moscow: P. Herzen Moscow State Medical Research Institute, Branch of the Federal State Budgetary Institution "NMIC of Radiology" of the Ministry of Health of Russia, 2021. 252 p.
3. Шашова Е.Е., Кондакова И.В., Слонимская Е.М., Глущенко С.А. Сравнительное изучение содержания рецепторов эстрогенов и прогестерона в неизменной, опухолевой и метастатической тканях при раке молочной железы // Сибирский онкологический журнал, 2008. Т. 4, № 28. С. 42-45. [Shashova E.E., Kondakova I.V., Slonimskaya E.M., Glushchenko S.A. Comparative study of the levels of estrogen and progesterone receptors in normal, tumor and metastatic tissues of breast cancer patients. *Sibirskiy onkologicheskiy zhurnal = Siberian Journal of Oncology*, 2008, Vol. 4, no. 28, pp. 42-45. (In Russ.)]
4. Borgquist S., Hjertberg M., Henningson M., Ingvar C., Rose C., Jernström H. Given breast cancer, is fat better than thin? Impact of the estrogen receptor beta gene polymorphisms. *Breast Cancer Res. Treat.*, 2013, Vol. 137, no. 3, pp. 849-862.

5. Carrillo-Moreno D.I., Eduardo Figuera L., Zuniga González G.M., Puebla Perez A.M., Jesus Moran Mendoza A., Gallegos Arreola M.P. Association of rs2234693 and rs9340799 polymorphisms of ESR1 gene in breast cancer of Mexican population. *J. BUON*, 2019, Vol. 24, no. 5, pp. 1927-1933.
6. Chauhan P., Yadav R., Kaushal V., Kadian L. Evaluation of genetic polymorphism in estrogen receptor α gene as breast cancer risk. *Biomed. Res.*, 2019, Vol. 30, no. 1, pp. 72-77.
7. Greiner M., Pfeiffer D., Smith R.D. Principles and practical application of the receiver operating characteristic analysis for diagnostic test. *Prev. Vet. Med.*, 2000, Vol. 45, pp. 23-41.
8. Howlader N., Altekruse S.F., Li C.I., Chen V.W., Clarke C.A., Ries L.A., Cronin K.A. US incidence of breast cancer subtypes defined by joint hormone receptor and HER2 status. *J. Natl Cancer Inst.*, 2014, Vol. 106, no. 5, dju055. doi: 10.1093/jnci/dju055.
9. Hu X., Jiang L., Tang C., Ju Y., Jiu L., Wei Y., Guo L., Zhao Y. Association of three single nucleotide polymorphisms of ESR1 with breast cancer susceptibility: a meta-analysis. *J. Biomed. Res.*, 2017, Vol. 31, no. 3, pp. 213-225.
10. LaCroix A.Z., Powles T., Osborne C.K., Wolter K., Thompson J.R., Thompson D.D., Allred D.C., Armstrong R., Cummings S.R., Eastell R., Ensrud K.E., Goss P., Lee A., Neven P., Reid D.M., Curto M., Vukicevic S. Breast cancer incidence in the randomized PEARL trial of lasofoxifene in postmenopausal osteoporotic women. *J. Natl Cancer Inst.*, 2010, Vol. 102, no. 22, pp. 1706-1715.
11. Li Z., Yang X., Zhang R., Zhang D., Li B., Zhang D., Li Q., Xiong Y. No Association between estrogen receptor- β rs4986938 and cancer risk: a systematic review and meta-analysis. *Iran. J. Public Health*, 2019, Vol. 48, no. 5, pp. 784-795.
12. Maselli A., Capoccia S., Pugliese P., Raggi C., Cirulli F., Fabi A., Malorni W., Pierdominici M., Ortona E. Autoantibodies specific to estrogen receptor alpha act as estrogen agonists and their level correlate with breast cancer cell proliferation. *Oncoimmunology*, 2016, Vol. 5, no. 2, e1074375-2. doi: 10.1080/2162402X.2015.1074375.
13. Sestak I. Preventative therapies for healthy women at high risk of breast cancer. *Cancer Manag. Res.*, 2014, Vol. 6, pp. 423-430.
14. Siegel R.L., Miller K.D., Fuchs H., Jemal A. Cancer Statistics, 2022. *CA Cancer J. Clin.*, 2022, Vol. 72, no. 1, pp. 7-33.
15. Visvanathan K., Hurley P., Bantug E., Brown P., Col N.F., Cuzick J., Davidson N.E., Decensi A., Fabian C., Ford L., Garber J., Katapodi M., Kramer B., Morrow M., Parker B., Runowicz C., Vogel V.G. III, Wade J.L., Lippman S.M. Use of pharmacologic interventions for breast cancer risk reduction: American Society of Clinical Oncology clinical practice guideline. *J. Clin. Oncol.*, 2013, Vol. 31, no. 23, pp. 2942-2962.
16. Yu K.D., Rao N.Y., Chen A.X., Fan L., Yang C., Shao Z.M. A systematic review of the relationship between polymorphic sites in the estrogen receptor-beta (ESR2) gene and breast cancer risk. *Breast Cancer Res. Treat.*, 2011, Vol. 126, no. 1, pp. 37-45.

Авторы:

Глушков А.Н. – д.м.н., профессор, главный научный сотрудник лаборатории иммуногенетики Института экологии человека ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр угля и углехимии Сибирского отделения Российской академии наук», г. Кемерово, Россия

Поленок Е.Г. – к.фарм.н., ведущий научный сотрудник лаборатории иммунохимии Института экологии человека ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр угля и углехимии Сибирского отделения Российской академии наук», г. Кемерово, Россия

Гордеева Л.А. – к.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории иммуногенетики Института экологии человека ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр угля и углехимии Сибирского отделения Российской академии наук», г. Кемерово, Россия

Мун С.А. – к.м.н., доцент, старший научный сотрудник лаборатории иммуногенетики Института экологии человека ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр угля и углехимии Сибирского отделения Российской академии наук», г. Кемерово, Россия

Authors:

Glushkov A.N., PhD, MD (Medicine), Professor, Chief Research Associate, Immunogenetics Laboratory, Institute of Human Ecology, Federal Research Center of Coal and Coal Chemistry, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Kemerovo, Russian Federation

Polenok E.G., PhD (Pharmacy), Leading Research Associate, Immunochemistry Laboratory of Institute of Human Ecology, Federal Research Center of Coal and Coal Chemistry, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Kemerovo, Russian Federation

Gordeeva L.A., PhD (Biology), Leading Research Associate, Immunogenetics Laboratory of Institute of Human Ecology, Federal Research Center of Coal and Coal Chemistry, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Kemerovo, Russian Federation

Mun S.A., PhD (Medicine), Associate Professor, Senior Research Associate, Immunogenetics Laboratory of Institute of Human Ecology, Federal Research Center of Coal and Coal Chemistry, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Kemerovo, Russian Federation

Антонов А.В. — заведующий отделением опухолей молочной железы ГБУЗ «Кузбасский клинический онкологический диспансер имени М.С. Раппопорта», г. Кемерово, Россия

Antonov A.V., Head, Breast Cancer Department, Kuzbass Clinical Oncology Dispensary, Kemerovo, Russian Federation

Байрамов П.В. — заведующий патологоанатомическим отделением ГБУЗ «Кузбасский клинический онкологический диспансер имени М.С. Раппопорта», г. Кемерово, Россия

Bayramov P.V., Main Physician, Pathoanatomical Department, Kuzbass Clinical Oncology Dispensary, Kemerovo, Russian Federation

Вержбицкая Н.Е. — к.м.н., врач-патологоанатом ГБУЗ «Кузбасский клинический онкологический диспансер имени М.С. Раппопорта», г. Кемерово, Россия

Verzhbitskaya N.E., PhD (Medicine), Pathologist, Pathoanatomical Department, Kuzbass Clinical Oncology Dispensary, Kemerovo, Russian Federation

Колпинский Г.И. — д.м.н., профессор кафедры лучевой диагностики, лучевой терапии и онкологии ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный медицинский университет»; главный врач ГАУЗ «Клинический консультативно-диагностический центр имени И.А. Колпинского», г. Кемерово, Россия

Kolpinskiy G.I., PhD, MD (Medicine), Professor, Department of Radiology, Radiotherapy and Oncology, Kemerovo State Medical University; Main Physician, Kemerovo Clinical Diagnostic Center, Kemerovo, Russian Federation

Вафин И.А. — главный врач ГКУЗ «Кузбасский центр крови», г. Кемерово, Россия

Vafin I.A., Main Physician, Kuzbass Center of Blood, Kemerovo, Russian Federation

Поступила 26.10.2022

Отправлена на доработку 01.11.2022

Принята к печати 16.02.2023

Received 26.10.2022

Revision received 01.11.2022

Accepted 16.02.2023

ДИССОЦИАЦИЯ ИНТЕРЛЕЙКИНОВ КРОВИ У ПАЦИЕНТОВ С ДИАБЕТИЧЕСКОЙ РЕТИНОПАТИЕЙ С УСКОРЕННЫМ СТАРЕНИЕМ

Агарков Н.М.^{1,2}, Лев И.В.³, Воронина Е.А.⁴

¹ ФГБОУ ВО «Юго-Западный государственный университет», г. Курск, Россия

² ФГАОУ ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет», г. Белгород, Россия

³ Тамбовский филиал МНТК «Микрохирургия глаза имени академика С.Н. Федорова» Министерства здравоохранения РФ, г. Тамбов, Россия

⁴ АНО «Научно-исследовательский медицинский центр «Геронтология», Москва, Россия

Резюме. Диабетическая ретинопатия представляет распространенное осложнение сахарного диабета и особенно в пожилом возрасте, что обусловлено увеличением данной группы в популяции многих стран. Однако участие иммунной системы у пациентов с диабетической ретинопатией и в процессе старения не получило должного отражения в научных публикациях. Цель исследования — изучение содержания системных интерлейкинов у пациентов с диабетической ретинопатией с ускоренным и физиологическим старением. В клинических условиях обследовано 240 пациентов в возрасте 60-74 лет с диабетической ретинопатией и 115 пациентов такого же возраста без диабетической ретинопатии. Диагностика диабетической ретинопатии осуществлялась в соответствии с Клиническими рекомендациями Общероссийской ассоциации врачей-офтальмологов «Диагностика и лечение диабетической ретинопатии и диабетического макулярного отека». Биологический возраст обследованных определялся автоматически сфигмоманометром VaSera VS-1500. Содержание интерлейкинов в плазме крови определялось иммуноферментным анализом с применением набора «Протеиновый контур». Установлено, что хронологический (календарный) возраст пациентов с диабетической ретинопатией и без диабетической ретинопатии не имел статистически значимых различий и составлял соответственно $70,9 \pm 0,7$ года и $70,2 \pm 0,8$ года ($p > 0,05$). Однако биологический возраст в данных группах существенно ($p < 0,001$) различался, составив $75,7 \pm 1,1$ и $72,3 \pm 1,0$ года соответственно, что свидетельствует об ускоренном старении пациентов, страдающих диабетической ретинопатией. Изучение концентрации интерлейкинов крови у пациентов с диабетической ретинопатией с ускоренным старением по сравнению с пациентами с диабетической ретинопатией с физиологическим старением выявило статистически значимые различия по большинству проанализированных интерлейкинов. Особенно выраженное увеличение в плазме крови пациентов с диабетической ретинопатией с ускоренным старением присуще IL-6, концентрация которого составила $25,7 \pm 1,8$ пг/мл против $4,2 \pm 0,5$ пг/мл у пациентов с диабетической ретинопатией с физиологическим старением ($p < 0,001$). Значительное повышение интерлейкинов на системном уровне среди пациентов с диабе-

Адрес для переписки:

Агарков Николай Михайлович
ФГБОУ ВО «Юго-Западный государственный
университет»
305040, Россия, г. Курск, ул. 50 лет Октября, 94.
Тел.: 8 (910) 740-96-13.
E-mail: vitalaxen@mail.ru

Address for correspondence:

Nikolai M. Agarkov
South-West State University
94 50 let Oktyabrya St
Kursk
300540 Russian Federation
Phone: +7 (910) 740-96-13.
E-mail: vitalaxen@mail.ru

Образец цитирования:

Н.М. Агарков, И.В. Лев, Е.А. Воронина «Диссоциация интерлейкинов крови у пациентов с диабетической ретинопатией с ускоренным старением» // Медицинская иммунология, 2024. Т. 26, № 1. С. 169-174. doi: 10.15789/1563-0625-DOB-2526

© Агарков Н.М. и соавт., 2024
Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

N.M. Agarkov, I.V. Lev, E.A. Voronina "Dissociation of blood interleukin spectrum in the patients with accelerated aging and diabetic retinopathy", Medical Immunology (Russia)/ Meditsinskaya Immunologiya, 2024, Vol. 26, no. 1, pp. 169-174. doi: 10.15789/1563-0625-DOB-2526

© Agarkov N.M. et al., 2024
The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License
DOI: 10.15789/1563-0625-DOB-2526

тической ретинопатией с ускоренным старением установлено для IL-13 и IL-17. Содержание IL-13 у пациентов с диабетической ретинопатией с ускоренным старением достижимо $2,2 \pm 0,3$ пг/мл против $0,7 \pm 0,2$ пг/мл у пациентов с диабетической ретинопатией с физиологическим старением ($p < 0,001$), IL-17 – $19,8 \pm 0,6$ пг/мл против $8,4 \pm 0,9$ пг/мл соответственно. Среди пациентов с диабетической ретинопатией с ускоренным старением повысилась достоверно также концентрация IL-1 β , IL-3. Вместе с тем в плазме крови пациентов с диабетической ретинопатией с ускоренным старением по сравнению с пациентами с диабетической ретинопатией с физиологическим старением произошло статистически значимое снижение противовоспалительных интерлейкинов и особенно IL-10 до $7,4 \pm 0,6$ пг/мл против $19,2 \pm 0,7$ пг/мл ($p < 0,001$). Следовательно, IL-6, IL-8, IL-13, IL-17, IL-4 и IL-10 следует использовать в качестве иммунологических предикторов ускоренного старения у пациентов с диабетической ретинопатией.

Ключевые слова: интерлейкины крови, ускоренное старение, диабетическая ретинопатия

DISSOCIATION OF BLOOD INTERLEUKIN SPECTRUM IN THE PATIENTS WITH ACCELERATED AGING AND DIABETIC RETINOPATHY

Agarkov N.M.^{a, b}, Lev I.V.^c, Voronina E.A.^d

^a South-West State University, Kursk, Russian Federation

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

^c S. Fedorov Medical Research Center of Eye Microsurgery, Tambov Branch, Tambov, Russian Federation

^d Research Medical Center "Gerontology", Moscow, Russian Federation

Abstract. Diabetic retinopathy is a common complication of diabetes mellitus, especially, in elderly persons, due to growth of this population in many countries. However, involvement of immune system in patients with diabetic retinopathy and into the aging process is not sufficiently covered in the research works. The aim of the present study was to evaluate the contents of systemic interleukins in the patients with diabetic retinopathy with accelerated *versus* physiological aging.

We observed 240 patients aged 60-74 years with diabetic retinopathy and 115 age-matched patients without diabetic retinopathy under clinical conditions. The diagnosis of diabetic retinopathy was assessed in accordance with Clinical Guidelines of the All-Russian Association of Ophthalmologists "Diagnostics and Treatment of Diabetic Retinopathy and Diabetic Macular Edema". The biological age of the subjects was determined instrumentally, by means of VaSera VS-1500 sphygmomanometer. The contents of interleukins in blood plasma was determined by ELISA technique using the "Protein contour" kit.

It was established that the chronological (calendar) age of patients with diabetic retinopathy and without diabetic retinopathy was not significantly different (70.9 ± 0.7 and 70.2 ± 0.8 years old, respectively; $p > 0.05$). However, the biological age in these groups differed significantly (75.7 ± 1.1 and 72.3 ± 1.0 years old, respectively; $p < 0.001$), thus suggesting accelerated aging of patients suffering from diabetic retinopathy. Plasma concentrations of interleukins in patients with diabetic retinopathy with accelerated aging, when compared with physiologically aged patients with diabetic retinopathy revealed statistically significant differences for the most analyzed interleukins. A particularly pronounced increase of the blood plasma interleukins in patients with diabetic retinopathy and accelerated aging was revealed for IL-6 (25.7 ± 1.8 pg/mL *versus* 4.2 ± 0.5 pg/mL in physiologically aged patients with diabetic retinopathy ($p < 0.001$)). A significant increase of interleukin levels among patients with accelerated aging and diabetic retinopathy was found for IL-13 and IL-17. IL-13 contents in the patients with diabetic retinopathy and accelerated aging reached 2.2 ± 0.3 pg/mL *versus* 0.7 ± 0.2 pg/mL in physiologically aging patients with diabetic retinopathy ($p < 0.001$). Respectively, the IL-17 levels were 19.8 ± 0.6 pg/mL and 8.4 ± 0.9 pg/mL. The mean concentration of IL-1 β , IL-3 among patients with diabetic retinopathy and accelerated aging was also significantly increased. At the same time, in the blood plasma of the prematurely aged patients with diabetic retinopathy, we have revealed a statistically significant decrease of anti-inflammatory interleukins and, especially, IL-10 to 7.4 ± 0.6 pg/mL *versus* 19.2 ± 0.7 pg/mL ($p < 0.001$). Therefore, IL-6, IL-8, IL-13, IL-17, IL-4, and IL-10 levels may be used as immunological predictors of accelerated aging in the patients with diabetic retinopathy.

Keywords: interleukins, blood, diabetes, retinopathy, aging

Введение

Распространенность диабетической ретинопатии увеличивается с каждым годом по мере роста заболеваемости населения сахарным диабетом [4]. Так, в 2020 году примерно 4,4 миллионов человек во всем мире имели нарушение зрения вдаль, а полмиллиона — нарушения зрения вблизи, обусловленные диабетической ретинопатией [4]. Частота диабетической ретинопатии значительно увеличивается в странах, в которых высока доля пожилого и старческого населения, в том числе и в Российской Федерации [2, 3, 5]. Вместе особенности старения пациентов с диабетической ретинопатией и участие иммунной системы в старении таких пациентов остается недостаточно изученным.

Исследования, касающиеся изменения системных интерлейкинов у пациентов с диабетической ретинопатией как с физиологическим, так и ускоренным вариантами старения непоследовательны и неоднозначны. В некоторых публикациях сообщается об участии IL-6, IL-10 и TNF α в процессе старения пациентов с сахарным диабетом и диабетической ретинопатией, другой соматической патологией без дифференциации типов (вариантов) старения [8, 11]. Другие же системные интерлейкины при рассмотрении процессов старения при обсуждаемой офтальмологической патологии, как правило, не анализируются.

Значение некоторых интерлейкинов крови в развитии старения в отдельных публикациях показано в экспериментальных работах [8, 9]. В связи с этим и вышесказанным актуальность представляет изучение широкого спектра системных интерлейкинов у пациентов с диабетической ретинопатией с различными вариантами старения.

Цель исследования — изучение содержания системных интерлейкинов у пациентов с диабетической ретинопатией с ускоренным и физиологическим старением.

Материалы и методы

В клинических условиях на базе Тамбовского филиала МНТК «Микрохирургия глаза имени академика С.Н. Федорова» проведено обследование 240 пациентов с диабетической ретинопатией в возрасте 60-74 лет. Диагноз диабетической ретинопатии устанавливался в соответствии с критериями клинических рекомендаций Общероссийской ассоциации врачей-офтальмологов «Сахарный диабет: ретинопатия диабетическая, макулярный отек диабетический» [1] и по результатам комплексного офтальмологического обследования. Для верификации диабетической ретинопатии использовалась щелевая лампа, позволяющая исследовать кровеносные сосуды сетчатки, являющиеся следствием осложнений сахарного диабета. Всем пациентам выполня-

лась также оптическая когерентная томография с функцией ангиографии для автоматического анализа поврежденных сосудов.

Среди обследованных 240 пациентов с диабетической ретинопатией и 115 пациентов без диабетической ретинопатии проводилось определение биологического возраста автоматически сфигмоманометром VaSera VS-1500 (Fukuda Denshi, Япония) по стандартной методике. Под биологическим возрастом понимался уровень развития, изменения или износа структуры либо функции элемента организма, функциональной системы, организма в целом, выраженный в единице времени [6]. На основании различий хронологического (паспортного) и биологического возраста устанавливался тип (вариант) старения — физиологический при разнице между биологическим и хронологическим возрастом в диапазоне от -2,9 до +2,9 года и ускоренный при разнице между биологическим и хронологическим возрастом в диапазоне более чем на 3 года [6]. С учетом этого среди обследованных 240 пациентов было выделено 106 пациентов с физиологическим старением (контрольная группа) и 134 пациента с ускоренным старением (основная группа), у которых в соответствии с целью исследования выполнено изучение системного интерлейкинового профиля по единой методике.

Содержание интерлейкинов в плазме крови определялось иммуноферментным анализом с применением наборов «Протеиновый контур» (Санкт-Петербург). Забор крови производился до проведения процедур и приема лекарственных препаратов в утренние часы натощак. В плазме крови определяли содержание IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-13, IL-17.

Обследование пациентов выполнялось с учетом принципов надлежащей клинической практики (Good Clinical Practice) и получения письменного информированного согласия пациентов.

При статистической обработке применялась программа Statistica 10.0 и непараметрический критерий χ^2 .

Результаты и обсуждение

Хронологический возраст пациентов, страдающих диабетической ретинопатией, не имел статистически значимых различий с хронологическим возрастом пациентов без диабетической ретинопатии (рис. 1). Однако биологический возраст пациентов с диабетической ретинопатией в основной группе превышал хронологический возраст со статистически достоверным различием ($p < 0,001$). Среди пациентов без диабетической ретинопатии биологический возраст незначительно превышал хронологический возраст, не имея при этом статистически значимых различий ($p > 0,05$). При сравнении биологиче-

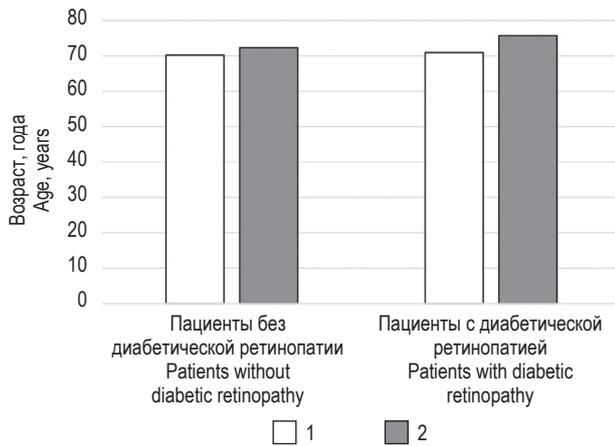


Рисунок 1. Хронологический (1) и биологический (2) возраст пациентов с диабетической ретинопатией и без диабетической ретинопатии

Примечание. * – $p < 0,05$ между сравниваемыми клиническими группами, ** – $p < 0,001$ между хронологическим и биологическим возрастом в каждой группе.

Figure 1. Chronological (1) and biological (2) age of patients with diabetic retinopathy and without diabetic retinopathy

Note. *, $p < 0.05$ between compared diseases; **, $p < 0.001$ between chronological and biological age in each group.

ского возраста среди пациентов с диабетической ретинопатией и без диабетической ретинопатии выявлено, что разница между указанными группами по данному показателю составила $3,4 \pm 0,3$ года и различие является статистически значимым ($p < 0,05$).

Следовательно, у пациентов, страдающих диабетической ретинопатией, наблюдалось ускоренное старение, тогда как среди пациентов без обсуждаемой офтальмологической патологии – физиологическое старение. Это указывает на существенное влияние диабетической ретинопатии на процесс старения таких пациентов. Другой причиной ускоренного старения пациентов с диабетической ретинопатией могут служить изменения системного интерлейкинового профиля.

Системный интерлейкиновый профиль пациентов с диабетической ретинопатией с физиологическим и ускоренным старением (табл. 1) существенно различался по большинству интерлейкинов крови.

При этом наибольшие изменения в концентрации изученных системных интерлейкинов в плазме крови у пациентов с диабетической ретинопатией с ускоренным старением в сравнении с группой пациентов с диабетической ретинопатией с физиологическим старением присущи IL-6 и IL-13, уровень которых статистически значимо повысился среди пациентов с ускоренным типом старения в 6,1 и 3,1 раза соответственно. Обращает также внимание значительное и статистически достоверное увеличение у пациентов с диабетической ретинопатией с ускоренным старением в плазме крови IL-17 и IL-8 с практически одина-

ТАБЛИЦА 1. КОНЦЕНТРАЦИЯ ИНТЕРЛЕЙКИНОВ В ПЛАЗМЕ КРОВИ ПОЖИЛЫХ ПАЦИЕНТОВ С ДИАБЕТИЧЕСКОЙ РЕТИНОПАТИЕЙ С РАЗЛИЧНЫМ ТИПОМ СТАРЕНИЯ ($M \pm m$, пг/мл)

TABLE 1. CONCENTRATION OF INTERLEUKINS IN THE BLOOD PLASMA OF ELDERLY PATIENTS WITH DIABETIC RETINOPATHY WITH DIFFERENT TYPES OF AGING ($M \pm m$, pg/mL)

Название интерлейкина Interleukin name	Пациенты с диабетической ретинопатией с физиологическим старением Patients with diabetic retinopathy with physiological aging	Пациенты с диабетической ретинопатией с ускоренным старением Patients with diabetic retinopathy with accelerated aging	p
IL-1 α	20,4 \pm 0,9	22,7 \pm 0,6	> 0,05
IL-1 β	15,7 \pm 1,1	18,2 \pm 0,7	< 0,05
IL-2	2,8 \pm 0,3	3,2 \pm 0,4	> 0,05
IL-3	3,1 \pm 0,3	5,9 \pm 0,4	< 0,001
IL-4	4,5 \pm 0,4	2,3 \pm 0,2	< 0,001
IL-5	3,8 \pm 0,2	6,4 \pm 0,5	< 0,001
IL-6	4,2 \pm 0,5	25,7 \pm 1,8	< 0,001
IL-7	5,0 \pm 0,4	6,2 \pm 0,5	> 0,05
IL-8	6,1 \pm 0,7	13,4 \pm 0,8	< 0,001
IL-9	9,8 \pm 0,6	11,3 \pm 0,7	> 0,05
IL-10	19,2 \pm 0,7	7,4 \pm 0,6	< 0,001
IL-13	0,7 \pm 0,2	2,2 \pm 0,3	< 0,001
IL-17	8,4 \pm 0,9	19,8 \pm 0,6	< 0,001

ковым повышением концентрации вышеназванных провоспалительных системных интерлейкинов.

Среди других провоспалительных системных интерлейкинов у пациентов с диабетической ретинопатией с ускоренным старением произошло увеличение экспрессии IL-1 β , IL-3, IL-5, имевших статистически достоверные различия с одноименными параметрами пациентов с диабетической ретинопатией с физиологическим старением. Вместе с тем в группе провоспалительных интерлейкинов крови на системном уровне не изменилось содержание в плазме крови пациентов с диабетической ретинопатией с ускоренным старением таких интерлейкинов, как IL-1 α , IL-2, IL-7, и IL-9.

Среди анализированных противовоспалительных системных интерлейкинов у пациентов с диабетической ретинопатией с ускоренным старением выявлено статистически достоверное снижение IL-4 и IL-10 по сравнению с пациента-

ми с диабетической ретинопатией с физиологическим старением. При этом в большей степени наблюдалось снижение концентрации в плазме крови IL-10 в 2,6 раза против пациентов с диабетической ретинопатией с физиологическим старением, а уменьшение противовоспалительного IL-4 — в 2,0 раза с достоверным различием в обоих случаях.

Таким образом, у пациентов с диабетической ретинопатией и ускоренным старением наблюдаются выраженные статистически значимые изменения системного интерлейкинового профиля как в провоспалительном, так и в противовоспалительном звене. Это свидетельствует о важной роли выявленных патологических изменений интерлейкинового статуса в ускорении старения у пациентов, страдающих диабетической ретинопатией. Специфическими ведущими проявлениями иммунологических нарушений у пациентов с диабетической ретинопатией с ускоренным старением являются: повышение в плазме крови IL-6, IL-13, IL-17, IL-8 и снижение IL-10, IL-4.

Уровни воспалительных цитокинов, включая IL-6, фактор некроза опухоли α (TNF α) в крови, связаны с процессом старения, апоптозом и особенно у пациентов с сахарным диабетом 2-го типа и диабетической ретинопатией [7, 9, 11]. Показано, что старение человека сопровождается изменениями в иммунной системе с 2-4-кратным увеличением циркулирующих в крови провоспалительных цитокинов [8]. При этом наиболее выраженным из системных цитокинов является интерлейкин-6 (IL-6), который может проявлять как провоспалительные свойства, стимулируя выработку антител и индуцируя острый воспалительный процесс, так и противовоспалительные свойства, блокируя синтез воспалительных цитокинов [8]. Приоритетное значение IL-6 в ускоренном старении пациентов с диабетической ретинопатией установлено и в настоящем исследовании, что согласуется с вышеуказанной ведущей ролью IL-6 в старении человека. IL-6 с точки зрения геронтологии и старения организма человека может способствовать не только ускоренному старению, но и выступать фактором риска снижения функционального резерва иммунной системы и развития ограничения жизнедеятельности [8, 11]. Кроме того, более высокие уровни IL-6 у пожилых людей можно рассматривать как маркеры возраст-ассоциированных заболеваний, сопряженных с ускоренным старением.

Помимо установленного многократного повышения в плазме крови IL-6 у пациентов с диабетической ретинопатией с ускоренным старением нами диагностированы статистически значимые изменения других провоспалительных интерлейкинов, сопровождающиеся увеличением концентрации IL-13, IL-17, IL-8, IL-5. Данный факт указывает, безусловно, на участие перечисленных выше системных интерлейкинов в ускорении

старения пациентов с диабетической ретинопатией. Однако остается неясным играют ли воспалительные интерлейкины причинную роль в патологическом процессе ускоренного старения или действуют как медиаторы [11]. Ранее выполненные исследования показали, что более высокие уровни воспалительных цитокинов связаны с различными проявлениями старения человека, но эти результаты оказались непоследовательными, а выводы — неоднозначными [7]. Установлены различия в содержании IL-6, TNF α и IL-10 у пациентов с сахарным диабетом и диабетической ретинопатией по сравнению с другими соматическими заболеваниями [9].

Старение организма человека может быть вызвано снижением IL-10 в плазме крови при имеющейся резистентности к инсулину [8], в том числе установленное нами и у пациентов с диабетической ретинопатией с ускоренным старением. Именно увеличение IL-10 среди противовоспалительных интерлейкинов на системном уровне оказалось более существенным у пациентов с диабетической ретинопатией с ускоренным старением. IL-10, вырабатываемый в основном макрофагами, и отвечает за подавление провоспалительного ответа и предотвращает воспаление, а также высвобождение и активность воспалительных цитокинов, таких как IL-6, TNF α и IL-1 β [11].

О влиянии других системных интерлейкинов на старение человека, в том числе пациентов с диабетической ретинопатией, сведения крайне ограничены, а некоторые результаты получены на относительно небольшой выборке пациентов, который не был репрезентативным [11].

Заключение

Среди пациентов, страдающих диабетической ретинопатией, установлено, что ускоренное старение встречается в более половине случаев. Пациенты с диабетической ретинопатией с ускоренным старением характеризуются статистически значимыми различиями концентрации в плазме крови большинства изученных системных интерлейкинов. У пациентов с диабетической ретинопатией с ускоренным старением по сравнению с пациентами с диабетической ретинопатией с физиологическим старением выявлено достоверное существенное увеличение в плазме крови IL-6, IL-8, IL-13, IL-17 и снижение уровня противовоспалительных интерлейкинов IL-4 и IL-10. Установленная диссоциация интерлейкинов показывает участие иммунной системы в ускорении старения пациентов с диабетической ретинопатией, а вышеназванные системные интерлейкины можно использовать в качестве иммунологических предикторов ускоренного старения у пациентов с диабетической ретинопатией.

Список литературы / References

1. Астахов Ю.С., Нероев В.В., Шестакова М.В., Зайцева О.В., Охочимская Т.Д., Рябина М.В., Шадричев Ф.Е., Григорьева Н.Н., Липатов Д.В., Кононенко Д.В. Клинические рекомендации «Сахарный диабет: ретинопатия диабетическая, макулярный отек диабетический». М.: Общероссийская общественная организация «Ассоциация врачей-офтальмологов», 2020. 58 с. [Astakhov Yu.S., Neroev V.V., Shestakova M.V., Zaitseva O.V., Okhotsimskaya T.D., Ryabina M.V., Shadrichev F.E., Grigorieva N.N., Lipatov D.V., Kononenko D.V. Clinical recommendations "Diabetes mellitus: diabetic retinopathy, diabetic macular edema"]. Moscow: All-Russian public organization "Association of Ophthalmologists", 2020. 58 p.
2. Бикбов М.М., Гильманшин Т.Р., Зайнуллин Р.М. Эпидемиология диабетической ретинопатии в республике Башкортостан // Современные технологии в офтальмологии, 2019. № 1. С. 440-443. [Bikbov M.M., Gilmanshin T.R., Zainullin R.M. Epidemiology of diabetic retinopathy in the Republic of Bashkortostan. *Sovremennye tekhnologii v oftalmologii = Modern Technologies in Ophthalmology*, 2019, no. 1, pp. 440-443. (In Russ.)]
3. Фабрикантов О.Л., Агарков Н.М., Лев И.В., Гурко Т.С., Яблоков М.М., Москалева Е.О., Москалев А.А. Аллостатическая нагрузка как способ объективизации возрастной жизнеспособности пациентов с офтальмопатологией // Научные результаты биомедицинских исследований, 2021. Т. 7, № 3. С. 451-460. [Fabrikantov O.L., Agarkov N.M., Lev I.V., Gurko T.S., Yablokov M.M., Moskaeva E.O., Moskaev A.A. Allostatic load as a method of objectification of age-related viability of patients with ophthalmopathy. *Nauchnye rezultaty biomeditsinskikh issledovaniy = Research Results in Biomedicine*, 2021, Vol. 7, no. 3, pp. 451-460. (In Russ.)]
4. Burton M.J., Ramke J., Marques A.P., Bourne R.R., Congdon N., Jones I., Tong B.A., Arunga S., Bachani D., Bascaran C., Bastawros A., Blanchett K., Braithwaite T., Buchan J.C., Cairns J., Cama A., Chagunda M., Chuluunhuu C., Cooper A., Crofts-Lawrence J., Dean W.H., Denniston A.K., Ehrlich J.R., Emerson P.M., Evans J.R., Frick K.D., Friedman D.S., Furtado J.M., Gichangi M.M., Gichuli S., Gilbert S.S., Guring R., Habtamu E., Holland P., Konas J.B., Keane P.A., Keay L., Khanna R.C., Khaw P.T., Kuper H., Kyari F., Lansingh V.C., Mactaggart I., Mafwiri M.M., Mathenge W., McCormick M., Morjaria P., Mowatt L., Muirhead D., Murths G.V., Mwangi N., Patel D.B., Peto T., Qureshi B.M., Salomao S.R., Sarah V., Shilio B.R., Solomon A.W., Swenor B.K., Taylor H.R., Wang N., Webson A., West S.K., Wong T.Y., Wormald R., Yasmin S., Yusufu M., Silva J.C., Resnikoff S., Ravilla T., Gilbert C.E., Foster A., Faal H.B. The Lancet Global Health Commission on Global Eye Health: vision beyond 2020. *Lancet Glob. Health*, 2021, Vol. 9, no. 4, pp. 489-551.
5. Das T., Takkar B., Sivaprasad S., Thanksphon T., Taylor H., Wiedemann P., Nemeth J., Nayar P.D., Rani P.K., Khandekar R. Recently updated global diabetic retinopathy screening guidelines: commonalities, differences, and future possibilities. *Eye (Lond.)*, 2021, Vol. 35, no. 10, pp. 2685-2698.
6. Heaney J.L., Phillips A.C., Carroll D. Ageing, physical function, and the diurnal rhythms of cortisol and dehydroepiandrosterone. *Psychoneuroendocrinology*, 2012, Vol. 37, no. 3, pp. 341-349.
7. Keegan A.P., Paris D., Luis C.A., Abdullah L., Ait-Ghezala G., Beaulieu-Abdelahad D., Pryor M., Chaykin J., Crynen G., Crawford F., Mullan M. Plasma cytokine IL-6 levels and subjective cognitive decline: preliminary findings. *Int. J. Geriatr. Psychiatry*, 2018, Vol. 33, no. 2, pp. 358-363.
8. Kurowska A., Bodys-Cupak I., Staszkiwicz M., Szklarczyk J., Zaleska-Puchala J., Kliś-Kalinowska A., Makara-Studzinska A., Majda A. Interleukin-6 and melatonin as predictors of cognitive, emotional and functional ageing of older people. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 2020, Vol. 17, no. 10, 3623. doi: 10.3390/ijerph17103623.
9. Palta P., Xue Q.L., Deal J.A., Fried L.P., Walston J.D., Carlson M.C. Interleukin-6 and C-reactive protein levels and 9-year cognitive decline in community-dwelling older women: the Women's Health and Aging Study II. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.*, 2015, Vol. 70, no. 7, pp. 873-878.
10. Ra H., Lee A., Lee J., Kim I., Baek J. Cytokines associated with hemorrhage in proliferative diabetic retinopathy. *Int. Ophthalmol.*, 2021, Vol. 41, no. 5, pp. 1845-1853.
11. Wennberg A.M., Hagen C.E., Machulda M.M., Knopman D.S., Petersen R.C., Mielke M.M. The Cross-Sectional and Longitudinal Associations between IL-6, IL-10, and TNF α and Cognitive Outcomes in the Mayo Clinic Study of Aging. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.*, 2019, Vol. 74, no. 8, pp. 1289-1295.
12. Ye J., Wang Y., Wang Z., Liu L., Yang Z., Ye D., Wang M., Xu Y., Zhang J., Zhao M., Liu J., Lin Y., Ji Q., Wan J. Interleukin-12p35 deficiency enhances mitochondrial dysfunction and aggravates cardiac remodeling in aging mice. *Aging (Albany NY)*, 2020, Vol. 12, no. 1, pp. 193-203.

Авторы:

Агарков Н.М. — д.м.н., профессор кафедры биомедицинской инженерии ФГБОУ ВО «Юго-Западный государственный университет», г. Курск; старший научный сотрудник лаборатории «Проблемы старения» ФГАОУ ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет», г. Белгород, Россия

Лев И.В. — к.м.н., заведующая I офтальмологическим отделением Тамбовского филиала МНТК «Микрохирургия глаза имени академика С.Н. Федорова» Министерства здравоохранения РФ, г. Тамбов, Россия

Воронина Е.А. — к.м.н., научный сотрудник АНО «Научно-исследовательский медицинский центр «Геронтология», Москва, Россия

Поступила 24.04.2022
Принята к печати 15.10.2022

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

Lev I.V., PhD (Medicine), Ophthalmologist, Head, First Ophthalmological Department, S. Fedorov Medical Research Center of Eye Microsurgery, Tambov Branch, Tambov, Russian Federation

Voronina E.A., PhD (Medicine), Research Associate, Research Medical Center "Gerontology", Moscow, Russian Federation

Received 24.04.2022
Accepted 15.10.2022

ВНЕКЛЕТОЧНЫЕ ЛОВУШКИ НЕЙТРОФИЛОВ: ОСОБЕННОСТИ ОБРАЗОВАНИЯ ПРИ РЕВМАТОИДНОМ АРТРИТЕ И ОСТЕОАРТРИТЕ

**Бедина С.А.^{1,2}, Мозговая Е.Э.¹, Трофименко А.С.¹, Спицина С.С.¹,
Мамус М.А.¹**

¹ ФГБНУ «Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной ревматологии имени А.Б. Зборовского», г. Волгоград, Россия

² ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Волгоград, Россия

Резюме. Сходство клинических проявлений и некоторых патогенетических механизмов при ревматоидном артрите (РА) и остеоартрите (ОА) вызывает определенный интерес в изучении особенностей образования внеклеточных ловушек нейтрофилов (NETs) при данных заболеваниях костно-мышечной системы.

Цель – оценить образование внеклеточных ловушек циркулирующими периферическими нейтрофилами в зависимости от аутоиммунного воспаления при РА и реактивного воспаления при ОА.

Основную группу составили 39 больных РА, контрольную – 35 больных ОА, референтную – 33 условно здоровых лица. Нейтрофилы выделяли одноэтапным центрифугированием в ступенчатом градиенте йогексола. Стимулировали генерацию NETs форбол-12-миристан-13-ацетата (ФМА). Визуализация NETs осуществлялась методом флуоресцентной микроскопии.

У больных РА при включении в исследование активность по шкале DAS28 была $\leq 2,6$ балла; больные ОА были вне обострения. В ходе динамического наблюдения у 17 больных РА выявлено повышение DAS28 $> 3,2$ балла, у 25 больных ОА – обострение. Средняя доля NETs спонтанных и индуцированных в референтной группе составила 3,8 (2,6-5,0) % и 12,2 (9,0-15,4) % соответственно; у больных с неактивным РА – 5,9 (5,6-6,2) % и 26 (23,9-28,1) %, активным РА – 16,6 (16,1-17,1) % и 38,0 (36,6-39,4) % соответственно; при ОА вне обострения: 5,4 (5,2-5,6) % и 20,3 (18,3-22,3) %, при обострении ОА с развитием синовита: 13,1 (12,6-18,1) % и 28,3 (6,4-30,2) % соответственно. Прирост спонтанных NETs при активации РА – 181,4%, индуцированных – 46,2%; а при обострении ОА – 142,6% и – 39,4% соответственно. Темп прироста спонтанного образования NETs оказался выше индуцированного в 3,9 у больных РА и в 3,6 раза при ОА. Прирост спонтанных NETs относительно индуцированных выражен в большей степени при активном РА по сравнению с ОА с синовитом. Основное различие в составе

Адрес для переписки:

Бедина Светлана Александровна
ФГБНУ «Научно-исследовательский институт
клинической и экспериментальной ревматологии
имени А.Б. Зборовского»
400138, Россия, г. Волгоград, ул. им. Землячки, 76.
Тел.: 8 (8442) 78-90-95.
E-mail: clinicalbiochemistry@yandex.ru

Address for correspondence:

Bedina Svetlana A.
A. Zborovsky Research Institute
of Clinical and Experimental Rheumatology
76 Zemlyachki St
Volgograd
400138 Russian Federation
Phone: +7 (8442) 78-90-95.
E-mail: clinicalbiochemistry@yandex.ru

Образец цитирования:

С.А. Бедина, Е.Э. Мозговая, А.С. Трофименко, С.С. Спицина, М.А. Мамус «Внеклеточные ловушки нейтрофилов: особенности образования при ревматоидном артрите и остеоартрите» // Медицинская иммунология, 2024. Т. 26, № 1. С. 175-180. doi: 10.15789/1563-0625-NET-2672

© Бедина С.А. и соавт., 2024

Эта статья распространяется по лицензии Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

S.A. Bedina, E.E. Mozgovaya, A.S. Trofimenko, S.S. Spitsyna, M.A. Mamus "Neutrophil extracellular traps: features of their formation in rheumatoid arthritis and osteoarthritis", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2024, Vol. 26, no. 1, pp. 175-180. doi: 10.15789/1563-0625-NET-2672

© Bedina S.A. et al., 2024

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

DOI: 10.15789/1563-0625-NET-2672

NETs у больных активным РА (в 88% случаев) и ОА с синовитом (в 50% случаев) обусловлено содержанием цитруллиновых эпитопов ($p = 0,03$).

Переход РА из состояния ремиссии к активному воспалению и обострение ОА сопровождаются значительным приростом образования NETs, особенно спонтанного. При этом степень роста была выше при РА, что, по-видимому, свидетельствует о большей заинтересованности нейтрофилов в генерации NETs при аутоиммунном воспалении по сравнению с реактивным. Преобладание цитруллинированных эпитопов в составе NETs демонстрирует их влияние на индукцию и поддержание аутоиммунной реакции к специфическим для РА аутоантигенам.

Ключевые слова: ревматоидный артрит, остеоартрит, нейтрофилы, внеклеточные ловушки нейтрофилов, NETosis, аутоиммунное воспаление, реактивное воспаление

NEUTROPHIL EXTRACELLULAR TRAPS: FEATURES OF THEIR FORMATION IN RHEUMATOID ARTHRITIS AND OSTEOARTHRITIS

Bedina S.A.^{a,b}, Mozgovaya E.E.^a, Trofimenko A.S.^a, Spitsyna S.S.^a, Mamus M.A.^a

^a A. Zborovsky Research Institute of Clinical and Experimental Rheumatology, Volgograd, Russian Federation

^b Volgograd State Medical University, Volgograd, Russian Federation

Abstract. The similarity of clinical manifestations and some pathogenetic mechanisms in rheumatoid arthritis (RA) and osteoarthritis (OA) is of particular interest in studying the features of extracellular neutrophil traps (NETs) formation in these musculoskeletal diseases. Our objective was to evaluate circulating neutrophil extracellular trap formation related to autoimmune inflammation in RA and reactive inflammation in OA.

39 RA patients comprised the main group; 35 OA patients, control group; 33 healthy individuals were included into the reference group. Circulating neutrophils were isolated by the one-step centrifugation in double layer of iohexol density gradient. NETs were induced by phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA) being visualized by fluorescence microscopy.

The RA disease activity at the inclusion period should not exceed 2.6 DAS28 points. OA patients were in clinical remission at the inclusion timepoint. In 17 RA patients, an increase in DAS28 exceeded 3.2 points; in 25 OA patients, an exacerbation was diagnosed during the study. The mean percentage of spontaneous and induced NETs in reference group was 3.8% (2.6-5.0) and 12.2% (9.0-15.4), respectively. Appropriate values for the patients with inactive RA were 5.9% (5.6-6.2) and 26% (23.9-28.1); 16.6% (16.1-17.1) and 38.0% (36.6-39.4) in active RA cases, respectively; 5.4% (5.2-5.6) and 20.3% (18.3-22.3) in OA without synovitis; 13.1% (12.6-18.1) and 28.3% (6.4-30.2) in OA with synovitis, respectively. Spontaneous increase of NETs during RA activation was 181.4%; induced increase in NETs was 46.2%; and in cases of OA exacerbation these values were 142.6% and 39.4%, respectively. In RA patients, the rates of spontaneous NETs formation were 3.9 times higher than for induced values. Appropriate index was 3.6 times higher among the OA patients. The increase in spontaneous -to-induced NETs formation was more pronounced in active RA than in OA with synovitis. The main difference in NETs composition for active RA patients (in 88% of cases) and OA synovitis (in 50% of cases) is related to the contents of citrulline epitopes ($p = 0.03$).

Transition of RA from the remission state to active inflammation, as well as OA exacerbation are accompanied by a significant increase in NETs, especially, spontaneous formation. The degree of increase in RA was higher than in OA, thus, probably, indicating higher involvement of neutrophils in generation of NETs during autoimmune inflammation rather than in reactive inflammation. A sufficient role of citrullinated epitopes in NETs demonstrates their influence upon induction and maintenance of autoimmune response to RA-specific autoantigens.

Keywords: rheumatoid arthritis, osteoarthritis, neutrophils, NETs, NETosis, autoimmune inflammation, reactive inflammation

Введение

Ревматоидный артрит (РА) и остеоартрит (ОА) входят в группу болезней костно-мышечной системы и соединительной ткани, и являются наиболее распространенными заболеваниями суставов, которыми страдают примерно 11% (10% ОА и 1% РА) населения мира [3]. Несмотря на разнообразие этиологических факторов и различия в патогенезе, они имеют много общих факторов риска и патогенных механизмов, приводящих к разрушению хряща и дегенерации кости [5]. Считается, что такие триггеры, как пожилой возраст, факторы окружающей среды (курение), питания (диета), гормональные (женский пол), травма, высокий индекс массы тела (ИМТ) в сочетании с артрит-предрасположенным генетическим профилем запускают активацию высвобождения провоспалительных цитокинов в синовиальную жидкость сустава, что приводит к возникновению артрита [5]. Несмотря на то, что поражение синовия играет важную роль в патологических изменениях при обоих заболеваниях, у больных РА синовиальная ткань подвергается более высокой инфильтрации иммунными клетками и экспрессией цитокинов [6, 7]. Оба заболевания характеризуются наличием воспалительного суставного синдрома, сопровождающегося болью, нарушением функции суставов, ранней инвалидизацией и снижением качества жизни больных [4, 5].

На сегодняшний день основной целью лечения РА и ОА остается купирование или уменьшение боли и воспаления, а также эффективное предотвращение повреждения хряща и дальнейшего прогрессирования заболеваний, сопряженного с гиперплазией синовия и последующей деструкцией суставов. В то же время применение современных методов лечения не позволяет достигнуть данной цели. Несмотря на применение таргетной терапии и иммуномодулирующих препаратов для лечения РА, значительная часть больных неадекватно отвечает на терапию, остается невосприимчивой к лечению, что сопровождается обострением и прогрессированием заболевания, ухудшением состояния больных и даже преждевременной смертностью. Кроме того, пока не существует болезнь модифицирующих методов лечения ОА [5]. Неадекватность терапии РА и ОА определена тем, что на текущий момент не выяснены в полной мере все пусковые моменты и патогенетические процессы. По данным литературы одним из таких триггеров является процесс генерации циркулирующими нейтрофилами внеклеточных сетей (NETs). Нейтрофильные внеклеточные ловушки при различных заболеваниях на современном этапе являются предметом изучения ученых всего мира. Не стал исключением и РА. Однако все исследования,

касающиеся РА осуществлялись при активном ревматоидном процессе, а исследований относительно участия NETs в патогенезе ОА и вовсе не проводилось. В то же время сходство клинических проявлений и некоторых патогенетических механизмов создает определенный интерес в изучении процесса образования сетей и при ОА, а также выявление особенностей NETs у больных РА и ОА не только в стадии ремиссии, но и при обострении заболеваний.

Цель исследования — оценить образование внеклеточных ловушек циркулирующими периферическими нейтрофилами в зависимости от аутоиммунного воспаления при РА и реактивного воспаления при ОА.

Материалы и методы

Исследование проведено в соответствии с этическими принципами биомедицинских исследований, заложенными Хельсинкской декларацией ВМА в рамках исполнения государственного задания на выполнение работы «Проведение фундаментальных научных исследований» и в соответствии с протоколом, одобренным локальным комитетом по биомедицинской этике ФГБНУ «НИИ КиЭР им. А.Б. Зборовского» (протокол № 1 от 14.11.2016 г.). В исследование включены 39 (6 (15%) мужчин и 33 (85%) женщины) больных с верифицированным РА (по критериями ACR/EULAR (2010) и 35 (8 (23%) мужчин и 27 (77%) женщин) больных с верифицированным ОА, составивших основную и контрольную группу соответственно. Средний возраст больных РА — 44,3 (44,0-44,6) лет, средняя продолжительность заболевания — 1,7 (1,5-1,9) лет. Средний возраст больных ОА — 51,7 (51,2-52,2) лет, средняя продолжительность заболевания — 8,2 (7,4-9,0) лет. В референтную группу вошли 33 (9 мужчин и 24 женщины) условно здоровых лиц. Критерии включения больных в исследование: 1. Возраст от 18 до 70 лет. 2. Верифицированный диагноз РА или ОА. 4. Активность РА $\leq 2,6$ балла по шкале DAS28. 4. ОА вне обострения. 5. Наличие подписанного информированного согласия на участие в исследовании. У пациентов, удовлетворяющих критериям включения, проводился отбор образца крови. Клинико-лабораторная оценка активности заболевания выполнялась в динамике с четырехмесячным интервалом. В случае повышении DAS28 более 3,2 балла при РА или при появлении признаков синовита при ОА в течение 12 месяцев выполнялся повторный отбор образца крови.

Циркулирующие нейтрофилы периферической крови выделяли одноэтапным центрифугированием в ступенчатом градиенте йогексола в оригинальной модификации с плотностью верхнего и нижнего слоев: 1080 кг/м³ и 1090 кг/м³ со-

ответственно [1]. Качественный состав фракций оценивали с помощью микроскопии стандартных мазков, окрашенных по методу Май–Грюнвальда, жизнеспособность клеток — методом исключения трипанового синего, степень активации — стандартным тестом с нитросиним тетразолием [2]. Стимулировали образование NETs форбол-12-миристат-13-ацетатом (ФМА) (Merck/Sigma, США). Методом флуоресцентной микроскопии (длина волны возбуждения 485 нм, эмиссии — 535 нм) визуализировали спонтанное и индуцированное образование NETs. За NETs принимали внеклеточные структуры, превышающие размер интактных гранулоцитов. Результат выражали в процентах, как относительное количество нейтрофилов с внеклеточными ловушками на 100 сосчитанных лейкоцитов при визуализации в образце не менее 200 клеток.

Статистическую обработку выполняли с использованием программы STATISTICA 10.0 для Windows. Результаты выражали как среднее арифметическое (95% доверительный интервал) (M (95% ДИ). Верхние границы ДИ, превышающие 100%, усекали до 100%. Для сопоставления центральных тенденций использовали парный и непарный критерии Стьюдента. Для анализа различий качественных показателей применяли точный критерий Фишера. Статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$. Темп прироста спонтанных и индуцированных NETs при увеличении DAS28 $> 3,2$ у больных РА и при обострении ОА по сравнению с предыдущим визитом вычисляли как частное от деления разни-

цы конечного и исходного значений на исходное значение, умноженное на 100%.

Результаты и обсуждение

Распределение больных РА и ОА в процессе динамического контроля активности заболеваний представлено в таблице 1. Средняя частота спонтанного и индуцированного образования NETs в референтной группе составила 3,8 (2,6-5,0) % и 12,2 (9,0-15,4) % соответственно. У больных с неактивным РА средняя доля циркулирующих нейтрофилов, спонтанно и индуцированно генерирующих NETs: 5,9 (5,6-6,2) % и 26 (23,9-28,1) %; активным РА — 16,6 (16,1-17,1) % и 38,0 (36,6-39,4) % соответственно. При ОА вне обострения: 5,4 (5,2-5,6) % и 20,3 (18,3-22,3) % соответственно; при обострении ОА с развитием синовита: 13,1 (12,6-18,1) % и 28,3 (6,4-30,2) % соответственно. Прирост спонтанного образования NETs при активации РА — 181,4%, индуцированного — 46,2%; а при обострении ОА — 142,6% и 39,4% соответственно. Темп прироста спонтанного образования NETs оказался выше индуцированного в 3,9 и 3,6 раза у больных РА и ОА соответственно. Динамика всех параметров образования NETs при активации РА существенно выше, чем при обострении синовита у больных ОА ($p < 0,001$), при этом обращает внимание значительно больший прирост спонтанной генерации NETs относительно индуцированной (в 5,7 раза) при активном РА по сравнению с ОА с синовитом (рис. 1). Анализ основных компонентов NETs у больных РА и ОА демонстрировал присутствие МПО, гистонов Н3 и цитруллиновых эпитопов. При этом частота обнаружения антигенов МПО и гистонов Н3 у больных РА близка к таковой для ОА и здоровых лиц. Наиболее выраженное различие между активным РА и ОА с синовитом в составе NETs имело место для цитруллиновых эпитопов ($p = 0,03$), которые обнаруживались при РА и ОА в 88% и 50% случаев.

Исследования по изучению образованию NETs у больных РА проводились и другими авторами, но они выполнялись при РА в активной фазе [8]. В своей работе мы изучили зависимость генерации NETs циркулирующими нейтрофилами у больных РА при трансформации воспалительного процесса в активную стадию и у больных ОА в процессе обострения, а также провели сравнительное исследование NETosa при активном аутоиммунном процессе при РА и реактивном воспалении при ОА. Полученные данные свидетельствуют о том, что активизация как аутоиммунного воспаления, так и асептического воспаления сопровождается значительным приростом образования внеклеточных ловушек, особенно спонтанного, что вероятно свидетель-

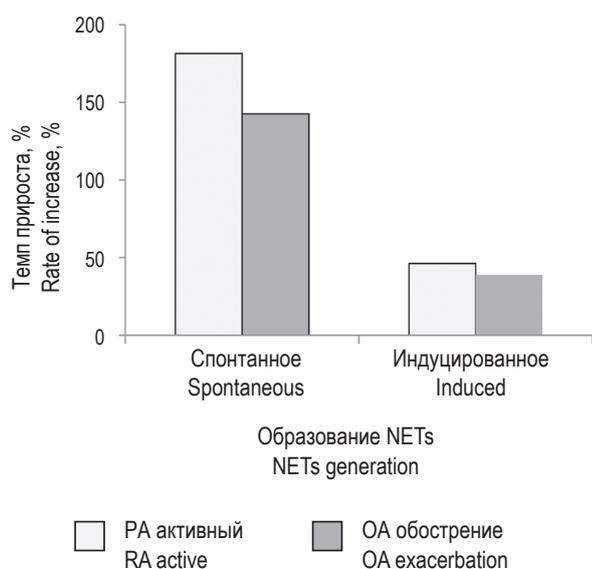


Рисунок 1. Темп прироста спонтанной и индуцированной генерации NETs при РА и ОА

Figure 1. Growth rate of NETs spontaneous and induced generation in RA and OA

ТАБЛИЦА 1. РАСПРЕДЕЛЕНИЕ БОЛЬНЫХ РА И ОА В ПРОЦЕССЕ ДИНАМИЧЕСКОГО КОНТРОЛЯ

TABLE 1. DISTRIBUTION OF RA AND OA PATIENTS IN DURING DYNAMIC CONTROL

Больные Patients		Визит 0 Visit 0	Визит 1, через 3 месяца Visit 1, after 3 months	Визит 2, через 8 месяцев Visit 2, after 8 months	Визит 3, через 12 месяцев Visit 3, after 12 months	Всего Total
РА RA	Всего визитов Total visits	39	39	33	25	136
	DAS28 ≤ 2,6	39	35	28	17	119
	DAS28 > 3,2	–	4	5	8	17
	Отказ от исследования Refusal of research	–	0	2	3	5
ОА OA	Всего визитов Total visits	35	35	29	15	114
	Ремиссия Remission	35	30	17	7	89
	Обострение Exacerbation	–	5	12	8	25
	Отказ от исследования Refusal of research	–	0	1	2	3

стует о том, что NETs могут выполнять роль нового этиологического фактора и принимать непосредственное участие в прогрессировании этих процессов. В то же время аутоиммунное воспаление при РА по сравнению с реактивным при ОА сопровождается более выраженным ростом способности нейтрофилов к образованию NETs. Вероятно, подобная зависимость может быть обусловлена процессингом цитруллинированных аутоантигенов, входящих в состав NETs и являющихся возможным источником цитруллинированных неопептидов, инициирующих антиген-зависимый аутоиммунный ответ, образование аутоантител и поддерживающих стойкое аутоиммунное воспаление при РА, что подтверждается тенденцией к увеличению доли нейтрофилов, образующих NETs у АЦЦП-позитивных больных РА, по сравнению с АЦЦП-негативными [1] и преобладанием цитруллиновых эпитопов в со-

ставе NETs у больных активным РА по сравнению с ОА.

Заключение

Переход РА из состояния ремиссии к активному воспалению и обострение ОА сопровождается значительным приростом образования NETs, особенно спонтанного. При этом степень генерации NETs как индуцированных ФМА, так и спонтанно образующихся, при активном РА значительно выше, чем при ОА с признаками синовита, что, по-видимому, свидетельствует о большей заинтересованности нейтрофилов в генерации NETs при аутоиммунном воспалении по сравнению с реактивным. Преобладание цитруллинированных эпитопов в составе NETs у больных РА демонстрирует их влияние на индукцию и поддержание аутоиммунной реакции к специфическим для РА аутоантигенам.

Список литературы / References

1. Бедина С.А., Мозговая Е.Э., Трофименко А.С., Мамус М.А., Спицина С.С., Зборовская И.А. Внеклеточные ловушки нейтрофилов: динамика образования, ассоциированная с переходом от ремиссии к активному ревматоидному артриту // Сибирское медицинское обозрение, 2022. Т. 6. С. 86-92. [Bedina S.A., Mozgovaya E.E., Trofimenko A.S., Mamus M.A., Spitsyna S.S., Zborovskaya I.A. Neutrophil extracellular traps: formation dynamics associated with the transition from remission to active rheumatoid arthritis. *Sibirskoe meditsinskoe obozrenie = Siberian Medical Review*, 2022, Vol. 6, pp. 86-92. (In Russ.)]
2. Бедина С.А., Мозговая Е.Э., Трофименко А.С., Спицина С.С., Мамус М.А. Образование внеклеточных ловушек нейтрофилами и моноцитами периферической крови больных ревматоидным артритом: изучение нового цитруллинсодержащего аутоантигена // Медицинская иммунология, 2021. Т. 23, № 5.

C. 1165-1170. [Bedina S.A., Mozgovaya E.E., Trofimenko A.S., Spitsyna S.S., Mamus M.A. Formation of extracellular traps by circulating neutrophils and monocytes in rheumatoid arthritis patients: a study of new citrullinated autoantigen. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2021, Vol. 23, no. 5, pp. 1165-1170. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-FOE-2301.

3. Frangos T., Maret W. Zinc and cadmium in the aetiology and pathogenesis of osteoarthritis and rheumatoid arthritis. *Nutrients*, 2020, Vol. 13, no. 1, 53. doi: 10.3390/nu13010053.

4. Gikaro J.M., Xiong H., Lin F. Activity limitation and participation restriction in osteoarthritis and rheumatoid arthritis: findings based on the national health and nutritional examination survey. *BMC Musculoskeletal Disord.*, 2022, Vol. 23, no. 1, 647. doi: 10.1186/s12891-022-05607-z.

5. MacDonald I.J., Huang C.C., Liu S.C., Lin Y.Y., Tang C.H. Targeting CCN proteins in rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Int. J. Mol. Sci.*, 2021, Vol. 22, no. 9, 4340. doi: 10.3390/ijms22094340.

6. Nieminen P., Hämäläinen W., Savinainen J., Lehtonen M., Lehtiniemi S., Rinta-Paavola J., Lehenkari P., Kääriäinen T., Joukainen A., Kröger H., Paakkonen T., Mustonen A.M. Metabolomics of synovial fluid and infrapatellar fat pad in patients with osteoarthritis or rheumatoid arthritis. *Inflammation*, 2022, Vol. 45, no. 3, pp. 1101-1117.

7. Sun F., Zhou J.L., Peng P.J., Qiu C., Cao J.R., Peng H. Identification of disease-specific hub biomarkers and immune infiltration in osteoarthritis and rheumatoid arthritis synovial tissues by bioinformatics analysis. *Dis. Markers*, 2021, Vol. 2021, 9911184. doi: 10.1155/2021/9911184.

8. Wu S., Peng W., Liang X., Wang W. Anti-citrullinated protein antibodies are associated with neutrophil extracellular trap formation in rheumatoid arthritis. *J. Clin. Lab. Anal.*, 2021, Vol. 35, no. 3, e23662. doi: 10.1002/jcla.23662.

Авторы:

Бедина С.А. — к.м.н., старший научный сотрудник клинико-биохимической лаборатории ФГБНУ «Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной ревматологии имени А.Б. Зборовского»; доцент кафедры клинической лабораторной диагностики ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Волгоград, Россия

Мозговая Е.Э. — к.м.н., ведущий научный сотрудник клинико-биохимической лаборатории ФГБНУ «Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной ревматологии имени А.Б. Зборовского», г. Волгоград, Россия

Трофименко А.С. — к.м.н., заведующий клинико-биохимической лабораторией ФГБНУ «Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной ревматологии имени А.Б. Зборовского», г. Волгоград, Россия

Спицына С.С. — младший научный сотрудник клинико-биохимической лаборатории ФГБНУ «Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной ревматологии имени А.Б. Зборовского», г. Волгоград, Россия

Мамус М.А. — младший научный сотрудник клинико-биохимической лаборатории ФГБНУ «Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной ревматологии имени А.Б. Зборовского», г. Волгоград, Россия

Authors:

Bedina S.A., PhD (Medicine), Senior Research Associate, Department of Clinical Biochemistry, A.B. Zborovsky Research Institute of Clinical and Experimental Rheumatology; Associate Professor, Department of Clinical and Laboratory Diagnostics Volgograd State Medical University, Volgograd, Russian Federation

Mozgovaya E.E., PhD (Medicine), Leading Research Associate, Department of Clinical Biochemistry, A. Zborovsky Research Institute of Clinical and Experimental Rheumatology, Volgograd, Russian Federation

Trofimenko A.S., PhD (Medicine), Head of Department, Department of Clinical Biochemistry, A. Zborovsky Research Institute of Clinical and Experimental Rheumatology, Volgograd, Russian Federation

Spitsyna S.S., Junior Research Associate, Department of Clinical Biochemistry, A. Zborovsky Research Institute of Clinical and Experimental Rheumatology, Volgograd, Russian Federation

Mamus M.A., Junior Research Associate, Department of Clinical Biochemistry, A. Zborovsky Research Institute of Clinical and Experimental Rheumatology, Volgograd, Russian Federation

НОВЫЙ ПОДХОД К ИММУНОСУПРЕССИВНОЙ ТЕРАПИИ У БОЛЬНЫХ ГЛОМЕРУЛОНЕФРИТОМ С НЕФРОТИЧЕСКИМ СИНДРОМОМ

Кудряшов С.И.¹, Стенина М.А.², Карзакова Л.М.¹, Луткова Т.С.¹

¹ ФГБОУ ВО «Чувашский государственный университет имени И.Н. Ульянова», г. Чебоксары, Россия

² ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова», Москва, Россия

Резюме. Гломерулонефриты (ГН) — группа иммуновоспалительных заболеваний почек с преимущественным поражением клубочков, трудно поддающихся лечению. Наибольшие проблемы доставляет лечение ГН с нефротическим синдромом, который зачастую имеет рецидивирующее течение. Цель исследования — изучение эффективности включения рекомбинантного интерлейкина-2 (rIL-2) в комплекс лечения ГН с нефротическим синдромом. В исследование было отобрано 62 пациента с нефротической формой первичного ГН с частыми рецидивами, госпитализированных в нефрологическое отделение. Возраст больных — от 18 до 65 лет. Больным проводили стандартное обследование, а также иммунологические исследования до назначения противорецидивного лечения и через 12 месяцев от начала лечения: иммунофенотипирование лимфоцитов с идентификацией Т- и В-лимфоцитов, иммунорегуляторных и активированных субпопуляций Т-лимфоцитов, определение в моче уровней иммуноглобулинов IgM, IgG, IgA иммунотурбидиметрическим методом, провоспалительных цитокинов — IL-1 β , IL-8, IL-17A и противовоспалительного цитокина IL-10 методом иммуноферментного анализа. В результате проведенного исследования у обследованных больных установлено увеличение показателей содержания Т-хелперных, активированных Т-лимфоцитов (CD8⁺HLA-DR⁺CD45⁺, CD3⁺CD8^{bright}CD38⁺) на фоне уменьшения числа Treg-клеток и повышенное содержание в моче провоспалительных цитокинов IL-1 β , IL-8, IL-17A и иммуноглобулинов всех трех классов.

Когорта отобранных в исследование пациентов с ГН была разделена на две группы (основная группа и группа сравнения). Схема лечения больных основной группы включала помимо нефропротективной и стероидной терапии rIL-2, а группы сравнения — Циклофосфан. Независимо от применяемого способа в результате лечения снижались относительно исходных значений уровни белка, IgG и IL-17A в моче, уменьшалось содержание В-клеток и HLA-DR⁺-цитотоксических Т-лимфоцитов в крови. Отмеченные изменения были более выражены в основной группе больных и спустя 12 месяцев от начала лечения перечисленные показатели основной группы стали существенно различаться от таковых в группе сравнения. Сывороточный уровень креатинина, число Т-хелперных клеток и Treg-клеток, уровень IL-1 β в моче не претерпевали существенных изменений в группе сравнения, в то вре-

Адрес для переписки:

Кудряшов Сергей Игоревич
ФГБОУ ВО «Чувашский государственный университет
имени И.Н. Ульянова»
428015, Россия, г. Чебоксары, Московский пр., 15.
Тел.: 8 (917) 652-34-99.
E-mail: medicpro21@mail.ru

Address for correspondence:

Sergey I. Kudryashov
I. Ulianov Chuvash State University
15 Moskovsky Ave
Cheboksary
428015 Russian Federation
Phone: +7 (917) 652-34-99.
E-mail: medicpro21@mail.ru

Образец цитирования:

С.И. Кудряшов, М.А. Стенина, Л.М. Карзакова,
Т.С. Луткова «Новый подход к иммуносупрессивной
терапии у больных гломерулонефритом
с нефротическим синдромом» // Медицинская
иммунология, 2024. Т. 26, № 1. С. 181-190.
doi: 10.15789/1563-0625-ANA-2670

© Кудряшов С.И. и соавт., 2024
Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

S.I. Kudryashov, M.A. Stenina, L.M. Karzakova,
T.S. Lutkova "A new approach to immunosuppressive therapy
in patients with glomerulonephritis with nephrotic syndrome",
Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya,
2024, Vol. 26, no. 1, pp. 181-190.
doi: 10.15789/1563-0625-ANA-2670

© Kudryashov S.I. et al., 2024
The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License

DOI: 10.15789/1563-0625-ANA-2670

мя как в основной группе пациентов происходило снижение уровней креатинина в сыворотке крови и IL-1 β в моче, уменьшалось число Т-хелперов и увеличивалось число Treg-клеток. В основной группе больных, леченных rIL-2, среднее число рецидивов за год уменьшилось в 4 раза, в сравниваемой группе – лишь в 1,2 раза. Терапия низкими дозами rIL-2 может рассматриваться как эффективная и безопасная альтернатива традиционной иммуносупрессивной терапии и как новый вариант таргетного лечения ГН с частыми рецидивами нефротического синдрома.

Ключевые слова: иммуносупрессия, гломерулонефрит, рекомбинантный интерлейкин-2, нефротический синдром, Treg-клетки, лечение гломерулонефритов

A NEW APPROACH TO IMMUNOSUPPRESSIVE THERAPY IN PATIENTS WITH GLOMERULONEPHRITIS WITH NEPHROTIC SYNDROME

Kudryashov S.I.^a, Stenina M.A.^b, Karzakova L.M.^a, Lutkova T.S.^a

^a I. Ulianov Chuvash State University, Cheboksary, Russian Federation

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

Abstract. Glomerulonephritis (GN) is a group of immuno-inflammatory kidney diseases with predominant glomerular lesions that are difficult to treat. The greatest problems are caused by the treatment of GN with nephrotic syndrome, which often has a recurrent course. The aim of the research was to study the effectiveness of recombinant interleukin-2 (rIL-2) therapy in the GN patients with nephrotic syndrome.

62 patients with a nephrotic form of primary GN with frequent relapses admitted to the Nephrology Department have been recruited into the study. The age of patients was from 18 to 65 years. The patients underwent standard examinations, as well as immunological studies, before administration of the anti-relapse treatment, and 12 months after the treatment was started. Immunological testing included immunophenotyping of lymphocytes with counting of T and B lymphocytes, immunoregulatory and activated subpopulations of T lymphocytes, determination of urinary immunoglobulins (IgM, IgG, IgA) by immunoturbidimetric assays, proinflammatory cytokines – IL-1 β , IL-8, IL-17A and anti-inflammatory cytokine IL-10 by ELISA tests. As a result of studies, the examined patients showed an increased contents of T helper cells, activated T lymphocytes (CD8⁺HLA-DR⁺CD45⁺, CD3⁺CD8^{bright}CD38⁺) along with decreased numbers of Treg cells and an increased contents of proinflammatory cytokines IL-1 β , IL-8, IL-17A and immunoglobulins of all three classes in urinary samples.

The cohort of patients with GN selected for the study was divided in two groups (the main group and the comparison group). In addition to nephroprotective and steroid therapy, the treatment regimen of patients included rIL-2 in the main group, or cyclophosphamide in the comparison group. Regardless of the method used, the levels of protein, IgG and IL-17A in the urine proved to be decreased relative to the initial values; the contents of B cells and HLA-DR⁺ cytotoxic T lymphocytes in peripheral blood were found to be decreased. The revealed changes were more pronounced in the main group of patients. By 12 months after starting the treatment, the mentioned indexes began to differ significantly in the main group from those in the comparison group. Serum creatinine levels, numbers of T helper cells and Treg cells, IL-1 β levels in urine did not undergo significant changes in the comparison group, whereas a decrease in serum creatinine and urinary IL-1 β was registered in the main group of patients, along with decreased number of T helpers and increased numbers of Treg cells. In the main group of patients treated with rIL-2, the average number of relapses per year decreased by 4 times, showing only a 1.2-fold decrease in the comparison group. Hence, the low-dose therapy with rIL-2 may be considered an effective and safe alternative to conventional immunosuppressive therapy and a new option of the targeted treatment of glomerulonephritis with frequent recurrence of nephrotic syndrome.

Keywords: immunosuppression, glomerulonephritis, recombinant interleukin-2, nephrotic syndrome, Treg cells, treatment of glomerulonephritis

Введение

Гломерулонефриты (ГН) – группа иммуновоспалительных заболеваний почек с преимущественным поражением клубочков. ГН являются одной из распространенных причин развития хронического заболевания почек (ХБП), приводящей к терминальной стадии почечной недостаточности, требующей гемодиализа или трансплантации донорской почки. ГН поражают людей различных регионов мира и всех возрастов, обычно более распространены в молодой возрастной группе и трудно поддаются лечению [2]. Наибольшие проблемы доставляет лечение ГН с нефротическим синдромом, который зачастую имеет рецидивирующее течение. В качестве инициального способа лечения ГН с нефротическим синдромом независимо от морфологической формы заболевания используют стероидную терапию, при рецидивах назначают иммунодепрессанты (микофеноловая кислота, ингибиторы кальциневрина, алкилирующие соединения) и моноклональные антитела [7]. Нередко развивающаяся стероидорезистентность и множество агрессивных сопутствующих эффектов от применения иммунодепрессантов [7] требуют поиска новых подходов к лечению ГН, лишенных побочных эффектов. Известные к настоящему времени результаты исследований на животных позволяют считать основным механизмом развития ГН – нарушение соотношения субпопуляций Т-хелперов (Th), в частности Th17 и Т-регуляторных клеток (Treg-клеток) [1, 15]. Введение цитокина интерлейкин-2 (interleukin-2 – IL-2) мышам с экспериментально созданной моделью волчаночного нефрита приводило к увеличению числа Treg-клеток и уменьшению накопления в почечной ткани CD4⁺ Т-клеток [12]. Описаны первые успешные клинические испытания по использованию человеческого рекомбинантного IL-2 (rIL-2) в лечении пациентов с ревматическими заболеваниями [8]. Однако к настоящему времени не известно об использовании rIL-2 в лечении ГН.

Цель исследования – изучение эффективности включения человеческого rIL-2 в комплекс лечения ГН с нефротическим синдромом рецидивирующего течения.

Материалы и методы

В исследование было отобрано 62 больных ГН, госпитализированных в нефрологическое отделение БУ «Республиканская клиническая больница» Министерства здравоохранения Чувашской Республики в 2015-2022 гг. в связи с рецидивом ГН, а также 25 практически здоровых лиц (контрольная группа). ГН диагностировали, осно-

вываясь на данных клинических, лабораторных, лучевых и гистоморфологических исследований. Часто рецидивирующими считали ГН с нефротическим синдромом, рецидивирующим не менее 2 раз в течение 6 месяцев после адекватного инициального лечения заболевания [7]. Критериями включения служили: возраст от 18 до 65 лет, установление нефротической формы первичного ГН с частыми рецидивами. В качестве критериев исключения рассматривали: вторичный нефротический синдром, сопутствующие заболевания (сердечно-сосудистые, желудочно-кишечные, эндокринные), беременность, возраст старше 65 лет, почечную недостаточность (креатинин сыворотки крови выше 200 мкг/л, скорость клубочковой фильтрации – СКФ, определенная расчетным методом СКД-EPI (Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration), ниже 60 мл/мин). Медиана значений возраста отобранных в исследование пациентов составила 33 года, при этом межквартильный интервал равнялся 21-44 годам. Среди обследованных больных ГН число мужчин на 16% превышало число женщин. Среди различных морфологических форм ГН преобладала мембранозная нефропатия (у 69%), реже встречались нефропатия с минимальными изменениями (20%) и мезангиопролиферативный ГН (11%). Помимо общепринятого исследования больным проводили иммунологические исследования: идентификацию Т- и В-лимфоцитов, иммунорегуляторных и активированных субпопуляций Т-лимфоцитов методом иммунофенотипирования моноклеарных клеток периферической крови с помощью моноклональных антител (МКАТ), меченных двумя или тремя различными флюоресцирующими метками (реагенты и проточный цитофлуориметре Fc500 производства Beckman Coulter, США). При проведении данных тестов руководствовались методиками, предлагаемыми производителем реактивов. В моче определяли концентрации иммуноглобулинов IgM, IgG, IgA иммунотурбидиметрическим методом с использованием автоматического биохимического анализатора DxC 700 AU (Beckman Coulter, США), содержание провоспалительных цитокинов – IL-1 β , IL-8, IL-17A и противовоспалительного цитокина IL-10 методом иммуноферментного анализа с использованием стандартного набора реагентов (АО «Вектор-Бест», Россия) в соответствии с методикой производителя тест-набора на иммуноферментном анализаторе Infinite F-50 (Tecan, Швейцария). Описанные исследования проводили дважды – до назначения противорецидивного лечения и через 12 месяцев от начала лечения. Полученные показатели у больных ГН сравнивали с таковыми у здоровых лиц.

Когорта отобранных в исследование пациентов с ГН была разделена на две группы (основная группа и группа сравнения) в зависимости от применяемого способа лечения. Основная группа включала пациентов, которым назначали нефропротективную терапию (ингибиторы ангиотензинпревращающего фермента или антагонисты рецептора ангиотензина II в терапевтических дозах) и rIL-2 – Ронколейкин® (регистрационный номер ЛС-001810 от 27.07.2011, ООО «НПК «Биотех», Россия) в низкой дозе 8000–8300 МЕ/кг подкожно с интервалами в 7 дней ежеквартально в сочетании со стероидной терапией (в расчете на преднизолон 0,75–1 мг/кг в течение первых 28 дней, в последующем 1,5–2 мг через день с постепенным снижением дозы до достижения поддерживающей дозы 2,5 мг). Схема лечения группы сравнения отличалась тем, что вместо rIL-2 назначали цитостатик Циклофосфан в виде пульс-терапии по 15 мг/кг внутривенно через каждые 4 недели. Курс лечения в обеих группах больных длился 6–12 месяцев в зависимости от достижения полной ремиссии, критериями которой считали снижение суточной протеинурии ниже 0,35 г, нормализацию сывороточного уровня креатинина (ниже 116 мкмоль/л) или его снижение в пределах 50% от исходного значения [13].

Статистическую обработку результатов проводили с использованием программы Statistica версии 10 (США). Перед проведением статистического анализа определяли характер распределения полученных в ходе исследования значений показателей, с этой целью применяли метод Холмогорова–Смирнова. Совокупности значений большинства изучаемых показателей демонстрировали неправильный характер распределения, для проведения статистического анализа этих показателей использовали непараметрические методы. При этом полученные данные представляли в виде $Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})$, где Me – медиана, $Q_{0,25}-Q_{0,75}$ – межквартильный интервал частностей показателя. Различия значений показателей между группами исследования оценивали по U-критерию Манна–Уитни (p_{m-w}). Сравнение лабораторных показателей в динамике проводили по критерию Вилкоксона (p_w). Значения некоторых показателей имели правильный характер распределения, для их статистической обработки использовали параметрические методы: данные представляли в виде $M \pm SD$ (M – средняя арифметическая, SD – среднее квадратичное отклонение), различия значений показателей между группами исследования оценивали по критерию Стьюдента (p), динамику показателей до и после лечения – по парному критерию Стьюдента. Дихотомические показатели сравнивали друг с другом с помощью χ^2 -критерия (p_2).

Результаты и обсуждение

При анализе иммунологических показателей крови был выявлен ряд особенностей в Т-системе иммунитета у больных ГН, в частности повышение относительного значения содержания Т-лимфоцитов за счет Т-хелперных клеток, увеличение числа активированных Т-лимфоцитов, экспрессирующих антигены HLA-DR и уменьшение числа Treg-клеток (табл. 1). Что касается В-лимфоцитов, относительное значение их содержания не отличалось от значений здоровых, в то время как абсолютное значение было существенно увеличено.

В таблице 2 представлены показатели содержания иммуноглобулинов основных трех классов и исследуемых цитокинов, нормализованные по уровню креатинина в моче. Нормализация мочевых уровней данных биологических субстратов по креатинину проведена для нивелирования влияния на них экскреторной функции почек. Анализ представленных в таблице данных свидетельствует о повышении содержания в моче иммуноглобулинов и провоспалительных цитокинов у пациентов с ГН.

Таким образом, у больных ГН с нефротическим синдромом рецидивирующего течения увеличены показатели содержания Т-хелперных и активированных Т-лимфоцитов на фоне уменьшения числа Treg-клеток. Последние представляют собой подмножество $CD4^+$ Th-клеток, экспрессирующих фактор транскрипции forkhead box P3 (FoxP3), а также высокие уровни высокоаффинного рецептора IL-2 – IL-2R α (или CD25) [9]. Существуют две основные субпопуляции Treg-клеток в зависимости от места их происхождения. Натуральные Treg-клетки (nTreg-клетки), или тимические (tTreg-клетки), составляют 5–10% от всего числа периферических $CD4^+$ Th-клеток у здоровых людей, развиваются в тимусе путем распознавания собственных антигенов, представленных молекулами большого комплекса гистосовместимости класса II (MHCII) в процессе позитивной селекции. FoxP3 был идентифицирован как ключевой фактор транскрипции Treg-клеток, являющийся основным регуляторным геном для их развития. На периферии nTreg-клетки регулируют активацию эффекторных Т-клеток, распознающих собственные антигены. Они играют решающую роль в индукции толерантности к чужеродным антигенам – пищевым и бактериальным, в частности к антигенам бактерий-комменсалов. Индуцированные Treg-клетки (iTreg-клетки), или периферические Treg-клетки (pTreg-клетки) генерируются на периферии путем дифференцировки наивных $CD4^+$ FoxP3 $^-$ Т-клеток в $CD4^+$ FoxP3 $^+$ Treg-клетки во время антигенной стимуляции в присутствии

ТАБЛИЦА 1. ПОКАЗАТЕЛИ Т-СИСТЕМЫ ИММУНИТЕТА У БОЛЬНЫХ ГН С НЕФРОТИЧЕСКИМ СИНДРОМОМ, Me ($Q_{0,75}$ - $Q_{0,25}$)

TABLE 1. INDICATORS OF THE T SYSTEM OF IMMUNITY IN PATIENTS WITH GN WITH NEPHROTIC SYNDROME, Me ($Q_{0,75}$ - $Q_{0,25}$)

Показатель Indicator	Контрольная группа Control group n = 25	Больные ГН Patients with GN n = 62	p_{m-u}
В-лимфоциты (CD19⁺), × 10⁹/л B lymphocytes (CD19 ⁺), × 10 ⁹ /L	0,22 (0,12-0,42)	0,43 (0,15-0,72)	< 0,001
В-лимфоциты (CD19⁺), % B lymphocytes (CD19 ⁺), %	14,2 (5-24)	17 (9-25)	NS
Т-лимфоциты (CD3⁺CD19⁻), × 10⁹/л T lymphocytes (CD3 ⁺ CD19 ⁻), × 10 ⁹ /L	1,45 (0,80-2,20)	1,97 (1,62-2,16)	NS
Т-лимфоциты (CD3⁺CD19⁻), % T lymphocytes (CD3 ⁺ CD19 ⁻), %	69 (59-81)	76,33 (76,0-87,0)	< 0,05
Т-хелперы (CD3⁺CD4⁺CD45⁺), × 10⁹/л T helpers (CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD45 ⁺), × 10 ⁹ /L	0,76 (0,51-0,99)	1,39 (0,88-1,47)	< 0,001
Т-хелперы (CD3⁺CD4⁺CD45⁺), % T helpers (CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD45 ⁺), %	41 (32-50)	53,0 (48,02-56,00)	< 0,001
Цитотоксические Т-лимфоциты (CD3⁺CD8⁺CD45⁺), × 10⁹/л Cytotoxic T lymphocytes (CD3 ⁺ CD8 ⁺ CD45 ⁺), × 10 ⁹ /L	0,59 (0,29-0,88)	0,59 (0,47-0,68)	> 0,05
Цитотоксические Т-лимфоциты (CD3⁺CD8⁺CD45⁺), % Cytotoxic T lymphocytes (CD3 ⁺ CD8 ⁺ CD45 ⁺), %	24 (18-30)	26,0 (19,78-28,10)	> 0,05
Незрелые Т-лимфоциты (CD4⁺CD8⁺CD45⁺), % Immature T lymphocytes (CD4 ⁺ CD8 ⁺ CD45 ⁺), %	1 (0-2)	0,19 (0,14-0,31)	< 0,001
Иммунорегуляторный индекс (CD3⁺CD4⁺/CD3⁺CD8⁺) Immunoregulatory index (CD3 ⁺ CD4 ⁺ /CD3 ⁺ CD8 ⁺)	1,7 (1,2-2,3)	1,85 (1,66-2,90)	> 0,05
HLA-DR⁺ активированные Т-лимфоциты (CD3⁺HLA-DR⁺CD45⁺), × 10⁹/л HLA-DR ⁺ activated T lymphocytes (CD3 ⁺ HLA-DR ⁺ CD45 ⁺), × 10 ⁹ /L	0,17 (0,025-0,300)	0,25 (0,18-0,36)	< 0,05
HLA-DR⁺ активированные Т-лимфоциты (CD3⁺HLA-DR⁺CD45⁺), % HLA-DR ⁺ activated T lymphocytes (CD3 ⁺ HLA-DR ⁺ CD45 ⁺), %	5 (1,5-10,0)	10,50 (9,01-13,60)	< 0,001
CD25⁺ активированные Т-лимфоциты (CD3⁺CD25⁺CD45⁺), × 10⁹/л CD25 ⁺ activated T lymphocytes (CD3 ⁺ HLA-DR ⁺ CD45 ⁺), × 10 ⁹ /L	0,14 (0,055-0,300)	0,13 (0,10-0,19)	> 0,05
CD25⁺ активированные Т-лимфоциты (CD3⁺CD25⁺CD45⁺), % CD25 ⁺ activated T lymphocytes (CD3 ⁺ HLA-DR ⁺ CD45 ⁺), %	6,9 (4,0-12,0)	4,92 (4,38-5,88)	> 0,05
Трег-клетки (CD4⁺CD25^{bright}CD127^{neg}CD45⁺), % Treg cells (CD4 ⁺ CD25 ^{bright} CD127 ^{neg} CD45 ⁺), %	3,5 (2,1-5,5)	2,1 (1,63-3,53)	< 0,01
HLA-DR⁺ активированные цитотоксические Т-лимфоциты (CD8⁺HLA-DR⁺CD45⁺), × 10⁹/л HLA-DR ⁺ activated cytotoxic T lymphocytes (CD8 ⁺ HLA-DR ⁺ CD45 ⁺), × 10 ⁹ /L	0,045 (0,050-0,085)	0,14 (0,08-0,16)	< 0,001
HLA-DR⁺ активированные цитотоксические Т-лимфоциты (CD8⁺HLA-DR⁺CD45⁺), % HLA-DR ⁺ activated cytotoxic T lymphocytes (CD8 ⁺ HLA-DR ⁺ CD45 ⁺), %	1,9 (0,5-3,5)	4,22 (2,47-5,72)	< 0,001
Активированные цитотоксические Т-лимфоциты (CD3⁺CD8^{bright}CD38⁺), % Activated cytotoxic T lymphocytes (CD3 ⁺ CD8 ^{bright} CD38 ⁺), %	5 (0-8)	0,65 (0,52-0,89)	< 0,001

ТАБЛИЦА 2. СОДЕРЖАНИЕ ЦИТОКИНОВ И ИММУНОГЛОБУЛИНОВ В МОЧЕ У БОЛЬНЫХ ГН С НЕФРОТИЧЕСКИМ СИНДРОМОМ, Me (Q_{0,75}-Q_{0,25})

TABLE 2. CONTENT OF CYTOKINES AND IMMUNOGLOBULINS IN URINE IN PATIENTS WITH GN WITH NEPHROTIC SYNDROME, Me (Q_{0,75}-Q_{0,25})

Показатель, пг/мкмоль креатинина мочи Indicator, pg/ μ m ol of urine creatinine	Контрольная группа Control group n = 25	Больные ГН Patients with GN n = 62	P _{m-u}
IgA	0,002 (0,000-0,012)	0,187 (0,000-0,378)	< 0,01
IgM	0	0	
IgG	0,070 (0,000-0,352)	1,316 (0,095-2,400)	< 0,001
IL-1 β	0,00 (0,00-0,01)	1,18 (0,01-20,19)	< 0,001
IL-8	0,02 (0,00-3,66)	6,76 (1,72-34,04)	< 0,001
IL-10	0,27 (0,15-0,57)	0,31 (0,21-0,37)	> 0,05
IL-17A	4,55 (2,50-11,57)	8,84 (7,12-12,50)	< 0,05

IL-2 и трансформирующего фактора роста- β (TGF- β) [10]. CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺Treg-клетки поддерживают иммунный гомеостаз и предотвращают аутоиммунные и хронические воспалительные заболевания [9]. Показано, что инфильтрация опухолей Treg-клетками способствует прогрессированию опухолевого роста за счет подавления противоопухолевых иммунных реакций [5].

Изучение экспрессии различных антигенов на цитотоксических Т-лимфоцитах у пациентов с нефротическим ГН выявило повышенную экспрессию на клетках данной субпопуляции Т-лимфоцитов активационных антигенов – HLA-DR и CD38. Известно, что HLA-DR является одним из основных антигенов МНСII человека, степень его экспрессии на поверхности Т-клеток увеличивается на поздних стадиях активации клеток. Т-клетки, несущие маркер CD38, являются активированными, пролиферирующими и цитотоксическими транспортными клетками [3]. Известны результаты изучения роли различных субпопуляций Т-клеток в патогенезе ГН в экспериментальных исследованиях на лабораторных животных. При этом множество исследований было проведено на мышинной модели быстро прогрессирующего ГН с образованием полулуний, создаваемой путем введения в организм мышей антител против антигенов базальной мембраны клубочков. Модель ГН, созданная таким образом, по своей природе является нефротоксическим аутоиммунным ГН. При этом аутоиммунный процесс развивается за счет реализации клеточных реакций Th1- и Th17-клетками [1, 15]. Эксперименты по адоптивному переносу CD4⁺CD25⁺ регуляторных Т-клеток были первыми, продемонстрировавшими защитную роль Treg-клеток в модели нефротоксического аутоиммунного ГН. Так, перенос данных клеток снижал

степень протеинурии, образование полулуний в клубочках почек, накопление Т-клеток, макрофагов в почках и вызывал ослабление иммунного ответа Th1-клеток [14]. Стабильность Treg-клеток регулируется определенными поверхностными молекулами, цитокинами и другими факторами микроокружения. Значительно влияние на стабильность Treg-клеток местного цитокинового окружения. В соответствии с результатами исследований Nie H. и соавторов, IL-2 и индуцированное им фосфорилирование транскрипционного фактора STAT5 обеспечивали стабильность и пролиферацию Treg-клеток, в то время как другой цитокин – TNF α снижал фосфорилирование FoxP3 и тем самым дестабилизировал Treg-клетки [6]. Treg-зависимые механизмы иммуносупрессии широко изучались на описанной выше модели нефротоксического аутоиммунного ГН. Представлены доказательства того, что Treg-клетки продуцируют противовоспалительные цитокины – IL-10, TGF- β , ингибирующие иммунный ответ Th1- и Th17-клеток [1, 9]. Известно, что CD19⁺ В-клетки у мышей с нефротоксическим аутоиммунным ГН также продуцируют IL-10. Однако в процессе создания экспериментального вторичного, волчаночного ГН, было показано, что В-клетки, продуцирующие IL-10, не способны предотвратить развитие волчаночного нефрита у мышей [11]. Следовательно, IL-10, продуцируемый В-клетками, не обладает иммуносупрессивной функцией при ГН.

Итак, иммунный профиль пациентов с нефротическим вариантом ГН с частыми рецидивами нефротического синдрома отличается наличием дисбаланса иммунорегуляторных субпопуляций Т-лимфоцитов – увеличением числа Т-хелперных и активированных клеток на фоне уменьшения Treg-клеток, а также повышенным

содержанием в моче провоспалительных цитокинов и иммуноглобулинов.

С целью исследования взаимосвязи между иммунологическими факторами и патологическими показателями, происходящими в почках при ГН, был проведен корреляционный анализ между отличающимися от референтных значений иммунологическими показателями и общелабораторными показателями крови и мочи, в той или иной степени характеризующими выраженность нефротического синдрома и повреждение почек. Наиболее тесными были положительные корреляционные связи абсолютного содержания Т-хелперов с числом лейкоцитов в моче ($r_s = 0,62$, $p = 0,001$); относительного значения содержания HLA-DR⁺ активированных цитотоксических Т-лимфоцитов с числом палочкоядерных нейтрофилов ($r_s = 0,71$, $p = 0,001$) и уровнем белка в моче ($r_s = 0,68$, $p = 0,001$); нормализованного уровня IL-1 β с сывороточными уровнями α_1 -глобулинов ($r_s = 0,90$, $p = 0,001$), мочевины ($r_s = 0,84$, $p = 0,001$), креатинина ($r_s = 0,73$, $p = 0,001$), числом гиалиновых цилиндров в моче ($r_s = 0,74$, $p = 0,001$); нормализованного уровня IL-17A с сывороточным уровнем мочевины ($r_s = 0,98$, $p = 0,001$). Таким образом, представленные данные позволяют заключить, что число Т-хелперных клеток, активированных Т-клеток, нормализованные уровни IgG, провоспалительных цитокинов IL-1 β и IL-17A положительно связаны с маркерами повреждения почек и нефротического синдрома (протеинурия, лейкоцитурия, увеличение гиалиновых цилиндров в моче, повышение в крови содержания α_2 -глобулинов, креатинина, мочевины и палочкоядерных нейтрофилов). Лишь один иммунологический показатель (число Трег-клеток) влиял отрицательно на маркеры воспаления и повреждения почек – сывороточные уровни α_2 -глобулинов ($r_s = -0,46$, $p = 0,024$), β -глобулинов ($r_s = -0,52$, $p = 0,012$), протеинурию ($r_s = -0,69$, $p = 0,001$). При этом число Трег-клеток проявляло прямую связь с уровнями общего белка ($r_s = 0,47$, $p = 0,023$) и γ -глобулинов ($r_s = 0,50$, $p = 0,022$) в сыворотке крови. В ранее проведенных экспериментальных исследованиях было продемонстрировано, что количество Трег-клеток снижается у пациентов с волчаночным нефритом из-за нарушения опосредованной Т-клетками продукции IL-2. Введение IL-2 мышам способствовало пролиферации Трег-клеток, снижало выраженность протеинурии и улучшало выживаемость мышей [12]. Благодаря способности стимулировать пролиферацию Т-клеток *in vitro* IL-2 первоначально считался одним из факторов индукции провоспалительных реакций против инвазивных патогенов и опухолей и поэтому вводился в высоких дозах для лечения зло-

качественных и инфекционно-воспалительных заболеваний. Позже было показано, что IL-2 необходим для дифференцировки Трег-клеток в тимусе, а также последующего их воспроизводства и выживания в периферических лимфоидных органах [12]. Трег-клетки более чувствительны к IL-2, и для их стимуляции требуются гораздо меньшие дозы IL-2, нежели для цитотоксических Т-лимфоцитов и НК-клеток, участвующих в противоопухолевом иммунном ответе. Этот факт объясняется тем, что Трег-клетки конститутивно экспрессируют высокие уровни высокоаффинного рецептора IL-2R α . Перспективность использования rIL-2 – Алдеслейкина (Novartis A.S, Швейцария) с противовоспалительной целью была продемонстрирована в многоцентровом исследовании, включавшем 46 пациентов с 11 различными аутоиммунными заболеваниями [8]. В связи с заинтересованностью в изучении возможности применения rIL-2 в лечении пациентов с ГН наше внимание привлекли исследования Li Y. и соавторов, обнаруживших, что IL-2 в низких дозах способен повышать *in vitro* число Трег-клеток у больных хроническим ГН [4].

Нами было предпринято изучение эффективности включения rIL-2 в комплекс лечебных мероприятий у пациентов с нефротическим ГН рецидивирующего течения. При этом исследуемая когорта больных была разделена на основную группу и группу сравнения, для лечения больных основной группы включали дополнительно к нефропротективной и стероидной терапии rIL-2, а группы сравнения – Циклофосфан. Анализ показателей, характеризующих данные группы больных, свидетельствовал об отсутствии различий в составе групп по демографическим показателям (возраст пациентов основной группы 35 \pm 9 лет, группы сравнения 32 \pm 8 лет, $p > 0,05$; число мужчин в основной группе – 17, в группе сравнения – 18, $p_2 > 0,05$), продолжительности заболевания пациентов ГН (39 \pm 10 и 41 \pm 9 месяцев в основной группе и группе сравнения соответственно, $p > 0,05$), числу рецидивов за год (3,6 \pm 1,3 и 3,6 \pm 1,1 в основной группе и группе сравнения соответственно, $p > 0,05$), а также представленности различных морфологических форм заболевания (наиболее часто встречающаяся форма – мембранозная нефропатия обнаруживалась у 23 пациентов основной группы и 21 пациента группы сравнения, $p_2 > 0,05$).

Особый интерес представляет сравнение динамики показателей, характеризующих функции и/или повреждение почек и коррелирующих с ними иммунологических показателей, в процессе проведения противорецидивного лечения. Независимо от применяемого способа в результате лечения снижались относительно исходных значений уровни белка, IgG и IL-17A в моче, умень-

ТАБЛИЦА 3. ВЛИЯНИЕ ПРОТИВОРЕЦИДИВНОГО ЛЕЧЕНИЯ НА КЛИНИКО-ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ БОЛЬНЫХ ГН С НЕФРОТИЧЕСКИМ СИНДРОМОМ

TABLE 3. EFFECT OF ANTI-RELAPSE TREATMENT ON THE CLINICAL AND IMMUNOLOGICAL PARAMETERS OF PATIENTS WITH GN WITH NEPHROTIC SYNDROME

Показатели Indicator		Преднизолон + Циклофосфан Prednisone+ cyclophosphane n = 32		Преднизолон + rIL-2 Prednisone + rIL-2 n = 30		3-5
		До лечения Before treatment	Через 12 месяцев от начала лечения 12 months after the start of treatment	До лечения Before treatment	Через 12 месяцев от начала лечения 12 months after the start of treatment	
1		2	3	4	5	3-5
Протеинурия, г/сутки Proteinuria, g/day	Me (Q _{0,75} -Q _{0,25}) Me (Q _{0,75} -Q _{0,25})	5,3 3,4-7,1	0,9* 0,5-1,4	5,5 3,3-7,2	0,03* 0,02-0,04	p _{m-w} < 0,001
Уровень общего белка в сыворотке крови, г/л The level of total protein in blood serum, g/L	Me (Q _{0,75} -Q _{0,25}) Me (Q _{0,75} -Q _{0,25})	57,2 36-59	60,1* 39-73	53,3 35-71	68,2* 45-79	p _{m-w} > 0,05
Уровень альбумина в сыворотке крови, г/л Serum albumin level, g/L	Me (Q _{0,75} -Q _{0,25}) Me (Q _{0,75} -Q _{0,25})	21,3 14-29	31,2* 24-39	23,2 15-24	41,2* 34-53	p _{m-w} < 0,001
Креатинин в сыворотке крови, мкмоль/л Serum creatinine, μmol/L	Me (Q _{0,75} -Q _{0,25}) Me (Q _{0,75} -Q _{0,25})	91,4 68-117	105,2 71-129	88,8 62-117	81,3* 60-93	p _{m-w} < 0,001
СКФ, мл/мин GFR, mL/min	Me (Q _{0,75} -Q _{0,25}) Me (Q _{0,75} -Q _{0,25})	72 64-108	78 53-103	73 57-110	94* 71-115	p _{m-w} < 0,001
В-лимфоциты (CD19 ⁺), × 10 ⁹ /л B lymphocytes (CD19 ⁺), × 10 ⁹ /L	Me (Q _{0,75} -Q _{0,25}) Me (Q _{0,75} -Q _{0,25})	0,43 0,13-0,70	0,37* 0,12-0,50	0,44 0,15-0,80	0,31* 0,12-0,41	p _{m-w} < 0,001
Т-хелперы (CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD45 ⁺), × 10 ⁹ /л T helpers (CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD45 ⁺), × 10 ⁹ /L	Me (Q _{0,75} -Q _{0,25}) Me (Q _{0,75} -Q _{0,25})	1,4 0,9-1,5	1,2 0,7-1,4	1,3 0,9-1,6	0,9* 0,5-1,0	p _{m-w} < 0,001
HLA-DR ⁺ активированные цитотоксические Т-лимфоциты (CD8 ⁺ HLA-DR ⁺ CD45 ⁺), % HLA-DR ⁺ activated cytotoxic T lymphocytes (CD8 ⁺ HLA-DR ⁺ CD45 ⁺), %	Me (Q _{0,75} -Q _{0,25}) Me (Q _{0,75} -Q _{0,25})	4,2 2,3-5,7	3,2* 0,9-4,3	4,3 2,6-5,5	2,3* 0,7-3,4	p _{m-w} < 0,05
Трег-клетки (CD4 ⁺ CD25 ^{bright} CD127 ^{neg} CD45 ⁺), % Treg cells (CD4 ⁺ CD25 ^{bright} CD127 ^{neg} CD45 ⁺), %	Me (Q _{0,75} -Q _{0,25}) Me (Q _{0,75} -Q _{0,25})	2,2 1,7-3,5	2,4 1,8-3,5	2,0 1,6-3,5	2,9* 2,2-4,7	p _{m-w} < 0,001
IgG в моче, пг/мкмоль креатинина мочи IgG in urine, pg/μmol of urine creatinine	Me (Q _{0,75} -Q _{0,25}) Me (Q _{0,75} -Q _{0,25})	1,4 0,1-1,8	0,3* 0,2-0,4	1,3 0,1-1,7	0,08* 0,04-0,12	p _{m-w} < 0,001
IL-1β в моче, пг/мкмоль креатинина мочи IL-1β in urine, pg/μmol of urine creatinine	Me (Q _{0,75} -Q _{0,25}) Me (Q _{0,75} -Q _{0,25})	1,2 0,05-19,00	0,9 0,05-14,00	1,1 0,05-20,00	0,2* 0,01-0,40	p _{m-w} < 0,001
IL-17A в моче, пг/мкмоль креатинина мочи IL-17A in urine, pg/μmol of urine creatinine	Me (Q _{0,75} -Q _{0,25}) Me (Q _{0,75} -Q _{0,25})	8,9 7,8-11,2	6,3* 4,8-8,3	8,7 8,5-13,1	4,8* 3,1-6,2	p _{m-w} < 0,001
Число рецидивов за 12 месяцев Number of relapses in 12 months	M±SD	3,6±1,1	3,0±0,9**	3,6±1,3	0,90±0,25**	p < 0,001

Примечание. * – статистически значимое изменение показателя относительно исходного значения по критерию Вилкоксона (p_w < 0,05), ** – статистически значимое изменение показателя относительно исходного значения по парному критерию Стьюдента (p < 0,05).

Note. *, statistically significant change in the indicator relative to the initial value according to the Wilcoxon criterion (p_w < 0.05); **, statistically significant change in the indicator relative to the initial value according to the Student's paired criterion (p < 0.05).

шалось содержание В-клеток и HLA-DR⁺ цитотоксических Т-лимфоцитов в крови, наряду с этим повышалось содержание общего белка в сыворотке крови за счет уровня альбумина (табл. 3). Отмеченные изменения были более выражены в основной группе больных, в лечении которых использовали гIL-2 в сочетании с преднизолоном, и спустя 12 месяцев от начала лечения перечисленные показатели основной группы стали существенно различаться от таковых в группе сравнения. Другие показатели (сывороточный уровень креатинина, СКФ, число Т-хелперных клеток и Treg-клеток, уровень IL-1β в моче) не претерпевали существенных изменений в группе сравнения, получавших преднизолон в сочетании с Циклофосфаном, в то время как в основной группе пациентов происходило снижение уровней креатинина в сыворотке крови и IL-1β в моче, повышалась СКФ, уменьшалось число Т-хелперов и увеличивалось число Treg-клеток. Спустя 12 месяцев от начала лечения последние два показателя переставали отличаться от значений контрольной группы. В обеих группах больных уменьшалось число рецидивов. Однако сопоставление выраженности уменьшения числа рецидивов было в пользу основной группы. Так, если в группе больных, леченных гIL-2, среднее число рецидивов за год уменьшилось в среднем в 4 раза, то в сравниваемой группе лишь в 1,2 раза.

Основываясь на перечисленных особенностях динамики клинико-лабораторных показателей в изучаемых группах больных, отличающихся способами лечения, можно отметить, что использование гIL-2 в сочетании со стероидным препаратом — преднизолоном позволяет добиться нормализации баланса иммунорегуляторных клеток за счет увеличения исходно уменьшен-

ного числа Treg-клеток и снижения показателя исходно повышенного содержания Т-хелперных клеток. Следствием этого является прекращение прогрессирования ГН, купирование его рецидива и установление ремиссии заболевания. Treg-клетки обладают противовоспалительным действием, сдерживают активность эффекторных клеток (Teff), принадлежащих к субпопуляции Т-хелперных клеток — Th17, продуцирующих IL-17, а также Th1-клеток, продуцирующих, как известно, IFNγ [1, 9, 15]. Что касается побочных реакций, гиперемия и инфильтрация, появившиеся в области подкожной инъекции гIL-2 у 50% пациентов, не могут считаться серьезными реакциями, поскольку они исчезали самопроизвольно без медицинских вмешательств. Таким образом, терапия низкими дозами гIL-2 может рассматриваться как эффективная и безопасная альтернатива традиционной иммуносупрессивной терапии и как новый вариант таргетного лечения ГН с частыми рецидивами нефротического синдрома.

Выводы

1. Предложенный нами способ иммуносупрессивной терапии (сочетание гIL-2 с преднизолоном), используемой в противорецидивном лечении ГН с нефротическим синдромом с частыми рецидивами, позволяет добиться уменьшения числа рецидивов нефротического синдрома.

2. Клиническая эффективность предложенного способа лечения связана с нормализацией иммунорегуляции — увеличения до референтного уровня числа Treg-клеток и уменьшения Т-хелперных клеток.

Список литературы / References

1. Diefenhardt P, Nosko A., Kluger M.A., Richter J.V., Wegscheid C., Kobayashi Y., Tiegs G., Huber S., Flavell R.A., Stahl R.A.K., Steinmetz O.M. IL-10 Receptor signaling empowers regulatory T cells to control Th17 responses and protect from GN. *J. Am. Soc. Nephrol.*, 2018, Vol. 29, no. 7, pp. 1825-1837.
2. Floege J., Amann K. Primary glomerulonephritides. *Lancet*, 2016, Vol. 387, no. 10032, pp. 2036-2048.
3. Khandelwal P., Chaturvedi V., Owsley E., Lane A., Heyenbruch D., Lutzko C.M., Leemhuis T., Grimley M.S., Nelson A.S., Davies S.M., Jordan M.B., Marsh R.A. CD38^{bright}CD8⁺ T Cells associated with the development of acute GVHD are activated, proliferating, and cytotoxic trafficking cells. *Biol. Blood Marrow Transplant.*, 2020, Vol. 26, no. 1, pp. 1-6.
4. Li Y., Liu X., Wang W., Wang S., Zhang J., Jiang S., Wang Y., Li L., Li J., Zhang Y., Huang H. Low-dose IL-2 expands CD4⁺ regulatory T cells with a suppressive function in vitro via the STAT5-dependent pathway in patients with chronic kidney diseases. *Ren. Fail.*, 2018, Vol. 40, no. 1, pp. 280-288.
5. Marangoni F., Zhakyp A., Corsini M., Geels S.N., Carrizosa E., Thelen M., Mani V., Prüßmann J.N., Warner R.D., Ozga A.J., di Pilato M., Othy S., Mempel T.R. Expansion of tumor-associated Treg cells upon disruption of a CTLA-4-dependent feedback loop. *Cell*, 2021, Vol. 184, no. 15, pp. 3998-4015.e19.
6. Nie H., Zheng Y., Li R., Guo T.B., He D., Fang L., Liu X., Xiao L., Chen X., Wan B., Chin Y.E., Zhang J.Z. Phosphorylation of FOXP3 controls regulatory T cell function and is inhibited by TNF-α in rheumatoid arthritis. *Nat. Med.*, 2013, Vol. 19, pp. 322-328.

7. Peh C.A. Commentary on the KDIGO clinical practice guideline for glomerulonephritis. *Nephrology (Carlton)*, 2013, Vol. 18, no. 7, pp. 483-484.
8. Rosenzweig M., Lorenzon R., Cacoub P., Pham H.P., Pitoiset F., El Soufi K., Ribet C., Bernard C., Aractingi S., Banneville B., Beaugerie L., Berenbaum F., Champey J., Chazouilleres O., Corpechot C., Fautrel B., Mekinian A., Regnier E., Saadoun D., Salem J.E., Sellam J., Seksik P., Dagueneil-Nguyen A., Doppler V., Mariau J., Vicaut E., Klatzmann D. Immunological and clinical effects of low-dose interleukin-2 across 11 autoimmune diseases in a single, open clinical trial. *Ann. Rheum. Dis.*, 2019, Vol. 78, no. 2, pp. 209-217.
9. Sakaguchi S., Yamaguchi T., Nomura T., Ono M. Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell*, 2008, Vol. 133, pp. 775-787.
10. Schmidt A., Éliás S., Joshi R.N., Tegnér J. *In vitro* differentiation of human CD4⁺FOXP3⁺ induced regulatory T cells (iTregs) from naïve CD4⁺ T cells using a TGF-β-containing protocol. *J. Vis. Exp.*, 2016, Vol. 118, 55015. doi: 10.3791/55015.
11. Teichmann L.L., Kashgarian M., Weaver C.T., Roers A., Müller W., Shlomchik M.J. B cell-derived IL-10 does not regulate spontaneous systemic autoimmunity in MRL.Fas lpr mice. *J. Immunol.*, 2012, Vol. 188, pp. 678-685.
12. Tran G.T., Hodgkinson S.J., Carter N., Verma N.D., Robinson C.M., Plain K.M., Nomura M., Hall B.M. Autoantigen specific IL-2 activated CD4⁺CD25⁺T regulatory cells inhibit induction of experimental autoimmune neuritis. *J. Neuroimmunol.*, 2020, Vol. 15, no. 341, 577186. doi: 10.1016/j.jneuroim.2020.577186.
13. von Groote T.C., Williams G., Au E.H., Chen Y., Mathew A.T., Hodson E.M., Tunnicliffe D.J. Immunosuppressive treatment for primary membranous nephropathy in adults with nephrotic syndrome. *Cochrane Database Syst. Rev.*, 2021, Vol. 11, no. 11, CD004293. doi: 10.1002/14651858.CD004293.pub4.
14. Wolf D., Hohegger K., Wolf A.M., Rumpold H.F., Gastl G., Tilg H., Mayer G., Gunsilius E., Rosenkranz A.R. CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells inhibit experimental anti-glomerular basement membrane glomerulonephritis in mice. *J. Am. Soc. Nephrol.*, 2005, Vol. 16, pp. 1360-1370.
15. Yang C., Huang X.-R., Fung E., Liu H.-F., Lan H.-Y. The Regulatory T-cell Transcription Factor Foxp3 Protects against Crescentic Glomerulonephritis. *Sci. Rep.*, 2017, Vol. 7, 1481. doi: 10.1038/s41598-017-01515-8.

Авторы:

Кудряшов С.И. — к.м.н., доцент кафедры внутренних болезней с курсом клинической иммунологии ФГБОУ ВО «Чувацкий государственный университет имени И.Н. Ульянова», г. Чебоксары, Россия

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

Карзакова Л.М. — д.м.н., профессор, заведующий кафедрой внутренних болезней с курсом клинической иммунологии ФГБОУ ВО «Чувацкий государственный университет имени И.Н. Ульянова», г. Чебоксары, Россия

Луткова Т.С. — к.м.н., доцент кафедры внутренних болезней с курсом клинической иммунологии ФГБОУ ВО «Чувацкий государственный университет имени И.Н. Ульянова», г. Чебоксары, Россия

Authors:

Kudryashov S.I., PhD (Medicine), Associate Professor, Department of Internal Diseases with the Course of Clinical Immunology, I. Ulianov Chuvash State University, Cheboksary, Russian Federation

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

Karzakova L.M., PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Department of Internal Diseases with the Course of Clinical Immunology, I. Ulianov Chuvash State University, Cheboksary, Russian Federation

Lutkova T.S., PhD (Medicine), Associate Professor, Department of Internal Diseases with the Course of Clinical Immunology, I. Ulianov Chuvash State University, Cheboksary, Russian Federation

Поступила 21.03.2023

Отправлена на доработку 28.03.2023

Принята к печати 07.05.2023

Received 21.03.2023

Revision received 28.03.2023

Accepted 07.05.2023

ФОРМИРОВАНИЕ В-КЛЕТОЧНОГО ОТВЕТА ПРИ ИММУНИЗАЦИИ ИНАКТИВИРОВАННЫМИ ГРИППОЗНЫМИ ВАКЦИНАМИ «ГРИППОЛ ПЛЮС», «СОВИГРИПП» И «УЛЬТРИКС»

**Шурыгина А.-П.С., Васильев К.А., Варюшина Е.А., Ладыгина М.Д.,
Зубкова Т.Г., Бузицкая Ж.В., Стукова М.А., Лиознов Д.А.**

*ФГБУ «Научно-исследовательский институт гриппа имени А.А. Смородинцева» Министерства
здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия*

Резюме. Во всем мире циркулирующие вирусы гриппа ежегодно приводят к серьезным медицинским и социально-экономическим последствиям. Вакцинация является наиболее эффективной и безопасной стратегией предотвращения гриппа и его осложнений. В целях снижения побочных эффектов при использовании живых вирусов широкое применение находят расщепленные и субъединичные гриппозные вакцины. Особенности формирования В-клеточного ответа на фоне иммунизации гриппозными вакцинами до настоящего времени остаются недостаточно изученными. В связи с этим, целью нашего исследования является изучение динамики субпопуляционного состава В-лимфоцитов периферической крови при иммунизации различными типами вакцин «Гриппол плюс», «Совигрипп» и «Ультрикс». Исследование проведено на базе клинического отделения ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева» Минздрава России в эпидемический по гриппу сезон 2018-2019 гг. Образцы венозной крови были получены у 39 добровольцев до вакцинации, на 7-е и 21-е сутки после вакцинации. Субпопуляционный состав В-лимфоцитов оценивали методом проточной цитометрии с применением панели флюоресцентно-меченных антител к CD3, CD19, CD20, CD27, CD38, IgD, IgA (BioLegend, США). Для анализа использовали образцы криоконсервированных мононуклеаров с концентрацией 1×10^6 клеток/образец. Обработку результатов проводили с помощью штатного программного обеспечения (H., Cytexpert, Beckman Coulter, Inc., США) и дополнительного ПО Kaluza 2.0 software (Beckman Coulter, Inc., США). При статистическом анализе различия с данными до вакцинации оценивали с использованием U-теста Манна–Уитни и считали достоверными при $p < 0,05$.

В результате проведенных исследований были выявлены следующие популяции В-лимфоцитов (CD3⁺CD19⁺): наивные В-клетки (CD20⁺CD27⁻IgD⁺), непереключенные В-клетки памяти

Адрес для переписки:

*Варюшина Елена Анатольевна
ФГБУ «Научно-исследовательский институт гриппа
имени А.А. Смородинцева» Министерства
здравоохранения РФ
197376, Россия, Санкт-Петербург, ул. Профессора
Попова, 15/17.
Тел.: 8 (906) 244-95-19.
E-mail: elenavaryush@gmail.com,
elena.varyushina@influenza.spb.ru*

Address for correspondence:

*Elena A. Varyushina
A. Smorodintsev Research Institute of Influenza
15/17 Prof. Popov St
St. Petersburg
197376 Russian Federation
Phone: +7 (906) 244-95-19.
E-mail: elenavaryush@gmail.com,
elena.varyushina@influenza.spb.ru*

Образец цитирования:

*А.-П.С. Шурыгина, К.А. Васильев, Е.А. Варюшина,
М.Д. Ладыгина, Т.Г. Зубкова, Ж.В. Бузицкая,
М.А. Стукова, Д.А. Лиознов «Формирование
В-клеточного ответа при иммунизации
инактивированными гриппозными вакцинами “Гриппол
плюс”, “Совигрипп” и “Ультрикс” // Медицинская
иммунология, 2024. Т. 26, № 1. С. 191-202.
doi: 10.15789/1563-0625-DOB-2609*

*© Шурыгина А.-П.С. и соавт., 2023
Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0*

For citation:

*A.-P.S. Shurygina, K.A. Vasiliev, E.A. Varyushina,
M.D. Ladygina, T.G. Zubkova, Zh.V. Buzitskaya,
M.A. Stukova, D.A. Lioznov “Development of B cell response
during immunization with inactivated influenza vaccines
‘Grippol Plus’, ‘Sovigripp’ and ‘Ultrix’”, Medical Immunology
(Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2024, Vol. 26, no. 1,
pp. 191-202. doi: 10.15789/1563-0625-DOB-2609*

*© Shurygina A.-P.S. et al., 2023
The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License
DOI: 10.15789/1563-0625-DOB-2609*

(CD20⁺CD27⁺IgD⁺), переключенные В-клетки памяти (CD20⁺CD27⁺IgD⁻), эффекторные В-клетки памяти (CD20⁺CD27⁻IgD⁻), плазмобласты (CD20⁻CD38^{hi}CD27^{hi}). Активацию В-клеточного иммунного ответа оценивали путем измерения относительного содержания CD38⁺В-клеток, относящихся к популяциям наивных, эффекторных В-лимфоцитов, переключенных и непереключенных В-клеток памяти. При анализе В-клеточного ответа после иммунизации исследуемыми вакцинами было выявлено увеличение как общего числа В-лимфоцитов, так и отдельных популяций, в том числе плазмобластов и активированных переключенных В-клеток памяти. Для адьювантных вакцин «Гриппол плюс» и «Совигрипп» по сравнению с расщепленной вакциной «Ультрикс» было показано раннее увеличение относительного количества плазмобластов на 7-й день исследования. При этом все три вакцины в одинаковой мере способствовали повышению числа активированных В-клеток памяти с переключенным изотипом антител. Таким образом, оценка В-клеточного ответа выявила значительные изменения в субпопуляционном составе В-лимфоцитов периферической крови в ответ на вакцинацию «Гриппол плюс», «Совигрипп» или «Ультрикс».

Ключевые слова: противогриппозные вакцины, В-лимфоциты, проточная цитометрия, плазмобласты, В-клетки памяти, вирус гриппа

DEVELOPMENT OF B CELL RESPONSE DURING IMMUNIZATION WITH INACTIVATED INFLUENZA VACCINES “GRIPPOL PLUS”, “SOVIGRIPP” AND “ULTRIX”

Shurygina A.-P.S., Vasiliev K.A., Varyushina E.A., Ladygina M.D., Zubkova T.G., Buzitskaya Zh.V., Stukova M.A., Lioznov D.A.

A. Smorodintsev Research Institute of Influenza, St. Petersburg, Russian Federation

Abstract. The worldwide circulating influenza viruses annually lead to serious medical and socio-economic consequences. It is generally recognized that vaccination is the most effective and safe strategy for preventing influenza and its complications. In order to reduce side effects when using live viruses, split and subunit influenza vaccines are widely used. To date, the characteristics of B cell response after immunization with influenza vaccines remain insufficiently studied. The aim of our study was to compare the effects of immunization with different influenza vaccines, i.e., “Sovigripp”, “Grippol plus” and “Ultrix”, on the B cell response. The study was conducted on the base of Clinical Department at the A.Smorodintsev Influenza Research Institute during the epidemic flu season of 2018-2019. For clinical studies, venous blood samples were obtained from 39 volunteers before vaccination, on the 7th and 21st days after vaccination. The subpopulations of B cells were analyzed by flow cytometry using fluorescently labeled antibodies to CD3, CD19, CD20, CD27, CD38, IgD, IgA surface antigens (BioLegend, USA). Cryopreserved mononuclear cells (1 × 10⁶ cells/sample) were used for analysis. The processing of flow cytometry data was carried out with special software (H., Cytexpert, Beckman Coulter, Inc., USA) and Kaluza 2.0 (Beckman Coulter, Inc., USA). The differences with pre-vaccination data were evaluated using the Mann–Whitney U-test and being considered significant at p < 0.05.

As a result of the studies, the following subpopulations of B lymphocytes (CD3⁻CD19⁺) were specified: naive B cells (CD20⁺CD27⁻IgD⁺), non-switched memory B cells (CD20⁺CD27⁺IgD⁺), switched memory B cells (CD20⁺CD27⁺IgD⁻), effector memory B cells (CD20⁺CD27⁻IgD⁻), plasmablasts (CD20⁻CD38^{hi}CD27^{hi}). Activation of the B cell immune response was assessed by measuring the relative content of CD38⁺B cells belonging to subpopulations of naive, effector B lymphocytes, switched and non-switched memory B cells. The analysis of B cell response showed an increase in both the total number of B lymphocytes and their subpopulations including plasmablasts and activated switched memory B cells after immunization. With adjuvant vaccines “Grippol plus” and “Sovigripp”, as compared with the split “Ultrix” vaccine, an early increase in relative counts of plasmablasts was shown on the 7th day of the study. At the same time, all three vaccines equally contributed to an increase in the number of activated memory B cells with a switched antibody isotype. Thus, the assessment of B cell response revealed significant changes in contents of peripheral blood B cell subpopulations in response to vaccination with “Grippol plus”, “Sovigripp”, or “Ultrix”.

Keywords: influenza vaccines, B lymphocytes, flow cytometry, plasmablasts, memory B cells, influenza virus

Работа выполнена в рамках государственного задания Министерства здравоохранения Российской Федерации по теме «Оценка напряженности коллективного иммунитета и эпидемиологической эффективности гриппозных вакцин в Российской Федерации» 2019-2021 гг.

Список использованных сокращений: АТ – антитела, ГА – гемагглютинин, ИГВ – инактивированная гриппозная вакцина, РТГА – реакция торможения гемагглютинации, МПК – мононуклеары периферической крови, BCR – В-клеточный рецептор, DN – double-negative B cells, эффекторные В-клетки, IgA – иммуноглобулин А, IgD – иммуноглобулин D, IgG – иммуноглобулин G, IgM – иммуноглобулин M, RSV – респираторно-синцитиальный вирус, TNF – фактор некроза опухоли.

Введение

Во всем мире циркулирующие вирусы гриппа ежегодно приводят к серьезным медицинским и социально-экономическим последствиям [6]. Общеизвестно, что вакцинация является наиболее эффективной и безопасной стратегией предотвращения гриппа и его осложнений. В целях снижения побочных эффектов при использовании живых вирусов, широкое применение находят расщепленные и субъединичные гриппозные вакцины. В нашем исследовании было проведено изучение иммунного ответа после иммунизации тремя отечественными сезонными трехвалентными инактивированными гриппозными вакцинами (ИГВ). Две из них – субъединичные вакцины «Гриппол плюс» и «Совигрипп», содержат в своем составе адьюванты («Полиоксидоний» в вакцине «Гриппол плюс» и «Совидон» – в «Совигрипп»), а количество антигенов снижено по отношению к сплит-вакцинам. Введение адьюванта в состав вакцин позволяет снижать количество антигена, увеличивать продолжительность специфического иммунного ответа, а также усиливать ответ клеточных звеньев специфического иммунитета. Третья вакцина – «Ультрикс» – относится к расщепленным вакцинам последнего поколения, активирующим гуморальный и клеточный иммунный ответ. Результаты клинических исследований свидетельствуют о хорошей переносимости, безопасности данных вакцин и их иммуногенности [1, 2, 3].

В последнее время при изучении поствакцинального иммунитета все больше внимания уделяется характеристикам не только гуморального, но и Т- и В-клеточного ответа. В-лимфоциты играют важную роль в обеспечении гуморального иммунитета при многих вирусных и бактериальных инфекциях. Проточная цитометрия с использованием антител к специфическим

поверхностным маркерам В-клеток является информативным и высокочувствительным методом изучения субпопуляционного состава В-лимфоцитов [4]. CD27, член семейства рецепторов TNF (фактор некроза опухоли), индуцирует дифференцировку клеток, экспрессируется на большинстве В-клеток памяти и активируется на плазмобластах [15]. Экспрессия CD20 снижается при дифференцировке В-клеток памяти крови в плазмобласты. Популяция плазмобластов является источником плазматических клеток, секретирующих антитела (АТ). Различия в экспрессии поверхностных маркеров CD19 и CD27 и экспрессии IgD (иммуноглобулин D) обуславливают разделение В-клеток памяти на «переключенные» (switched, CD27⁺IgD⁻) и «непереключенные» (non-switched, CD27⁺IgD⁺) [10, 13]. В-клетки памяти с фенотипом CD27⁺IgD⁻ в результате гипермутагенеза «переключились» на изотипы АТ IgG (иммуноглобулин G) и IgA (иммуноглобулин А) и не экспрессируют на своей поверхности IgD. Показано, что данные клетки несут на своей поверхности BCR (В-клеточные рецепторы, B cell receptors), которые специфично узнают антигены. Считают, что «переключенные» В-клетки памяти являются основными клетками, обеспечивающими быстрый антительный ответ при повторной встрече с антигеном. «Непереключенные» В-клетки памяти не проходят этапа переключения изотипов АТ, экспрессируют IgD рецепторы и поверхностные IgM (иммуноглобулин M). При повторной антигенной стимуляции CD27⁺IgD⁺ «непереключенные» В-клетки памяти проходят дифференцировку в герминативных центрах. Экспрессия поверхностного маркера CD38 наблюдается на поверхности Т- и В-лимфоцитов, плазматических клеток, NK-клеток, моноцитов. CD38 катализирует образование циклических АДФ-рибозы и НАДФ и регулирует сигналы Ca²⁺ в лимфоидных клетках. Оценка экспрессии CD38 позволяет судить о степени дифференцировки и активации Т- или В-лимфоцитов [7].

Результаты опубликованных исследований указывают на влияние вакцинации гриппозными вакцинами на уровни отдельных субпопуляций В-лимфоцитов в периферической крови у человека [5, 11, 12, 14]. В короткие сроки после инфекции или вакцинации антиген-специфические В-клетки активируются в лимфатических узлах и становятся АТ-секретирующими плазмобластами, временно циркулирующими в периферии. Было показано, что после введения противогриппозных вакцин пик плазмобластов обнаруживается в кровотоке на 6-7-е сутки. Опубликованные данные подтверждают связь между количеством плазмобластов, а также продукцией

этим клетками поликлональных АТ и титрами сывороточных нейтрализующих АТ [5, 9]. Кроме того, иммунизация ИГВ значительно увеличивает процент циркулирующих В-клеток памяти, специфичных для вируса гриппа [11]. Важное значение оценки субпопуляционного состава лимфоцитов подтверждается, в том числе, результатами исследований, свидетельствующими о снижении В-клеточного ответа на вакцинацию при повторных иммунизациях сезонными ИГВ и у пожилых людей [9, 12]. Однако особенности формирования В-клеточного ответа на фоне иммунизации различными типами гриппозных вакцин до настоящего времени остаются недостаточно изученными.

В связи с этим **целью нашего исследования** является изучение динамики субпопуляционного состава В-лимфоцитов периферической крови при иммунизации различными типами вакцин «Гриппол плюс», «Совигрипп» и «Ультрикс».

Материалы и методы

Проведено наблюдательное проспективное исследование на базе клинического отделения ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева» Минздрава России в период с октября 2018 г. по декабрь 2019 г. Протокол исследования «ПЭВ-2018/2019» был одобрен локальным этическим комитетом НИИ гриппа.

В исследовании приняли участие 39 добровольцев, вакцинированных одной из трех нижеперечисленных ИГВ. Критерии включения в исследование: возраст от 18 лет и старше, отсутствие острых, хронических или аллергических заболеваний в стадии обострения, отсутствие аллергических реакций на куриный белок, интервал не менее 1 месяца после последней иммунизации другими негриппозными вакцинами. Со всеми добровольцами было подписано письменное информированное согласие на участие в исследовании. Вакцина вводилась внутримышечно в верхнюю треть плеча в дозе 0,5 мл однократно после осмотра врача, термометрии и измерения АД.

Для иммунизации использовали следующие ИГВ. Вакцина «Гриппол плюс», инактивированная субъединичная, содержащая по 5 мкг гемагглютинаина (ГА) каждого из трех эпидемических штаммов вирусов гриппа типов А/Н1N1pdm09, А/Н3N2, В и 500 мкг иммуноадьюванта Полиоксидоний® в дозе 0,5 мл (ООО «НПО Петровакс Фарм»). Вакцина «Совигрипп», инактивированная субъединичная, содержащая по 5 мкг ГА двух эпидемических штаммов вирусов гриппа типов А/Н1N1pdm09, А/Н3N2, 11 мкг – штамма В и 500 мкг адьюванта «Совидон» в дозе 0,5 мл (АО «НПО «Микроген»). Вакцина «Ультрикс» инак-

тивированная расщепленная, содержащая по 15 мкг ГА каждого из трех эпидемических штаммов вирусов гриппа типов А/Н1N1pdm09, А/Н3N2 и В в дозе 0,5 мл (ООО «Форт»).

Исследования содержания различных популяций В-лимфоцитов проводили методом проточной цитометрии [4]. Оценку проводили на трех сроках – до (0-й день), через 7 дней и 21 день после вакцинации. Мононуклеарные клетки периферической крови (МПК) выделяли из венозной крови методом седиментации в градиенте плотности фиколл-урографина. Для анализа использовали образцы криоконсервированных МПК с концентрацией 1×10^6 клеток/образец. В исследованиях применяли панель флуоресцентно-меченных антител к поверхностным антигенам CD3, CD19, CD20, CD27, CD38, IgD, IgA (BioLegend, США). Обработка полученных данных осуществлялась с помощью штатного программного обеспечения (Н., Cytexpert, Beckman Coulter, Inc., США) и дополнительного ПО Kaluza 2.0 software (Beckman Coulter, Inc., США).

Статистический анализ данных был проведен с использованием программ STATISTICA Version 8.0 (StatSoft Inc., Tulsa, OK, США), GraphPad Prism Version 5.0 (США) и R-studio. При статистической обработке данных использовали методы описательной и параметрической статистики. Различия с данными до вакцинации оценивали с использованием U-теста Манна–Уитни. Различия считали достоверными при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

В настоящее исследование включены 39 человек, из них 13 мужчин (33,3%), 26 женщин (66,7%), средний возраст составил $46,0 \pm 14,5$ года. Из них привито вакцинами: «Гриппол плюс» – 14 человек, в том числе 4 мужчины (28,6%) и 10 женщин (71,4%), средний возраст $43,0 \pm 12,0$ года; «Совигрипп» – 15 человек, в том числе 7 мужчин (46,7%) и 8 женщин (53,3%), средний возраст $46,0 \pm 14,4$ года; «Ультрикс» – 10 человек, в том числе 2 мужчины (20,0%) и 8 женщин (80,0%), средний возраст $51,0 \pm 17,5$ года.

Использованная панель флуорохром-конъюгированных антител позволила выявить следующие популяции В-лимфоцитов (CD3⁺CD19⁺): наивные В-клетки (CD20⁺CD27⁻IgD⁺), непереключенные В-клетки памяти (CD20⁺CD27⁺IgD⁺), переключенные В-клетки памяти (CD20⁺CD27⁻IgD⁻), эффекторные В-клетки памяти (CD20⁺CD27⁻IgD⁻), плазмобласты (CD20⁺CD38^{hi}CD27^{hi}). Активацию В-клеточного иммунного ответа оценивали путем измерения относительного содержания CD38⁺В-клеток, относящихся к популяциям наивных, эффекторных В-лимфоцитов, переключенных и

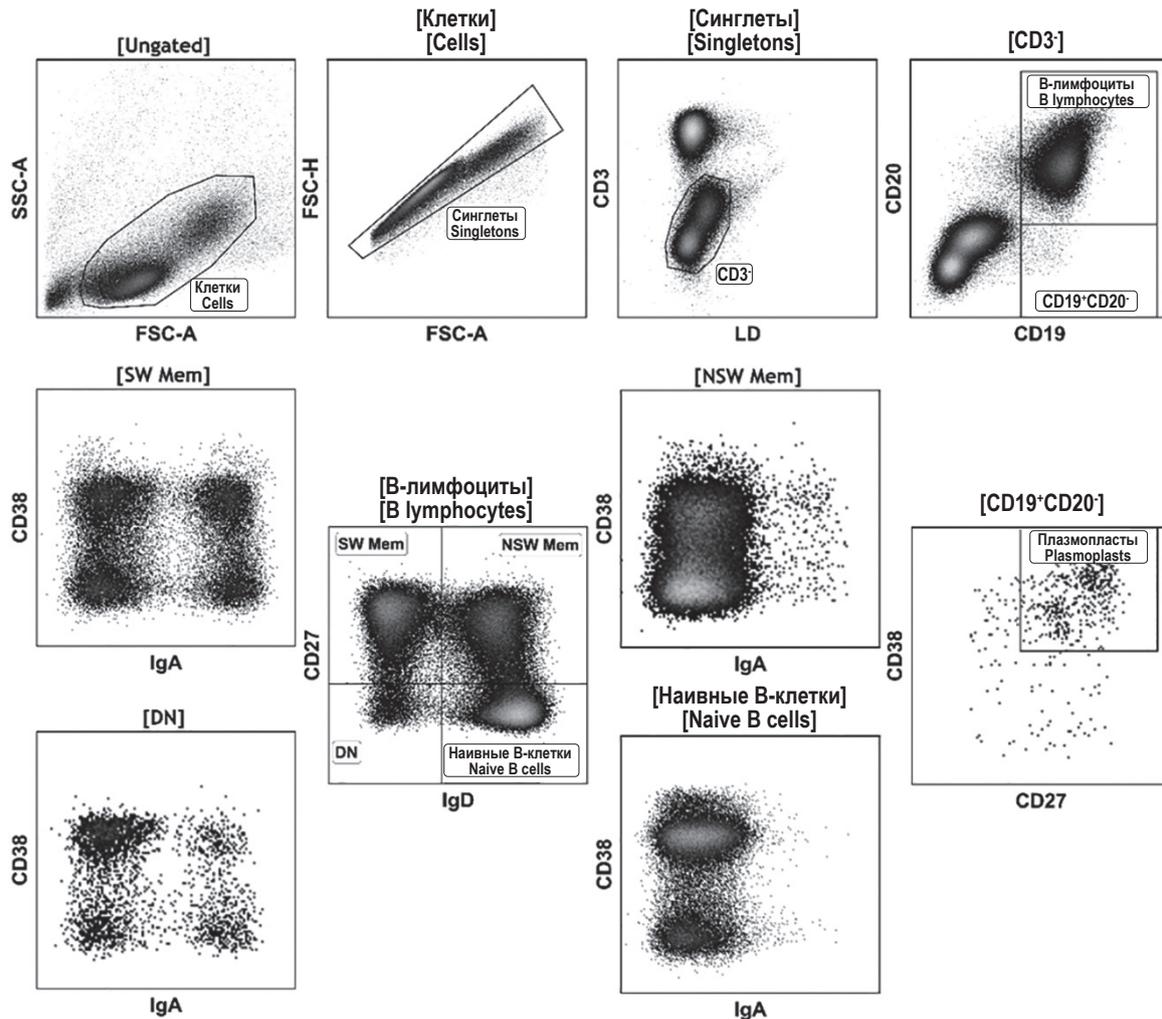


Рисунок 1. Тактика гейтирования изучаемых субпопуляций В-лимфоцитов

Примечание. На основании характеристик прямого и бокового светорассеивания (FSC/SSC), исключения «дублетов» (FSC-H/FSC-A), флюоресценции Zombie Aqua и наличия CD3 из анализа исключали нежизнеспособные клетки и CD3⁺ лимфоциты. Среди В-лимфоцитов (CD3⁺CD19⁺) выделяли следующие субпопуляции: наивные В-клетки (CD20⁺CD27⁺IgD⁺), непереключенные В-клетки памяти (CD20⁺CD27⁺IgD⁺), переключенные В-клетки памяти (CD20⁺CD27⁺IgD⁺), эффекторные В-клетки памяти (CD20⁺CD27⁺IgD⁺), плазмобласты (CD20⁺CD38^{hi}CD27^{hi}). Активацию В-клеточного иммунного ответа оценивали путем измерения относительного содержания CD38⁺В-лимфоцитов, относящихся к различным субпопуляциям. Обозначения: SW Mem – переключенные В-клетки памяти, NSW Mem – непереключенные В-клетки памяти, DN – эффекторные В-клетки памяти.

Figure 1. Gating strategy for phenotypic characterizations of B cell subpopulations

Note. Based on forward and side scatter characteristics (FSC/SSC), “doublet” exclusion (FSC-H/FSC-A), Zombie Aqua fluorescence, and presence of CD3, non-viable cells and CD3⁺ lymphocytes were excluded from the analysis. In the population of B lymphocytes (CD3⁺CD19⁺), the following subpopulations were isolated: naive B cells (CD20⁺CD27⁺IgD⁺), non-switched memory B cells (CD20⁺CD27⁺IgD⁺), switched memory B cells (CD20⁺CD27⁺IgD⁺), effector memory B cells (CD20⁺CD27⁺IgD⁺), plasmablasts (CD20⁺CD38^{hi}CD27^{hi}). To assess the activation of the B cell immune response, the relative content of CD38⁺B cells belonging to the different subpopulations were counted. The level of B cells expressing membrane-associated IgA was also measured. Abbreviation: SW Mem, switched memory B cells; NSW Mem, non-switched memory B cells; DN, effector memory B cells.

непереключенных В-клеток памяти. Тактика гейтирования для выявления указанных популяций представлена на рисунке 1.

Результаты оценки динамики основных субпопуляций В-клеток на фоне вакцинации разными ИГВ приведены на рисунке 2. На 7-й день после вакцинации у добровольцев, получавших

вакцину «Ультрикс», отмечалось достоверное увеличение общего числа В-клеток в периферической крови ($p = 0,0009$) (рис. 2А). У лиц, получавших вакцину «Гриппол плюс», на данном сроке также происходило повышение относительного содержания В-лимфоцитов, однако достоверные различия с исходными значениями

были достигнуты на 21-й день ($p = 0,005$). У добровольцев, привитых вакциной «Совигрипп», изменения носили менее выраженный характер, однако в среднем уровень В-клеток также увеличивался на 7-й и 21-й дни после вакцинации. Все

три вакцины способствовали увеличению общего содержания В-лимфоцитов в периферической крови, что отражает способность изучаемых вакцин стимулировать пролиферацию В-клеток. Наиболее выраженные изменения были харак-

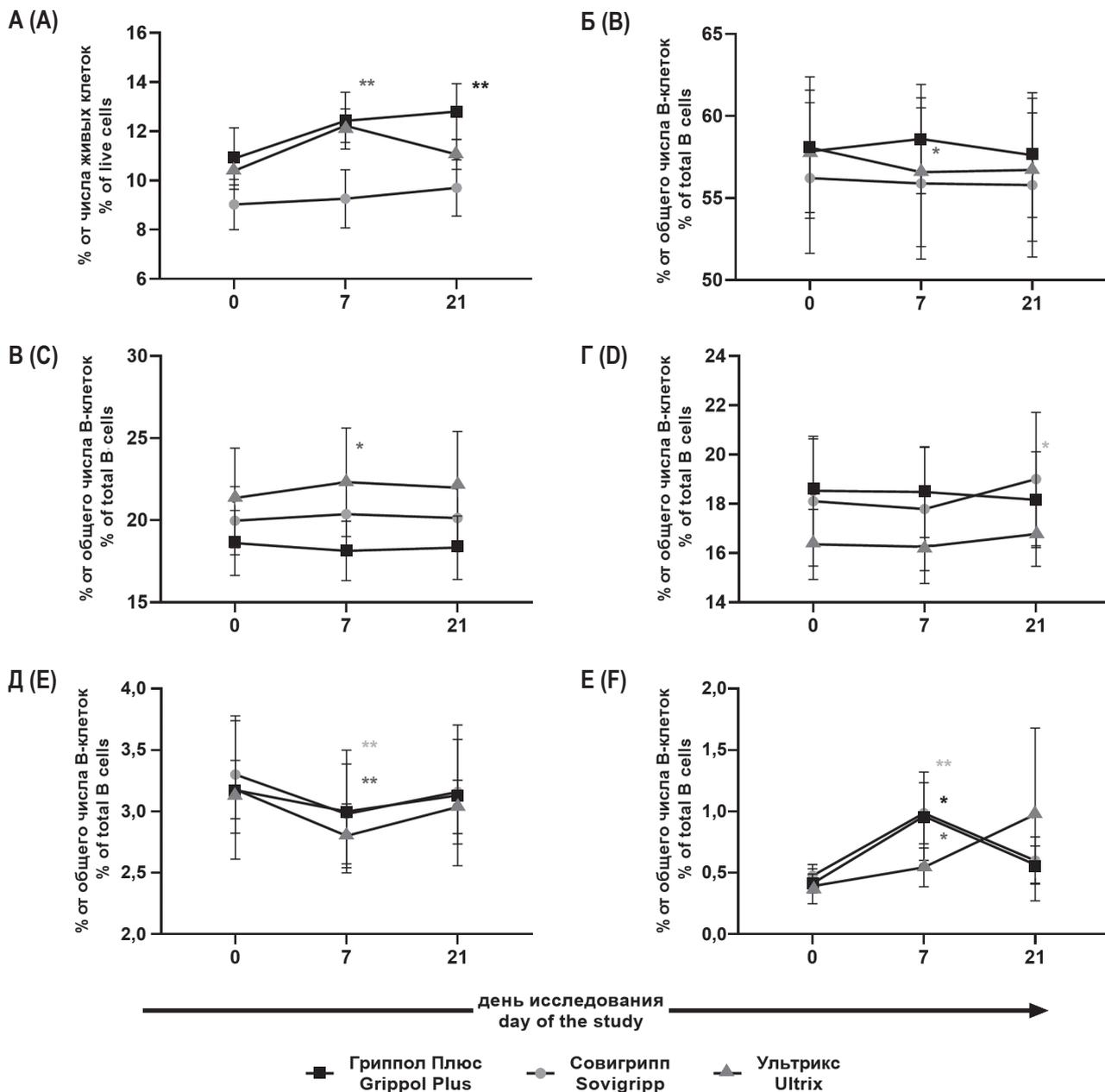


Рисунок 2. Динамика поствакцинального В-клеточного ответа в периферической крови добровольцев

Примечание. Представлены средние значения (Mean \pm SE) относительного содержания В-лимфоцитов и различных субпопуляций В-клеток (ось ординат) в периферической крови участников исследования до вакцинации, на 7-й и 21-й дни после вакцинации (ось абсцисс). А – В-лимфоциты. Б – наивные В-клетки. В – непереключенные В-клетки памяти. Г – переключенные В-клетки памяти. Д – эффекторные В-клетки памяти. Е – плазмобласты. Символом «*» отмечены достоверные различия с днем 0 (до вакцинации) в тесте Манна–Уитни (* – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$).

Figure 2. Dynamics of postvaccination B cell response in peripheral blood of healthy volunteers

Note. The mean values (Mean \pm SE) of the content of B lymphocytes and various subpopulations of B cells (ordinate axis) in the peripheral blood of the study participants before vaccination, on 7 and 21 days after vaccination (the abscissa axis) are presented. A, B lymphocytes. B, Naive B cells. C, Non-switched memory B cells. D, Switched memory B cells. E, Effector memory B cells. F, Plasmablasts. The symbol “*” marks significant differences with day 0 (before vaccination) in the Mann–Whitney test (*, $p < 0.05$, **, $p < 0.01$).

теры для лиц, привитых вакцинами «Гриппол плюс» и «Ультрикс».

До введения вакцины в периферической крови плазмобласты составляли менее 1% от всех В-лимфоцитов. Было показано, что вакцины «Совигрипп» и «Гриппол плюс» индуцировали выраженное увеличение уровня плазмобластов в периферической крови на 7-й день после вакцинации ($p = 0,007$; $p = 0,03$) (рис. 2Е). На 21-й день происходило возвращение относительного содержания плазмобластов на уровень, отмеченный до вакцинации. Вакцина «Ультрикс» также вызывала достоверный ($p = 0,05$) прирост относительного содержания указанных клеток на 7-й день после введения, однако изменения носили менее выраженный характер. При этом в группе, получавшей «Ультрикс», в отличие от групп, получавших «Совигрипп» или «Гриппол плюс», не отмечено снижения относительного содержания плазмобластов на 21-й день. Таким образом, все три вакцины способствовали увеличению доли плазмобластов среди В-клеток на 7-й день после вакцинации. При этом наиболее выраженные изменения в количестве плазмобластов были характерны для групп, иммунизированных вакцинами «Совигрипп» или «Гриппол плюс». Различный характер ответа на вакцинацию в разных группах, по всей видимости, связан с использованием адъювантов в составе данных вакцин. Полученные в нашей работе данные подтверждаются опубликованными результатами других исследователей. Так, ранее было показано, что после вакцинации ИГВ доля плазмобластов среди В-клеток периферической крови возрастает до 1-1,5%, с максимумом на 7-й день [8]. После иммунизации ИГВ пик появления специфических для гриппа плазмобластов, секретирующих антитела, коррелирует с титрами антител к ГА [5].

В периферической крови у человека пул В-лимфоцитов состоит в среднем из 40% В-клеток памяти и 60% наивных В-клеток [8]. Содержание переключенных и непереключенных В-клеток памяти составляет 10-32% и 5-16% от всех В-клеток соответственно [10]. После введения ИГВ не было выявлено изменений в количестве В-клеток памяти [8]. В наших исследованиях частота определения данных субпопуляций В-лимфоцитов была сходной с данными, опубликованными ранее (рис. 2В, Г). После введения ИГВ на 21-е сутки наблюдали достоверное увеличение доли В-клеток с переключенным изотипом антител в группе лиц, привитых вакциной «Совигрипп», и выраженную тенденцию к увеличению в группе привитых «Ультрикс» (рис. 2Г).

Вакцинация оказала существенное влияние на относительное содержание эффекторных

В-клеток памяти (DN-клетки), для которых ранее была показана способность к дифференцировке в В-клетки памяти с переключенным изотипом антител [15]. Методом проточной цитометрии было определено, что в периферической крови у человека DNB-клетки памяти составляют в норме менее 5% от всех В-клеток [8], что согласуется с полученными в нашей работе данными. Было обнаружено, что количество этих клеток в периферической крови повышено у пациентов при волчанке. При заражении добровольцев респираторно-синцитиальным вирусом (RSV) содержание DNB-клеток памяти в периферической крови возрастает на 4-12-й день. Есть данные, указывающие на то, что количество DNB-клеток памяти увеличивается у здоровых добровольцев после вакцинации против гриппа или вирусного энцефалита [8]. В нашем исследовании в группах, привитых вакцинами «Совигрипп» и «Ультрикс», отмечали снижение относительного содержания клеток данного фенотипа на 7-й день ($p = 0,005$, $p = 0,002$) (рис. 2Д). У лиц, получивших вакцину «Совигрипп», указанные изменения сопровождались приростом относительного содержания переключенных В-клеток памяти на 21-й день после вакцинации. Участие DNB-клеток памяти в поствакцинальном иммунном ответе требует дальнейшего изучения. В целом, повышение количества этих клеток отражает развитие воспалительного ответа и может потенциально вносить вклад в патогенез аутоиммунных заболеваний.

Изменения относительного содержания В-лимфоцитов, находящихся на более ранних стадиях созревания, были продемонстрированы в группе, получавшей вакцину «Ультрикс». У лиц, привитых данной вакциной, было выявлено снижение уровня наивных В-лимфоцитов на 7-й день после вакцинации ($p = 0,03$) (рис. 2Б). Полученные в нашей работе данные подтверждаются опубликованными ранее результатами. В периферической крови здоровых добровольцев выявлено около 60% наивных В-клеток памяти. После вакцинации ИГВ происходило снижение процента наивных В-клеток на 7-й и 14-й день наблюдения [8]. Одновременно с этим, после вакцинации «Ультрикс» наблюдали увеличение относительного содержания непереключенных В-клеток памяти ($p = 0,02$) (рис. 2В). Тенденция к увеличению уровня данной популяции была выявлена также в группе, вакцинированной «Совигрипп» ($p = 0,053$).

На рисунке 3 представлены результаты изучения динамики относительного содержания основных популяций В-лимфоцитов, экспрессирующих активационный маркер CD38. Согласно полученным данным, наблюдалось увеличение

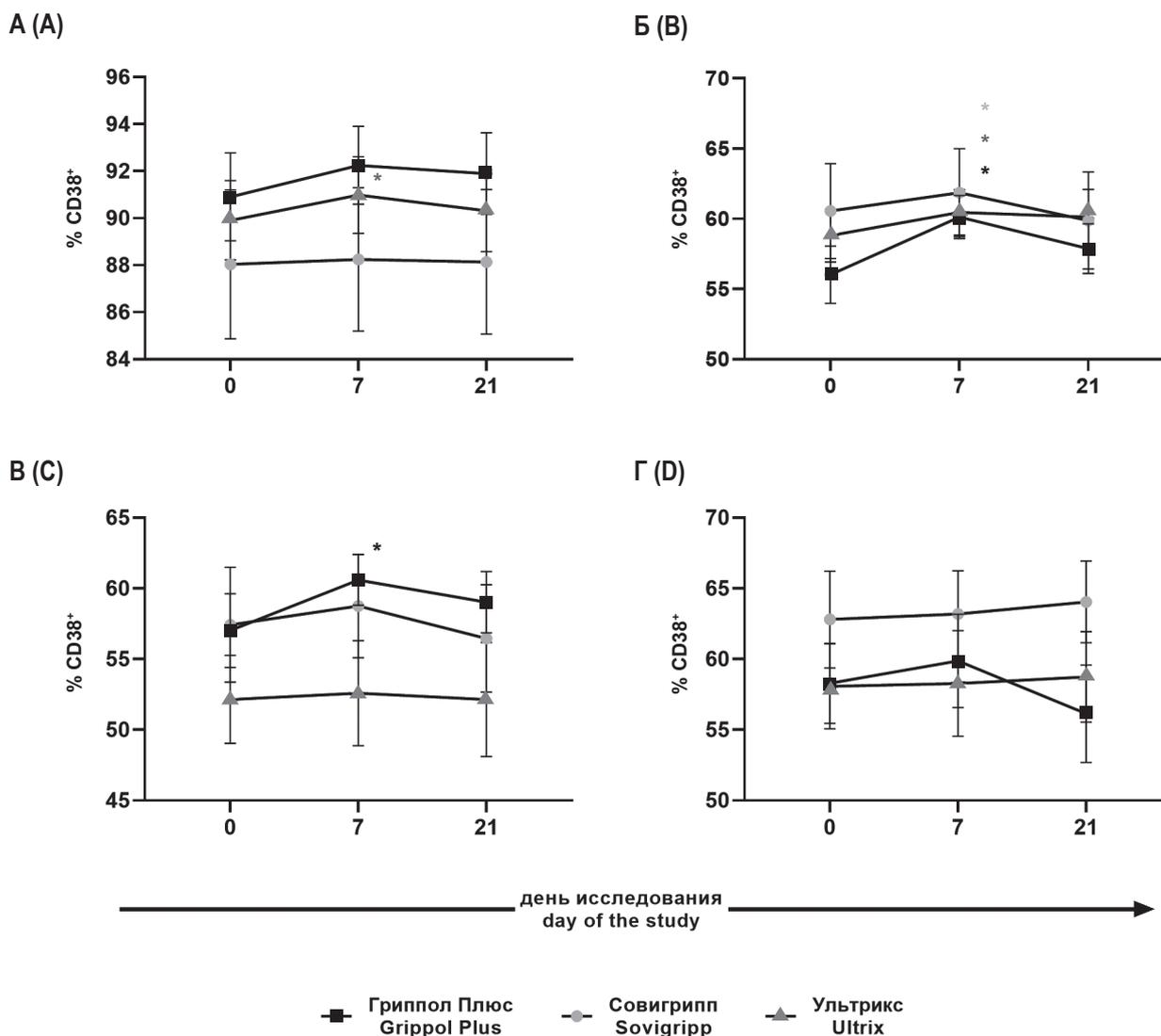


Рисунок 3. Динамика относительного количества В-лимфоцитов периферической крови, экспрессирующих активационный маркер CD38 после вакцинации

Примечание. Представлены средние значения (Mean ± SE) доли различных субпопуляций В-лимфоцитов, экспрессирующих активационный маркер CD38 от общего числа клеток в соответствующей родительской популяции (ось ординат), до вакцинации, на 7-й и 21-й дни после вакцинации (ось абсцисс). А – наивные В-клетки. Б – переключенные В-клетки памяти. В – непереключенные В-клетки памяти. Г – эффекторные В-клетки памяти. Символом «*» отмечены достоверные различия с днем 0 (до вакцинации) в тесте Манна–Уитни (* – $p < 0,05$).

Figure 3. Dynamics of the relative number of peripheral blood B lymphocytes expressing the activation marker CD38 after vaccination

Note. The average values (Mean ± SE) of the proportion of different subpopulations of B lymphocytes expressing the activation marker CD38 from the total number of cells in the corresponding parent population (ordinate axis) are presented before vaccination, on 7 and 21 days after vaccination (the abscissa axis). A, Naive B cells. B, Switched memory B cells. C, Non-switched memory B cells. D, effector memory B cells. The symbol "*" marks significant differences with day 0 (before vaccination) in the Mann–Whitney test (*, $p < 0.05$).

числа активированных В-клеток памяти с переключенным изотипом антител через 7 дней после введения вакцин «Совигрипп», «Гриппол плюс» и «Ультрикс» ($p = 0,03$; $p = 0,04$; $p = 0,02$, соответственно) (рис. 3Б). Популяция активированных переключенных В-клеток памяти, наравне с плазмобластами выделяется как биомаркер

В-клеточного ответа. Кроме того, у лиц, получивших вакцины «Ультрикс» и «Гриппол плюс», происходило увеличение относительного содержания наивных CD38⁺ В-лимфоцитов ($p = 0,02$) и непереключенных В-клеток памяти, экспрессирующих CD38 ($p = 0,02$) (рис. 3А, В). Таким образом, вакцинация приводила к увеличению

относительного содержания активированных В-лимфоцитов, находящихся на различных стадиях созревания.

Заключение

Проведенные исследования выявили значительные изменения в популяционном составе В-лимфоцитов в ответ на вакцинацию всеми исследованными ИГВ. Происходило увеличение общего количества В-лимфоцитов, а также их

субпопуляций, в том числе плазмобластов и активированных переключенных В-клеток памяти. Для адьювантных вакцин «Гриппол плюс» и «Совигрипп» по сравнению с расщепленной вакциной «Ультрикс» было показано раннее увеличение относительного количества плазмобластов на 7-й день исследования. При этом все три вакцины в одинаковой мере способствовали увеличению числа активированных В-клеток памяти с переключенным изотипом антител.

Список литературы / References

1. Лиознов Д.А., Харит С.М., Ерофеева М.К., Зубкова Т.Г., Горчакова О.В., Николаенко С.Л. Оценка реактогенности и иммуногенности вакцины гриппозной четырехвалентной инактивированной субъединичной // Эпидемиология и Вакцинопрофилактика, 2018, Т. 17, № 3. С. 57-62. [Lioznov D.A., Kharit S.M., Erofeeva M.K., Zubkova T.G., Gorchakova O.V., Nikolaenko S.L. Assessment of reactogenicity and immunogenicity of the quadrivalent live attenuated influenza vaccine. *Epidemiologiya i Vaksino profilaktika = Epidemiology and Vaccinal Prevention*, 2018, Vol. 17, no. 3, pp. 57-62. (In Russ.)]
2. Никифорова А.Н., Исакова-Сивак И.Н., Ерофеева М.К., Фельдблюм И.В., Руденко Л.Г. Результаты изучения безопасности и иммуногенности отечественной субъединичной адьювантной вакцины Совигрипп у добровольцев 18-60 лет // Эпидемиология и Вакцинопрофилактика, 2014. № 2 (75). С. 72-78. [Nikiforova A.N., Isakova-Sivak I.N., Erofeeva M.K., Feldblyum I.V., Rudenko L.G. The results of the study of the safety and immunogenicity of the domestic subunit adjuvant vaccine "Sovigripp" in volunteers aged 18-60 years. *Epidemiologiya i Vaksino profilaktika = Epidemiology and Vaccinal Prevention*, 2014, no. 2 (75), pp. 72-78. (In Russ.)]
3. Селькова Е.П., Гренкова Т.А., Алешкин В.А., Гудова Н.В., Лыткина И.Н., Михайлова Е.В., Яшина А.Я., Федякина И.Т. Изучение иммуногенности, эффективности и переносимости отечественной вакцины «Ультрикс» среди лиц повышенного риска инфицирования и заболеваемости гриппом и острыми респираторными вирусными инфекциями // Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы, 2016. № 4. С. 59-66. [Selkova E.P., Grenkova T.A., Aleshkin V.A., Gudova N.V., Lytkina I.N., Mikhailova E.V., Yashina A.Ya., Fedyakina I.T. The study of the immunogenicity, efficacy and tolerability of the domestic vaccine "Ultrix" among people at increased risk of infection and morbidity with influenza and acute respiratory viral infections. *Epidemiologia i infeksionnye bolezni. Aktualnye voprosy = Epidemiology and Infectious Diseases. Current Issues*, 2016, no. 4, pp. 59-66. (In Russ.)]
4. Cossarizza A., Chang H.-D., Radbruch A., Acs A., Adam D., Adam-Klages S., Agace W.W., Aghaepour N., Akdis M., Allez M., Almeida L.N., Alvisi G., Anderson G., Andr a I., Annunziato F., Anselmo A., Bacher P., Baldari C.T., Bari S., Barnaba V., Barros-Martins J., Battistini L., Bauer W., Baumgart S., Baumgarth N., Baumjohann D., Baving B., Bebawy M., Becher B., Beisker W., Benes V., Beyaert R., Blanco A., Boardman D.A., Bogdan C., Borger J.G., Borsellino G., Boulais P.E., Bradford J.A., Brenner D., Brinkman R.R., Brooks A.E.S., Busch D.H., B scher M., Bushnell T.P., Calzetti F., Cameron G., Cammarata I., Cao X., Cardell S.L., Casola S., Cassatella M.A., Cavani A., Celada A., Chatenoud L., Chattopadhyay P.K., Chow S., Christakou E.,  i in- ain L., Clerici M., Colombo F.S., Cook L., Cooke A., Cooper A.M., Corbett A.J., Cosma A., Cosmi L., Coulie P.G., Cumano A., Cvetkovic L., Dang V.D., Dang-Heine C., Davey M.S., Davies D., de Biasi S., del Zotto G., dela Cruz G.V., Delacher M., Bella S.D., Dellabona P., Deniz G., Dessing M., di Santo J.P., Diefenbach A., Dieli F., Dolf A., D rner T., Dress R.J., Dudziak D., Dustin M., Dutertre C. A., Ebner F., Eckle S.B.G., Edinger M., Eede P., Ehrhardt G.R.A., Eich M., Engel P., Engelhardt B., Erdei A., Esser C., Everts B., Evrard M., Falk C.S., Fehniger T.A., Felipe-Benavent M., Ferry H., Feuerer M., Filby A., Filkor K., Fillatreau S., Follo M., F rster I., Foster J., Foulds G.A., Frehse B., Frenette P.S., Frischbutter S., Fritzsche W., Galbraith D.W., Gangaev A., Garbi N., Gaudilliere B., Gazzinelli R.T., Geginat J., Gerner W., Gherardin N.A., Ghoreschi K., Gibellini L., Ginhoux F., Goda K., Godfrey D.I., Goettlinger C., Gonz lez-Navajas J.M., Goodyear C.S., Gori A., Grogan J.L., Grummitt D., Gr tzkau A., Haftmann C., Hahn J., Hammad H., H mmerling G., Hansmann L., Hansson G., Harpur C.M., Hartmann S., Hauser A., Hauser A.E., Haviland D.L., Hedley D., Hern ndez D.C., Herrera G., Herrmann M., Hess C., H fer T., Hoffmann P., Hogquist K., Holland T., H llt T., Holmdahl R., Hombrink P., Houston J.P., Hoyer B.F., Huang B., Huang F.-P., Huber J.E.,

Huehn J., Hundemer M., Hunter C.A., Hwang W.Y.K., Iannone A., Ingelfinger F., Ivison S.M., Jäck H.-M., Jani P.K., Jávega B., Jonjic S., Kaiser T., Kalina T., Kamradt T., Kaufmann S.H.E., Keller B., Ketelaars S.L.C., Khalilnezhad A., Khan S., Kisielow J., Klenerman P., Knopf J., Koay H.-F., Kobow K., Kolls J.K., Kong W.T., Kopf M., Korn T., Kriegsmann K., Kristyanto H., Kroneis T., Krueger A., Kühne J., Kukat C., Kunkel D., Kunze-Schumacher H., Kurosaki T., Kurts C., Kvistborg P., Kwok I., Landry J., Lantz O., Lanuti P., LaRosa F., Lehuen A., LeibundGut-Landmann S., Leipold M.D., Leung L.Y.T., Levings M.K., Lino A.C., Liotta F., Litwin V., Liu Y., Ljunggren H. G., Lohoff M., Lombardi G., Lopez L., López-Botet M., Lovett-Racke A.E., Lubberts E., Luche H., Ludewig B., Lugli E., Lunemann S., Maecker H.T., Maggi L., Maguire O., Mair F., Mair K.H., Mantovani A., Manz R.A., Marshall A.J., Martínez-Romero A., Martrus G., Marventano I., Maslinski W., Matarese G., Mattioli A.V., Maueröder C., Mazzoni A., McCluskey J., McGrath M., McGuire H.M., McInnes I.B., Mei H.E., Melchers F., Melzer S., Mielenz D., Miller S.D., Mills K.H.G., Minderman H., Mjösberg J., Moore J., Moran B., Moretta L., Mosmann T.R., Müller S., Multhoff G., Muñoz L.E., Münz C., Nakayama T., Nasi M., Neumann K., Ng L.G., Niedobitek A., Nourshargh S., Núñez G., O'Connor J. E., Ochel A., Oja A., Ordonez D., Orfao A., Orłowski-Oliver E., Ouyang W., Oxenius A., Palankar R., Panse I., Pattanapanyasat K., Paulsen M., Pavlinic D., Penter L., Peterson P., Peth C., Petriz J., Piancone F., Pickl W.F., Piconese S., Pinti M., Pockley A.G., Podolska M.J., Poon Z., Pracht K., Prinz I., Pucillo C.E.M., Quataert S.A., Quatrini L., Quinn K.M., Radbruch H., Radstake T.R.D.J., Rahmig S., Rahn H. P., Rajwa B., Ravichandran G., Raz Y., Rebhahn J.A., Recktenwald D., Reimer D., Sousa C.R., Remmerswaal E.B.M., Richter L., Rico L.G., Riddell A., Rieger A.M., Robinson J.P., Romagnani C., Rubartelli A., Ruland J., Saalmüller A., Saeys Y., Saito T., Sakaguchi S., Sala-de-Oyanguren F., Samstag Y., Sanderson S., Sandroock I., Santoni A., Sanz R.B., Saresella M., Sautes-Fridman C., Sawitzki B., Schadt L., Scheffold A., Scherer H.U., Schiemann M., Schildberg F.A., Schimisky E., Schlitzer A., Schlosser J., Schmid S., Schmitt S., Schober K., Schraivogel D., Schuh W., Schüler T., Schulte R., Schulz A.R., Schulz S.R., Scottá C., Scott-Algara D., Sester D.P., Shankey T.V., Silva-Santos B., Simon A.K., Sitnik K.M., Sozzani S., Speiser D.E., Spidlen J., Stahlberg A., Stall A.M., Stanley N., Stark R., Stehle C., Steinmetz T., Stockinger H., Takahama Y., Takeda K., Tan L., Tárnok A., Tiegs G., Toldi G., Tornack J., Traggiai E., Trebak M., Tree T.I.M., Trotter J., Trowsdale J., Tsoumakidou M., Ulrich H., Urbanczyk S., van de Veen W., van den Broek M., van der Pol E., van Gassen S., van Isterdael G., van Lier R.A.W., Veldhoen M., Vento-Asturias S., Vieira P., Voehringer D., Volk H.-D., von Borstel A., von Volkman K., Waisman A., Walker R.V., Wallace P.K., Wang S.A., Wang X.M., Ward M.D., Ward-Hartstonge K.A., Warnatz K., Warnes G., Warth S., Waskow C., Watson J.V., Watzl C., Wegener L., Weisenburger T., Wiedemann A., Wienands J., Wilharm A., Wilkinson R.J., Willimsky G., Wing J.B., Winkelmann R., Winkler T.H., Wirz O.F., Wong A., Wurst P., Yang J.H.M., Yang J., Yazdanbakhsh M., Yu L., Yue A., Zhang H., Zhao Y., Ziegler S.M., Zielinski C., Zimmermann J., Zychlinsky A. Guidelines for the use of flow cytometry and cell sorting in immunological studies (second edition). *Eur. J. Immunol.*, 2019, Vol. 49, no. 10, pp. 1457-1973.

5. Halliley J.L., Kyu S., Kobie J.J., Walsh E.E., Falsey A.R., Randall T.R., Treanor J., Feng C., Sanz I., Lee F.E.-H. Peak frequencies of circulating human influenza specific antibody secreting cells correlate with serum antibody response after immunization. *Vaccine*, 2010, Vol. 28, no. 20, pp. 3582-3587.

6. Peteranderl C., Herold S., Schmoldt C. Human influenza virus infections. *Semin. Respir. Crit. Care Med.*, 2016, Vol. 37, no. 4, pp. 487-500.

7. Piedra-Quintero Z.L., Wilson Z., Nava P., Guerau-de-Arellano M. CD38: An immunomodulatory molecule in inflammation and autoimmunity. *Front. Immunol.*, 2020, Vol. 11, 597959. doi: 10.3389/fimmu.2020.597959.

8. Ruschil C., Gabernet G., Lepennetier G., Heumos S., Kaminski M., Hracsko Z., Irmeler M., JBeckers J., Ziemann U., Nahnsen S., Owens G.P., Bennett J.L., Hemmer B., Kowarik M.C. Specific induction of double negative B cells during protective and pathogenic immune responses. *Front. Immunol.*, 2020, Vol. 11, 606338. doi: 10.3389/fimmu.2020.606338.

9. Sanyal M., Holmes T.H., Maecker H.T., Randy A., Albrecht R.A., Dekker C.L., He X.-S., Greenberg H.B. Diminished B-cell response after repeat influenza vaccination. *J. Infect. Dis.*, 2019, Vol. 219, no. 10, pp. 1586-1595.

10. Sanza I., Weia C., Leeb F.E.-H., Anolik J. Phenotypic and functional heterogeneity of human memory B cells. *Semin. Immunol.*, 2008, Vol. 20, no. 1, pp. 67-82.

11. Sasaki S., Jaimes M.C., Holmes T.H., Dekker C.L., Mahmood K., Kemble G.W., Arvin A.M., Greenberg H.B. Comparison of the influenza virus-specific effector and memory B-cell responses to immunization of children and adults with live attenuated or inactivated influenza virus vaccines. *J. Virol.*, 2007, Vol. 81, no. 1 pp. 215-228.

12. Sasaki S., Sullivan M., Narvaez C.F., Holmes T.H., Furman D., Zheng N.-Y., Nishtala M., Wrammert J., Smith K., James J.A., Dekker C.L., Davis M.M., Wilson P.C., Greenberg H.B., He X.-S. Limited efficacy of inactivated

influenza vaccine in elderly individuals is associated with decreased production of vaccine-specific antibodies. *J. Clin. Invest.*, 2011, Vol. 121, no. 8, pp. 3109-3119.

13. Taylor J.J., Jenkins M.K., Pape K. A. Heterogeneity in the differentiation and function of memory B cells. *Trends Immunol.*, 2012, Vol. 33, no. 12, pp. 590-597.

14. Turner J.S., Zhou J.Q., Han J., Schmitz A.J., Rizk A.A., Alsoussi W.B., Lei T., Amor M., McIntire K.M., Meade P., Strohmeier S., Brent R.I., Richey S.T., Haile A., Yang Y.R., Klebert M.K., Suessen T., Teefey S., Presti R.M., Krammer F., Kleinstejn S.H., Ward A.B., Ellebedy A.H. Human germinal centers engage memory and naïve B cells after influenza vaccination. *Nature*, 2020, Vol. 586, no. 7827, pp. 127-132.

15. Wu Y.C.B., Kipling D., Dunn-Walters D.K. The relationship between CD27 negative and positive B cell populations in human peripheral blood. *Front. Immunol.*, 2011, Vol. 2, 81. doi: 10.3389/fimmu.2011.00081.

Авторы:

Шурыгина А.-П.С. — к.м.н., старший научный сотрудник лаборатории векторных вакцин ФГБУ «Научно-исследовательский институт гриппа имени А.А. Смородинцева» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Васильев К.А. — к.б.н., научный сотрудник лаборатории векторных вакцин ФГБУ «Научно-исследовательский институт гриппа имени А.А. Смородинцева» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Варюшина Е.А. — д.б.н., ведущий специалист в области лабораторных исследований лаборатории векторных вакцин ФГБУ «Научно-исследовательский институт гриппа имени А.А. Смородинцева» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Ладьгина М.Д. — ведущий специалист в области лабораторных исследований лаборатории векторных вакцин ФГБУ «Научно-исследовательский институт гриппа имени А.А. Смородинцева» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Authors:

Shurygina A.-P.S., PhD (Medicine), Senior Research Associate, Laboratory of Vected Vaccines, A. Smorodintsev Research Institute of Influenza, St. Petersburg, Russian Federation

Vasiliev K.A., PhD (Biology), Research Associate, Laboratory of Vected Vaccines, A. Smorodintsev Research Institute of Influenza, St. Petersburg, Russian Federation

Varyushina E.A., PhD, MD (Biology), Leading Specialist in Laboratory Studies, Laboratory of Vected Vaccines, A. Smorodintsev Research Institute of Influenza, St. Petersburg, Russian Federation

Ladygina M.D., Leading Specialist in Laboratory Studies, Laboratory of Vected Vaccines, A. Smorodintsev Research Institute of Influenza, St. Petersburg, Russian Federation

Зубкова Т.Г. — к.м.н., заведующая клиническим отделением ФГБУ «Научно-исследовательский институт гриппа имени А.А. Смородинцева» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Zubkova T.G., PhD (Medicine), Head of the Clinical Department, A. Smorodintsev Research Institute of Influenza, St. Petersburg, Russian Federation

Бузицкая Ж.В. — к.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории векторных вакцин ФГБУ «Научно-исследовательский институт гриппа имени А.А. Смородинцева» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Buzitskaya Zh.V., PhD (Biology), Leading Research Associate, Laboratory of Vected Vaccines, A. Smorodintsev Research Institute of Influenza, St. Petersburg, Russian Federation

Стукова М.А. — к.м.н., заведующая лабораторией векторных вакцин лабораторией ФГБУ «Научно-исследовательский институт гриппа имени А.А. Смородинцева» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Stukova M.A., PhD (Medicine), Head, Laboratory of Vected Vaccines, A. Smorodintsev Research Institute of Influenza, St. Petersburg, Russian Federation

Леонов Д.А. — д.м.н., профессор, директор ФГБУ «Научно-исследовательский институт гриппа имени А.А. Смородинцева» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Lioznov D.A., PhD, MD (Medicine), Professor, Director, A. Smorodintsev Research Institute of Influenza, St. Petersburg, Russian Federation

Поступила 11.11.2022

Отправлена на доработку 07.12.2022

Принята к печати 20.02.2023

Received 11.11.2022

Revision received 07.12.2022

Accepted 20.02.2023

ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ РЕДКОГО СИНОНИМИЧНОГО ВАРИАНТА ГЕНА *KNG1* НА РАЗВИТИЕ НАСЛЕДСТВЕННОГО АНГИООТЕКА

Печникова Н.А.^{1,2}, Останкова Ю.В.¹, Сайтгалина М.А.¹,
Бебяков А.М.¹, Тотолян Арег А.^{1,3}

¹ ФБУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Санкт-Петербург, Россия

² ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет», Санкт-Петербург, Россия

³ ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Резюме. Основная причина отека при наследственном ангиоотеке (НАО) связана с повышенным уровнем брадикинина, вызванным дефицитом/изменением функциональной активности C1-INH, связанными с мутациями в гене *SERPING1* или мутациями в генах *F12*, *PLG*, *ANGPT1*, *KNG1*, *MYOF* и *HS3ST6* при нормальном уровне и функциональности ингибитора C1-эстеразы. Выявление новых мутаций, которые могут играть роль в патогенезе НАО, является важным шагом в понимании и лечении заболевания. Однако оценка или анализ влияния конкретных мутаций или комбинаций мутаций на организм остается серьезной проблемой. Целью работы являлся прогностический анализ *in silico* редкого синонимичного варианта NC_000003.12:g.186725098T>C гена *KNG1* и его влияние на развитие симптомов НАО. Материалом служил образец цельной крови, полученный от женщины с клиническими проявлениями наследственного ангиоотека без снижения уровней и функции C1-ингибитора. Методы исследования включали секвенирование полного экзона пациентки, биоинформатический анализ мутации гена *KNG1* с использованием ряда баз данных и веб-ресурсов. Результаты. При обработке данных полноэкзомного секвенирования нами обнаружен синонимичный вариант в гене *KNG1* (экзон 4, изоформа 1): NC_000003.12:g.186725098T>C. Пациентка является гетерозиготным носителем варианта, который, по данным TOPMED, встречается с частотой 0,000004 (1:264690). Однако этот синонимичный вариант не имеет данных о патогенности и не помечен в базе данных ClinVar. Анализ показал, что вариант является патогенным из-за изменений, затрагивающих сайт сплайсинга. Потеря функции возможна в положениях с 28 по 132 (цистатин-кининогеновый домен) и в положениях

Адрес для переписки:

Останкова Юлия Владимировна
ФБУН «Санкт-Петербургский НИИ эпидемиологии
и микробиологии имени Пастера» Федеральной службы
по надзору в сфере защиты прав потребителей
и благополучия человека
197101, Россия, Санкт-Петербург, ул. Мира, 14.
Тел.: 8 (812) 233-20-92.
E-mail: shenna1@yandex.ru

Address for correspondence:

Yulia V. Ostankova
Saint Petersburg Pasteur Institute
14 Mira St
St. Petersburg
197101 Russian Federation
Phone: +7 (812) 233-20-92.
E-mail: shenna1@yandex.ru

Образец цитирования:

Н.А. Печникова, Ю.В. Останкова, М.А. Сайтгалина,
А.М. Бебяков, Арег А. Тотолян «Оценка влияния редкого
синонимичного варианта гена *KNG1* на развитие
наследственного ангиоотека» // Медицинская
иммунология, 2024. Т. 26, № 1. С. 203-210.
doi: 10.15789/1563-0625-ATI-2840

© Печникова Н.А. и соавт., 2024

Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

N.A. Pechnikova, Yu.V. Ostankova, M.A. Saitgalina,
A.M. Bebyakov, Areg A. Totolian "Assessing the impact
of a rare synonymous variant in the *KNG1* gene on the
development of hereditary angioedema", *Medical Immunology
(Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2024, Vol. 26, no. 1,
pp. 203-210.
doi: 10.15789/1563-0625-ATI-2840

© Pechnikova N.A. et al., 2024

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

DOI: 10.15789/1563-0625-ATI-2840

со 120 по 628, среди которых особенно значимы положения 379-380/389-390 (где происходит расщепление калликреина), 380-389 (отвечает за образование Lys-брадикинина) и 381-389 (отвечает за образование брадикинина). Предположительно, выявленный вариант может приводить к развитию спорадических отеков несколькими путями, связанными с образованием брадикинина или его аналогов. А именно: (1) мутантный высокомолекулярный кининоген легче активируется калликреином и становится источником образования брадикинина посредством калликреин-кининовой системы; (2) механизм образования брадикинина претерпевает значительные изменения и приводит к образованию функционально активного, но aberrантного брадикинина, что изменяет его инактивацию ферментами с последующим увеличением периода полужизни; (3) изменения в положениях 380-389 приводят к изменениям в репродукции Lys-брадикинина, так что на последующих этапах он «легче» расщепляется до брадикинина аргининаминопептидазой. Таким образом, результаты нашего исследования указывают на возможную роль идентифицированного варианта гена *KNG1* в развитии НАО. Кроме того, результаты также подчеркивают важность дальнейших исследований синонимичных вариантов гена *KNG1*, которые могут пролить свет на этиологию заболевания.

Ключевые слова: первичные иммунодефициты, наследственный ангиоотек, анализ патогенности мутации, анализ *in silico*, *KNG1*, редкий синонимичный вариант

ASSESSING THE IMPACT OF A RARE SYNONYMOUS VARIANT IN THE *KNG1* GENE ON THE DEVELOPMENT OF HEREDITARY ANGIOEDEMA

Pechnikova N.A.^{a, b}, Ostankova Yu.V.^a, Saitgalina M.A.^a,
Bebyakov A.M.^a, Totolian Areg A.^{a, c}

^a Saint Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation

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

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

Abstract. The main cause of edema in hereditary angioedema (HAE) is due to elevated bradykinin levels, caused either by C1-INH deficiency/change in functional activity and caused by mutations in the *SERPING1* gene or by mutations in the *F12*, *PLG*, *ANGPT1*, *KNG1*, *MYOF* and *HS3ST6* genes with a normal level and functionality of the C1-esterase inhibitor. The aim of the work was *in silico* prognostic analysis of the rare synonymous variant NC_000003.12:g.186725098T>C in the *KNG1* gene and its impact on the development of HAE symptoms. The material was a whole blood sample obtained from a woman with clinical manifestations of hereditary angioedema without a decrease in the levels and function of the C1 inhibitor. The research methods included whole exome sequencing, bioinformatic analysis of the *KNG1* gene mutation using a number of databases and web resources. Results. When processing full-exome sequencing data, we detected a synonymous variant in the *KNG1* gene (exon 4, isoform 1): NC_000003.12:g.186725098T>C. The patient is a heterozygous carrier of the variant, with a frequency of 0.000004 (1:264690). Presumably, the identified variant can lead to the development of sporadic edema through several pathways that are associated with the formation of bradykinin or its analogues. Therefore, (1) the mutant high-molecular-weight kininogen is more easily activated by kallikrein and becomes a source of bradykinin formation through the kallikrein-kinin system; (2) the mechanism of bradykinin formation undergoes significant changes and results in the formation of functionally active but aberrant bradykinin, which alters its inactivation by enzymes with a consequent increase in its half-life, (3) the changes in positions 380-389 bring about modifications in Lys-bradykinin reproduction such that in subsequent steps it is “easily” cleaved to bradykinin by arginine aminopeptidase. The results of our study therefore indicate a possible role of the identified variant in the *KNG1* gene in the development of HAE.

Keywords: primary immunodeficiencies, hereditary angioedema, mutation pathogenicity analysis, *in silico* analysis, *KNG1*, rare synonymous variant

Introduction

Hereditary angioedema (HAE) is a rare autosomal disease classified as an orphan disease. Episodes of the disease are accompanied by a varied clinical course, always characterized by sporadic swelling of the subcutaneous and submucosal tissues, blocking the normal flow of lymphatic fluid or blood in different parts of the body: limbs, face, gastrointestinal tract, respiratory tract [11, 14]. The exact incidence and prevalence of HAE is unknown but is estimated to be between 1:10 000 and 1:150 000 per population [7, 9, 10], with a higher incidence in females, as estrogen, changes in hormonal status, contraception, etc. can be a trigger [5].

There is wide variability in the kinetics of attacks, with some attacks occurring rapidly and others lasting 5 days or more. Laryngeal edema is particularly dangerous, as it can lead to asphyxia; on average, 1 death per 20 HAE patients occurs [9]. In addition, untimely treatment of a choking attack can lead to permanent brain damage, blindness, and limb paralysis [2]. The problems with edema are related to the fact that the mechanisms of edema development are not related to an allergic reaction, and taking antihistamines/corticosteroids has no therapeutic effect, and that specific therapies are very limited (purified human C1-INH concentrate, tranexamic acid, danazol).

The main cause of edema in HAE is usually due to elevated bradykinin (BK) levels, caused either by C1-INH deficiency and caused by mutations in the *SERPING1* gene or by mutations in the *F12*, *PLG*, *ANGPT1*, *KNG1*, *MYOF* and *HS3ST6* genes [1, 4, 7, 12, 13]. More than 450 HAE-causing mutations are linked to the *SERPING1* gene [4] and cause deficiency or malfunction of C1 inhibitor, these mutations account for 85% of all HAE cases. The alterations observed result in uncontrolled activity of plasma kallikrein and F12a, and high production of bradykinin (BK). Consequently, the permeability of the vascular walls is disturbed and fluid accumulates in the tissues thus creating prerequisites for sporadic edema.

Mutations in genes *F12*, *PLG*, *ANGPT1*, *KNG1* are associated with activation of kallikrein-kinin system, which is characterized by complex biochemical cascades, disturbances in which lead to development of localized edema. The pathophysiological changes caused by mutations in these genes are well understood, although new mutations associated with HAE can be identified. For example, mutations in the *HS3ST6* and *MYOF* genes have recently been identified showing

that VEGF-mediated signal transduction is involved in the pathophysiology of the disease.

The identification of new mutations that may play a role in the pathogenesis of HAE and the development of genetic screening is an important step in understanding and treating the disease. Genetic testing for a few mutations remains one of the most informative methods to confirm the diagnosis of HAE. However, it is not always positive because only a small proportion of genetic abnormalities are considered to be conclusive evidence for the disease.

In some cases where the diagnosis is still in doubt, biological material obtained from a patient can be sent for full-exome sequencing. However, despite the possibility of obtaining a large body of mutation data with which to operate, evaluation or analysis of the effect of specific mutations or combinations of mutations on the organism remains a significant challenge. A similar situation is observed when analyzing mutations in genes directly linked to HAE, especially in HAE with mutations in *KNG1*.

It is for this reason that the application of bioinformatic analysis (*in silico* analysis), which includes a large arsenal of web-based applications aimed at assessing the impact of a mutation on a protein, has recently gained increasing interest [3, 12, 13]. This approach not only allows us to narrow down the genes but also the mutations that can provoke swelling in HAE.

Aim. *In silico* prognostic analysis of the rare synonymous variant NC_000003.12:g.186725098T>C in the *KNG1* gene and its impact on the development of HAE symptoms.

Materials and methods

We used a whole blood sample obtained from a 45-year-old patient who had spontaneous edema of unclear etiology since the age of 22. All procedures of the ethical standards of the institutional and/or international committee on research ethics and the Helsinki declaration of 1964 and its subsequent amendments or revisions of the ethical standards were followed. The study was conducted with the consent of the patient. The design of the study was approved by the local ethics committee of the St. Petersburg Pasteur Institute.

The DNA was isolated using a RIBO-PREP kit (CRIE, Moscow) from leucocyte rings. Concentration of DNA was determined using a Qubit dsDNA HS Assay Kit (Thermo Fisher Scientific Inc.). The quality of DNA was assessed using an Agilent 2100 Bioanalyzer capillary electrophoresis system (Agilent

Technologies Inc., USA). Full-exome sequencing was performed according to the manufacturer's protocol on the Illumina MiSeq platform. Bioinformatic analysis of the identified variant was done using the web application MutationTaster2021 (ENST00000265023) and included pathogenicity assessment and protein repositioning data [15]. Additionally, UniProt, ProteinAtlas, NCBI and PubMed databases were used in this study.

Results and discussion

Clinical data

In a 45-year-old woman from the age of 22 to the present, spontaneous swelling of the legs and hands periodically occurs. In recent years, the face sometimes swells, and abdominal pain syndrome is noted. The frequency of occurrence of edema is 1-2 times in 2-3 months, more often in the cold season. Angioedema triggers are severe frost, stress, overwork or psycho-emotional stress. Regression of angioedema occurs independently within a few hours and up to 1.5 days. Therapy with antihistamines in a standard and double dose, or parenteral administration of glucocorticoids are without effect. Previously, for diagnostic purposes, a laboratory examination was carried out to determine the level and activity of the C1 inhibitor, as well as the level of the C4 complement component. The quantity and/or functional activity of these analytes were within normal limits. A search for mutations in the *SERPINGI* gene was carried out: as a result of Sanger sequencing of all exons (1-8) and the region of exon-intron junctions of the *SERPINGI* gene, pathogenic or probably pathogenic mutations were not detected. The characteristic features of the disease anamnesis, clinical manifestations, and the results of laboratory examinations served as the basis for continuing the diagnostic search.

When processing full-exome sequencing data, we detected a synonymous variant in the *KNG1* gene (exon 4, isoform 1): NC_000003.12:g.186725098T>C (NP_001095886.1:p.Pro134=, rs1560063067). Thymine and cytosine substitutions are characteristic of this variant. The patient is a heterozygous carrier of the variant, which according to TOPMED occurs with a frequency of 0.000004 (1:264690). However, this synonymous variant does not have any pathogenicity data and is not labelled in the ClinVar database.

Analysis of the variant performed using MutationTaster2021 showed that the variant is pathogenic because of changes affecting the splicing site. Hence, the variant causes a slight increase in the gDNA acceptor site at position 7815 (estimate: original variant

0.7044, mutant variant 0.7559) and an increase at position 7816 (estimate: original variant 0.56/mutant variant 0.68). Moreover, changes affect the donor site at position 7823 (score: 0.47). Interestingly, this synonymous variant in the cDNA shows no changes in the stop codon (position 2147) and ATG start position (213). However, the observed substitution of nitrogenous bases affects a large number of protein positions (Table 1).

In particular, a loss of function is possible at positions 28 to 132 (cystatin kininogen domain) and at positions 120 to 628, among which positions 379-380/389-390 (where kallikrein cleavage occurs), 380-389 (responsible for Lys-bradykinin formation) and 381-389 (responsible for bradykinin formation) are particularly prominent.

Since bradykinin is a well-known mediator of HAE symptoms, we hypothesize that the identified variant in the *KNG1* gene leads to alterations in bradykinin release. Production of bradykinin occurs in a complex cascade of events and starts with hydrolysis of high molecular weight kininogen (HMWK) by plasma kallikrein or tissue kallikreins. Activation by kallikrein ultimately leads to the formation of the biologically active peptides BK and Lys-BK, which can further produce desArg9-BK and Lys-desArg9-BK when cleaved by kininase I.

In the following events, these kinins (BK, Lys-BK, desArg9-BK and Lys-desArg9-BK) exert their action via two different receptors: receptor bradykinin B1 (BKR1) and receptor bradykinin B2 (BKR2). It is activated by BKR2 when it contacts BK and Lys-BK, while desArg9-BK and Lys-desArg9-BK activate BKR1. Both the binding of BK and Lys-BK to BKR2 and the binding of desArg9-BK and Lys-desArg9-BK to BKR1 on endothelial cells leads to increasing vascular permeability [6, 8]. In *KNG1* gene variant leading to HAE, bradykinin release is higher than physiological levels and is associated with changes in the positions involved in its release.

Our analysis *in silico* of the identified synonymous variant revealed that the changes observed in the nitrogenous base substitution affect important positions involved in bradykinin formation: 379-380/389-390, 380-389 and 381-389. Presumably, the identified variant can lead to the development of sporadic edema through several pathways that are associated with the formation of bradykinin or its analogues.

Therefore, (1) the mutant high-molecular-weight kininogen is more easily activated by kallikrein and becomes a source of bradykinin formation through the kallikrein-kinin system; (2) the mechanism of

TABLE 1. CHANGES IN KNG1 PROTEIN UNDER THE CONDITIONS OF THE NP_001095886.1:p.Pro134= MUTATION ACCORDING TO MutationTaster2021 data

Start (AA)	End (AA)	Feature	Details	Effect
28	132	DOMAIN	Cystatin kininogen-type 1	might get lost (downstream of altered splice site)
120	153	REGION	O-glycosylated at one site only	might get lost (downstream of altered splice site)
142	142	DISULFID		might get lost (downstream of altered splice site)
145	145	DISULFID		might get lost (downstream of altered splice site)
151	254	DOMAIN	Cystatin kininogen-type 2	might get lost (downstream of altered splice site)
169	169	CARBOHYD	N-linked (GlcNAc...)	might get lost (downstream of altered splice site)
205	205	CARBOHYD	N-linked (GlcNAc...)	might get lost (downstream of altered splice site)
206	206	DISULFID		might get lost (downstream of altered splice site)
218	218	DISULFID		might get lost (downstream of altered splice site)
229	229	DISULFID		might get lost (downstream of altered splice site)
248	248	DISULFID		might get lost (downstream of altered splice site)
264	264	DISULFID		might get lost (downstream of altered splice site)
267	267	DISULFID		might get lost (downstream of altered splice site)
273	376	DOMAIN	Cystatin kininogen-type 3	might get lost (downstream of altered splice site)
294	294	CARBOHYD	N-linked (GlcNAc...) (complex)	might get lost (downstream of altered splice site)
311	311	CONFLICT	V -> A (in Ref. 3; BAF83528)	might get lost (downstream of altered splice site)
326	326	MOD_RES	Phosphothreonine	might get lost (downstream of altered splice site)
327	327	MOD_RES	Phosphothreonine	might get lost (downstream of altered splice site)
328	328	DISULFID		might get lost (downstream of altered splice site)
329	329	MOD_RES	Phosphoserine	might get lost (downstream of altered splice site)
332	332	MOD_RES	Phosphoserine	might get lost (downstream of altered splice site)
340	340	DISULFID		might get lost (downstream of altered splice site)
351	351	DISULFID		might get lost (downstream of altered splice site)
370	370	DISULFID		might get lost (downstream of altered splice site)
376	389	PEPTIDE	T-kinin. / FTId=PRO_0000372485	might get lost (downstream of altered splice site)
379	380	SITE	Cleavage; by kallikrein	might get lost (downstream of altered splice site)
380	389	PEPTIDE	Lysyl-bradykinin. / FTId=PRO_0000006687	might get lost (downstream of altered splice site)
381	389	PEPTIDE	Bradykinin. / FTId=PRO_0000006688	might get lost (downstream of altered splice site)
383	383	MOD_RES	4-hydroxyproline; partial	might get lost (downstream of altered splice site)
389	390	SITE	Cleavage; by kallikrein	might get lost (downstream of altered splice site)
401	401	CARBOHYD	O-linked (GalNAc...)	might get lost (downstream of altered splice site)

Table 1 (continued)

Start (AA)	End (AA)	Feature	Details	Effect
420	449	REPEAT		might get lost (downstream of altered splice site)
420	510	COMPBIAS	His-rich	might get lost (downstream of altered splice site)
431	434	PEPTIDE	Low molecular weight growth-promoting factor. / FTId=PRO_0000006690	might get lost (downstream of altered splice site)
450	479	REPEAT		might get lost (downstream of altered splice site)
480	510	REPEAT		might get lost (downstream of altered splice site)
533	533	CARBOHYD	O-linked (GalNAc...)	might get lost (downstream of altered splice site)
542	542	CARBOHYD	O-linked (GalNAc...)	might get lost (downstream of altered splice site)
546	546	CARBOHYD	O-linked (GalNAc...)	might get lost (downstream of altered splice site)
557	557	CARBOHYD	O-linked (GalNAc...)	might get lost (downstream of altered splice site)
571	571	CARBOHYD	O-linked (GalNAc...)	might get lost (downstream of altered splice site)
577	577	CARBOHYD	O-linked (GalNAc...)	might get lost (downstream of altered splice site)
593	593	CONFLICT	I -> T (in Ref. 5; AAO61092 and 11; AA sequence)	might get lost (downstream of altered splice site)
614	614	DISULFID	Interchain (between heavy and light chains)	might get lost (downstream of altered splice site)
628	628	CARBOHYD	O-linked (GalNAc...)	might get lost (downstream of altered splice site)

bradykinin formation undergoes significant changes and results in the formation of functionally active but aberrant bradykinin, which alters its inactivation by enzymes with a consequent increase in its half-life, (3) the changes in positions 380-389 bring about modifications in Lys-bradykinin reproduction such that in subsequent steps it is “easily” cleaved to bradykinin by arginine aminopeptidase.

Conclusion

The results of our study therefore indicate a possible role of the identified variant in the *KNG1* gene in the development of HAE. Additionally, the findings also underscore the importance of further studies of synonymous variants in the *KNG1* gene, which may shed light on the etiology of the disease.

References

1. Ariano A., D'Apolito M., Bova M., Bellanti F., Loffredo S., D'Andrea G., Intrieri M., Petraroli A., Maffione A.B., Spadaro G., Santacroce R., Margaglione M. A myoferlin gain-of-function variant associates with a new type of hereditary angioedema. *Allergy*, 2020, Vol. 75, no. 11, pp. 2989-2992.
2. Bork K., Brehler R., Witzke G., Boor S., Heineke W., Hardt J. Blindness, tetraspasticity, and other signs of irreversible brain damage in hereditary angioedema. *Ann. Allergy Asthma Immunol.*, 2017, Vol. 118, no. 4, pp. 520-521.
3. Bork K., Wulff K., Möhl B.S., Steinmüller-Magin L., Witzke G., Hardt J., Meinke P. Novel hereditary angioedema linked with a heparan sulfate 3-O-sulfotransferase 6 gene mutation. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2021, Vol. 148, no. 4, pp. 1041-1048.
4. Busse P.J., Christiansen S.C. Hereditary Angioedema. *N. Engl. J. Med.*, 2020, Vol. 382, pp. 1136-1148.
5. Kulkarni M., Travers J.B., Rohan C. High estrogen states in hereditary angioedema: a spectrum. *Clin. Rev. Allergy Immunol.*, 2021, Vol. 60, no. 3, pp. 396-403.
6. Leeb-Lundberg L.M.F., Marceau F., Muller-Esterl W., Pettibone D.J., Zuraw B.L. International Union of Pharmacology. XLV. Classification of the kinin receptor family: from molecular mechanisms to pathophysiological consequences. *Pharmacol. Rev.*, 2005, Vol. 57, no. 1, pp. 27-77.

7. Longhurst H.J., Bork K. Hereditary angioedema: an update on causes, manifestations and treatment. *Br. J. Hosp. Med. (Lond.)*, 2019, Vol. 80, no. 7, pp. 391-398.
8. Marceau F., Hess J.F., Bachvarov D.R. The B1 receptors for kinins. *Pharmacol. Rev.*, 1998, Vol. 50, pp. 357-386.
9. Minafra F.G., Gonçalves T.R., Alves T.M., Pinto J.A. The mortality from hereditary angioedema worldwide: a review of the real-world data literature. *Clin. Rev. Allergy Immunol.*, 2022, Vol. 62, pp. 232-239.
10. Nordenfelt P., Nilsson M., Björkander J., Mallbris L., Lindfors A., Wahlgren C.-F. Hereditary angioedema in Swedish adults: report from the national cohort. *Acta Derm. Venereol.*, 2016, Vol. 96, no. 4, pp. 540-545.
11. Papadopoulou-Alataki E. Upper airway considerations in hereditary angioedema. *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.*, 2010, Vol. 10, no. 1, pp. 20-25.
12. Pechnikova N.A., Ostankova Yu.V., Saitgalina M.A., Bebyakov A.M., Denisova A.R., Podchernyaeva N.S., Totolian A.A. Applying bioinformatic analysis for prognostic assessment of the HS3ST6 missense mutations clinical significance in the development of hereditary angioedema. *Medical Immunology (Russia)*, 2023, Vol. 25, no. 1, pp. 135-154. (In Russ.) doi: 10.15789/1563-0625-ABA-2577.
13. Pechnikova N.A., Ostankova Yu.V., Saitgalina M.A., Bebyakov A.M., Denisova A.R., Totolian A.A. Pathogenicity analysis of the new missense mutation in the MYOF gene detected in a female patient with hereditary angioedema with normal level of C1-inhibitor. *Pediatrics n. a. G.N. Speransky*, 2023, Vol. 102, no. 2, pp. 139-146.
14. Rosi-Schumacher M., Shah S.J., Craig T., Goyal N. Clinical manifestations of hereditary angioedema and a systematic review of treatment options. *Laryngoscope Investig. Otolaryngol.*, 2021, Vol. 6, no. 3, pp. 394-403.
15. Steinhaus R., Proft S., Schuelke M., Cooper D.N., Schwarz J.M., Seelow D. MutationTaster2021. *Nucleic Acids Res.*, 2021, Vol. 49, no. W1, pp. W446-W451.

Авторы:

Печникова Н.А. — младший научный сотрудник лаборатории иммунологии и вирусологии ВИЧ-инфекции ФБУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека; студентка биологического факультета ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет», 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» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Санкт-Петербург, Россия

Сайтгалина М.А. — младший научный сотрудник лаборатории молекулярной иммунологии ФБУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Санкт-Петербург, Россия

Authors:

Pechnikova N.A., Junior Research Associate, Laboratory of Immunology and Virology HIV, Saint Petersburg Pasteur Institute; Student, Faculty of Biology, St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russian Federation

Ostankova Yu.V., PhD (Biology), Head, Laboratory of Immunology and Virology HIV, Senior Research Associate, Laboratory of Molecular Immunology, Saint Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation

Saitgalina M.A., Junior Research Associate, Laboratory of Molecular Immunology, Saint Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation

Бебьяков А.М. — лаборант-исследователь лаборатории иммунологии и вирусологии ВИЧ-инфекции ФБУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Санкт-Петербург, Россия

Bebyakov A.M., Laboratory Research Assistant, Laboratory of Immunology and Virology HIV, Saint Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation

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» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека; заведующий кафедрой иммунологии ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Totolian Areg A., PhD, MD (Medicine), Professor, Full Member, Russian Academy of Sciences, Head, Laboratory of Molecular Immunology, Director of Saint Petersburg Pasteur Institute; Head, Department of Immunology, First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Поступила 15.04.2023
Принята к печати 24.05.2023

Received 15.04.2023
Accepted 24.05.2023

КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ АНАЛИЗ ПРОТЕКТИВНОЙ АКТИВНОСТИ Т-КЛЕТОЧНОГО ИММУНИТЕТА К ВОЗБУДИТЕЛЮ БРУЦЕЛЛЕЗА

Пономаренко Д.Г., Костюченко М.В., Ракитина Е.Л.,
Логвиненко О.В., Хачатурова А.А., Лукашевич Д.Е., Курчева С.А.,
Русанова Д.В., Куличенко А.Н.

ФКУЗ «Ставропольский противочумный институт» Роспотребнадзора, г. Ставрополь, Россия

Резюме. Представлены результаты по изучению взаимосвязи антигенреактивности популяции Т-лимфоцитов в условиях *ex vivo* и напряженности протективного поствакцинального иммунитета к возбудителю бруцеллеза. Учитывая особенности иммунопатогенеза бруцеллеза и превалирующую роль адаптивного Т-клеточного иммунитета для защиты от возбудителя инфекции в качестве важнейшего аспекта проблем бруцеллеза рассматривается вопрос возможности прогностической оценки протективного иммунитета против бруцеллеза с использованием КАСТ-тестов. Очевидна необходимость корреляционного анализа *ex vivo* активности антиген-стимуляции Т-клеток и напряженности протективного иммунитета, сформировавшегося после вакцинации. Была установлена тесная прямая пропорциональная связь между количеством вводимых живых микробных клеток вакцинного штамма *Brucella abortus* 19-ВА и увеличением уровня *ex vivo* активации CD3-клеток. Выявлена тесная корреляция ($r = -0,841 \div -0,966$, $R^2 = 0,708 \div 0,969$) величины *ex vivo* антиген-индуцированной стимуляции CD3-лимфоцитов и уровня поствакцинальной иммунологической защиты против бруцеллезной инфекции. Показано, что у вакцинированных против бруцеллеза биомоделей при значении коэффициента стимуляции Т-лимфоцитов 50% и более (по интенсивности антиген-индуцированной *ex vivo* экспрессии CD25) обеспечивается 100%-ная защита от развития бруцеллезной инфекции после заражения *Brucella melitensis* в дозе 1×10^3 живых микробных клеток. Вместе с тем отмечено отсутствие тесной коррелятивной связи увеличения дозы вводимого биомоделям вакцинного штамма бруцелл и изменения среднего геометрического титра антител ($R^2 = 0,357 \div 0,404$), наличие слабо выраженной связи уровня агглютининов с иммунологической защитой биомоделей от развития бруцеллезной инфекции и показателями бактериальной обсемененности организма. По результатам исследования продемонстрирована возможность количественно оценивать формирование и протективную активность Т-клеточного иммунитета к возбудителю бруцеллеза на основании анализа

Адрес для переписки:

Пономаренко Дмитрий Григорьевич
ФКУЗ «Ставропольский противочумный институт»
Роспотребнадзора
355035, Россия, г. Ставрополь, ул. Советская, 13-15.
Тел.: 8 (8652) 23-01-65 (доб. 119).
Тел./факс: 8 (8652) 26-03-12.
E-mail: ponomarenko.dg@gmail.com

Address for correspondence:

Dmitry G. Ponomarenko
Stavropol Anti-Plague Institute
13-15 Sovetskaya St
Stavropol
355035 Russian Federation
Phone: +7 (8652) 23-01-65 (acc. 119).
Phone/fax: +7 (8652) 26-03-12.
E-mail: ponomarenko.dg@gmail.com

Образец цитирования:

Д.Г. Пономаренко, М.В. Костюченко, Е.Л. Ракитина,
О.В. Логвиненко, А.А. Хачатурова, Д.Е. Лукашевич,
С.А. Курчева, Д.В. Русанова, А.Н. Куличенко
«Количественный анализ протективной активности
Т-клеточного иммунитета к возбудителю бруцеллеза»
// Медицинская иммунология, 2024. Т. 26, № 1.
С. 211-220.
doi: 10.15789/1563-0625-QAO-2604
© Пономаренко Д.Г. и соавт., 2023
Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

D.G. Ponomarenko, M.V. Kostyuchenko, E.L. Rakitina,
O.V. Logvinenko, A.A. Khachaturova, D.E. Lukashevich,
S.A. Kurcheva, D.V. Rusanova, A.N. Kulichenko
“Quantitative analysis of protective T cell immunity against
brucellosis”, *Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya
Immunologiya*, 2024, Vol. 26, no. 1, pp. 211-220.
doi: 10.15789/1563-0625-QAO-2604
© Ponomarenko D.G. et al., 2023
The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License
DOI: 10.15789/1563-0625-QAO-2604

уровня антигенреактивности CD3-лимфоцитов *ex vivo*. Анализ корреляции состояния антигенреактивности Т-лимфоцитов и иммунологической устойчивости к бруцеллезной инфекции указал на высокую степень тесноты этих показателей. Ключевое влияние на активность протективного иммунитета оказывает уровень антигенреактивности Т-лимфоцитов, при этом к наиболее информативному показателю активности иммунологической защиты можно отнести коэффициент антигенной стимуляции популяции CD3⁺CD25⁺. Полученные данные и описанный методический подход можно использовать в качестве прогностического критерия при оценке защитного уровня клеточного иммунитета к возбудителю бруцеллеза у вакцинированных или переболевших, а также с целью анализа эффективности специфической профилактики бруцеллеза и изучения иммуногенности, протективных свойств кандидатных препаратов противобруцеллезных вакцин.

Ключевые слова: бруцеллез, вакцинация, протективный иммунитет, антигенреактивность Т-лимфоцитов, коэффициент антигенной стимуляции, индекс инфицированности

QUANTITATIVE ANALYSIS OF PROTECTIVE T CELL IMMUNITY AGAINST BRUCELLOSIS

Ponomarenko D.G., Kostyuchenko M.V., Rakitina E.L.,
Logvinenko O.V., Khachaturova A.A., Lukashevich D.E.,
Kurcheva S.A., Rusanova D.V., Kulichenko A.N.

Stavropol Anti-Plague Institute, Stavropol, Russian Federation

Abstract. We present the results of studies related to antigen reactivity of T lymphocyte population under *ex vivo* conditions and the intensity of protective post-vaccination immunity to causative agent of brucellosis. Due to peculiarities of immunopathogenesis in brucellosis infection and prevailing role of adaptive T cell immunity for protection against the causative agent of infection, a predictive evaluation of protective immunity against brucellosis using CAST-tests is considered the most important issue in the field. There is an obvious need for *ex vivo* analysis of correlations between the activity of antigen stimulation of T cells, and the intensity of protective immunity raised after vaccination. A close direct relationship was established between the number of live microbial cells of *Brucella abortus* 19BA vaccine strain administered, and increase in *ex vivo* CD3 cell activation. A close correlation ($r = -0.841 \div -0.966$, $R^2 = 0.708 \div 0.969$) was revealed between *ex vivo* values of antigen-induced stimulation of CD3 lymphocytes, and the levels of post-vaccination immunological protection against brucellosis infection. We have shown that, in biomodels vaccinated against brucellosis with a T lymphocyte stimulation coefficient of 50% or more (according to intensity of antigen-induced *ex vivo* CD25 expression), 100% protection against brucellosis infection was achieved after contamination with *Brucella melitensis* at a dose of 1×10^3 live microbial cells. At the same time, a lack of a close correlation was noted between an increased dose of *Brucella* vaccine strain administered to biomodels, and a change in geometric mean of antibody titer ($R^2 = 0.357 \div 0.404$), along with a weak relationship between the levels of agglutinins and immunological protection of biomodels from developing brucellosis infection and indices of *in vivo* bacterial contamination.

These results suggest an opportunity to quantify development and protective activity of T cell immunity to the causal agent of brucellosis based *ex vivo* levels of antigen reactivity of CD3 lymphocytes. A correlation analysis between the state of T cell antigen reactivity and immunological resistance to brucellosis infection indicated a high degree of closeness between these indices. The key influence on activity of protective immunity is exerted by the levels of antigen reactivity of T lymphocytes, whereas the quotient of antigenic stimulation in CD3⁺CD25⁺ population may be considered the most informative index of immune protective activity. The data obtained and the described methodology may be used as a predictive criterion in assessing protective level of cellular immunity to causative agent of brucellosis in vaccinated or recovering patients, testing the efficiency of specific prophylaxis in brucellosis and studying immunogenicity and protective properties of candidate vaccines against brucellosis.

Keywords: brucellosis, vaccination, protective immunity, antigen reactivity of T lymphocytes, antigenic stimulation coefficient, infection index

Введение

Бруцеллезная инфекция может рассматриваться как модель для изучения формирования и эффективности адаптивного иммунитета (естественного и индуцированного) в отношении внутриклеточных бактериальных инфекций, при которых врожденные факторы иммунологической защиты слабоэффективные и зачастую даже опосредуют сохранение («приживаемость») патогена в организме хозяина, приводя к хронизации инфекции [1].

Известно, что бруцеллы используют стратегию «скрытого» (stealthy strategy) проникновения в организм хозяина, ингибируют интенсивность иммунновоспалительных реакций, уклоняются от эффекторов врожденного иммунитета (нейтрофилы, макрофаги, дендритные клетки, НК-клетки, система комплемента и др.), в том числе за счет моделирования их защитных функций [9]. Помимо способности противостоять цитотоксическим (киллинговым) внутриклеточным механизмам фагоцитов, бруцеллы инициируют активный синтез клетками Treg (CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺) IL-10 – противовоспалительного цитокина, что обеспечивает подавление секреции IFN γ , тем самым ингибируя иммунную активацию профессиональных макрофагов и напряженность иммунологических реакций по воспалительному типу [16, 21].

Вместе с тем бруцеллы индуцируют цитокин-опосредованное нарушение процессов трансмиссии от врожденного иммунитета к приобретенному, что в итоге способствует гипеергии Th1-иммунного ответа (подавление синтеза IL-2, IFN γ , IL-12 и др., экспрессия антигенов МНС-II и костимуляция макрофагов) и формированию достаточно относительного и непродолжительного постинфекционного протективного иммунитета. Доказано, что PgpA (пропил-рацемеза) *Brucella* spp. способствует активной пролиферации В-лимфоцитов (активация Th2-иммунного ответа), синтезу моноцитами и регуляторными Т-клетками IL-10, подавлению продукции IFN γ , TNF α и усилению синтеза антипролиферативного фактора TGF- β 1 клетками ММС [14, 19].

Многими исследователями было показано, что протективный иммунитет против возбудителя бруцеллеза обеспечивается главным образом специфической активностью иммунного ответа Th1-типа (с эффективной антигенпрезентацией фагоцитами, экспрессией провоспалительных цитокинов) и эффекторной клеточно-опосредованной цитотоксичностью за счет профессиональных макрофагов и лимфоцитов CD3⁺CD8⁺ [13, 18, 20].

По результатам ранее проведенных нами исследований впервые была показана возможность и перспектива применения клеточного антиген-специфического теста (КАСТ-теста) для диагно-

стики бруцеллеза, анализа динамики антигенреактивных CD3⁺CD4⁺, CD3⁺CD8⁺ лимфоцитов после иммунизации против бруцеллеза, а также оценки фактической привитости людей против бруцеллезной инфекции в разные периоды после вакцинации [3, 4, 12].

Учитывая особенности иммунопатогенеза бруцеллеза и превалирующую роль адаптивного Т-клеточного иммунитета для защиты от возбудителя инфекции в качестве важнейшего аспекта проблем бруцеллеза рассматривается вопрос определения диагностически информативных критериев для оценки наличия и активности протективного иммунитета, опосредованного Т-клетками. Вместе с тем требует решения вопрос возможности прогностической оценки протективного иммунитета против бруцеллеза с использованием КАСТ-тестов. Очевидна необходимость корреляционного анализа *ex vivo* активности антиген-стимуляции Т-клеток и напряженности протективного иммунитета, сформировавшегося после вакцинации.

Цель – провести анализ особенностей формирования поствакцинального иммунитета к возбудителю бруцеллеза, в зависимости от иммунизирующей дозы, и оценку состояния протективного иммунитета на основе исследования антигенреактивности Т-лимфоцитов *ex vivo*.

Материалы и методы

Для моделирования инфекции и оценки специфического иммунитета использовали 288 SHK мышей самцов весом 20 \pm 2 г. Биомодели были рандомизированы на 4 группы: мыши из групп № 1, № 2 и № 3 были привиты вакцинным штаммом *Brucella (B.) abortus* 19ВА («Микроген», Россия). Животным опытных групп вводили бактериальные суспензии в дозировках 10³, 10⁵ и 10⁸ живых микробных клеток (ж. м. к.) в 500 мкл 0,9%-ного раствора NaCl. Иммунизировали мышей подкожно в область паха. В качестве контроля использовали особей 4-й группы, им инъецировали 500 мкл стерильного физраствора. До введения вакцинного штамма, а также через 7, 14, 30, 60 и 90 суток после вакцинации у 10 особей из каждой группы брали кровь для иммунологических исследований. Уровень антигенреактивных Т-лимфоцитов определяли с применением КАСТ, анализируя на проточном цитометре (FACS Calibur, Becton Dickinson, США) фоновое количество CD3⁺CD25⁺, CD3⁺МНС-II⁺ (BD Pharmingen, США) и численность этих популяций после инкубации с бруцеллезным антигеном. Учет реакции антигенной активации популяции CD3⁺ лимфоцитов осуществляли по интенсивности экспрессии рецепторов CD25 и МНС-II с последующим расчетом коэффициента антигенной стимуляции [6].

Для *ex vivo* стимуляции лимфоцитов применяли антигенный белково-полисахаридный комплекс из штамма *B. abortus* 19 с концентрацией белка $5,0 \pm 0,2$ мг/мл. Получение, контроль бруцеллезного антигена и проведение цитометрических исследований осуществляли в соответствии с МР 3.1.0207-20 [6]. Вместе с тем во все сроки исследования у биомоделей определяли специфические антитела в пробирочной реакции агглютинации с последующим расчетом средних значений геометрического титра антител (СГТ), путем перевода абсолютных значений титров в логарифмы с основанием 2 (\log_2). Для выявления специфических антител к бруцеллам применяли «Диагностикум бруцеллезный жидкий для реакции агглютинации, суспензия для диагностических целей» (Ставропольский противочумный институт, Россия).

На 90-й день после иммунизации, вакцинированных (по 12 жив. от каждой группы) и контрольных биомоделей заражали подкожно в паховую область двухсуточной вирулентной культурой *Brucella melitensis* 16-М в дозе 1×10^3 живых микробных клеток в 0,5 мл стерильного изотонического раствора. На 21-е сутки после инфицирования производили убой и бактериологическое исследование биоматериала от животных. Исследовали паховые, аксиллярные, парааортальные лимфатические узлы, селезенку и печень. Материал засеивали в пробирки с Бруцеллагаром и Бруцелла-бульоном (ФБУН ГНЦ ПМБ, Россия). Посевы инкубировали 14 суток в термостате при температуре $37 \pm 0,5$ °С. Просмотр посевов в пробирках с агаром и бульоном проводили каждые 2 дня, из помутневших бульонов делали высевы в пробирки со скошенным агаром (посевы из бульона культивировали не менее 14 суток).

Индекс инфицированности (ИИ) организма биомоделей после заражения патогенным штаммом бруцелл вычисляли по формуле:

$$x = \frac{a \cdot 100}{b \cdot c},$$

где x – индекс инфицированности (%), a – число выделенных культур, b – количество животных в группе, c – количество объектов (органы, ткани), отобранных от одной биомодели. Вместе с тем рассчитывали индекс интенсивности обсеменения внутренних органов (ИИОВО), который определяли путем деления суммы баллов, характеризующих интенсивность роста бруцелл, на число исследуемых объектов, умноженное на 4. Интенсивность роста культур бруцелл оценивали по 4-балльной системе [2, 10].

Работа с культурами бруцелл и биоматериалом от инфицированных ими биомоделей, иммунологические, биологические и бактериологические исследования были проведены в соответствии с СанПиН 3.3686-21 [11] и МУК 3.1.7.3402-16 [7], МУ 3.3.2.2124-06 [8].

Для статистической обработки полученных результатов применяли аналитический пакет Microsoft Excel 2010. Рассчитывали среднюю (x_{cp}), интервал ($\min \div \max$), медиану (Me) и показатель корреляции (r) по методу Пирсона. Связь между переменными учитывали по шкале Е.П. Голубкова. Различия считали статистически значимыми при $p \leq 0,05$. Вместе с тем проводили регрессионный анализ влияния уровня антигенреактивности $CD3^+CD25^+$, $CD3^+MHC-II^+$ и средних значений геометрического титра антител на индексы инфицированности и интенсивности обсеменения внутренних органов организма биомоделей из групп сравнения, после заражения патогенным штаммом бруцелл.

Результаты и обсуждение

При обследовании экспериментальных животных перед вакцинацией были выявлены в целом сходные значения спонтанной (фоновой) и индуцированной бруцеллезным антигеном экспрессии $CD3$ -лимфоцитами рецепторов $CD25$ и $MHC-II$. Что указывает на отсутствие неспецифического активирующего действия бруцеллезного антигена на лимфоциты в условиях *in vitro*.

Интерлейкин-2 и его рецептор (IL-2R) относят к основным факторам роста, который участвует в регуляции клональной экспансии антиген-активированных Т-клеток. При антигенной индукции на мембране Т-клеток в составе гетеродимерного комплекса экспрессируется α -субъединица ($CD25$, рецептора IL-2ra). Взаимодействие IL-2 с TCR стимулирует рекрутинг интактных Т-клеток для пролиферации. Интенсивная экспрессия Т-лимфоцитами α -цепи высокоаффинного рецептора IL-2 отражает наиболее раннюю антигенную активацию Т-клеток [5, 15].

Анализ динамики количества $CD25$ -позитивных Т-лимфоцитов у биомоделей 1-й группы (доза вакцины 1×10^3 ж.м.к.) показал, что в процессе развития иммунологической реакции после вакцинации наблюдается увеличение пула Т-клеток, экспрессирующих рецепторы к IL-2 в сроки до 30 суток с последующим их снижением к 90-м суткам до уровня контрольных животных. Так, на 7-е сутки после иммунизации медианные значения антигенреактивности $CD3^+CD25^+$ лимфоцитов, рассчитанные по коэффициенту стимуляции, составили 17,05% в среднем, в этот срок антигениндуцированная экспрессия Т-клеткам антигена IL-2ra составила $16,66 \pm 0,68\%$. На 14-е, 30-е сутки после иммунизации медиана значений коэффициента стимуляции антигенреактивных $CD3^+CD25^+$ лимфоцитов незначительно увеличилась до 22,46% ($21,69 \pm 1,15\%$) и 29,43% ($29,86 \pm 1,47\%$) соответственно. На 60-е и 90-е сутки после иммунизации *Brucella abortus* 19-ВА в дозе 1×10^3 ж.м.к. отмечается снижение

КС Т-клеток: Ме 18,05% (18,24 ± 1,49%) и 12,50% (16,63 ± 2,82%) соответственно.

У животных 2-й группы (доза вакцины 1×10^5 ж. м. к.) на 7-е сутки после иммунизации уровень КС Т-лимфоцитов по экспрессии CD25 увеличился более чем в 3 раза, до 34,6 ± 2,23% (Ме = 33,9%) в сравнении с данными до вакцинации 10,95 ± 1,13% (Ме = 10,34%). На 14-е сутки количество антигенреактивных CD3⁺CD25⁺ лимфоцитов увеличилось в среднем до 40,28 ± 2,49% (Ме = 40,15%) с последующим постепенным снижением на 30-е, 60-е и 90-е сутки: 34,52 ± 1,72% (Ме = 32,44%), 24,50 ± 1,44% (Ме = 24,75%) и 25,92 ± 1,84% (Ме = 24,73%).

Наиболее показательна динамика *ex vivo* реакции Т-лимфоцитов на антигенную стимуляцию в 3-й опытной группе мышей, иммунизированных наиболее высокой дозой *Brucella abortus* 19-ВА (1×10^8 ж. м. к.). У биомоделей 3-й группы во все сроки наблюдения отмечались самые высокие значения антигенной активации популяции Т-лимфоцитов из всех экспериментальных групп. На 7-е сутки после введения вакцинного штамма регистрировалось более чем пятикратное увеличение коэффициента антигенной стимуляции CD3⁺CD25⁺ – 51,76 ± 2,32% (Ме = 52,04%). На 14-е сутки медианные значения КС пула CD3⁺CD25⁺ еще незначительно увеличились до 57,86 ± 2,30% (Ме = 56,80%). В сроки на 30-е, 60-е и 90-е сутки после иммунизации КС при антигенной активации Т-лимфоцитов составил в среднем 55,44 ± 2,06% (Ме = 54,74%), 49,94 ± 1,33% (Ме = 48,48) и 50,84 ± 1,59% (Ме = 51,63%) соответственно (рис. 1).

Интерес представляют результаты изучения динамики фоновой и индуцированной антигеном экспрессии Т-лимфоцитами молекул II класса главного комплекса гистосовместимости

(МНС). Молекулы МНС-II участвуют в регуляции распознавания Т-лимфоцитами чужеродных антигенов (активация TCR) и контроле прайминга Т-клеток. Активированные CD4⁺МНС-II⁺ костимулируют синтез Th1-цитокинов и внеклеточную гибель патогенов. Вместе с тем основная функция МНС-II заключается в представлении процессированных экзогенных антигенов CD4⁺Т-лимфоцитам. Молекулы МНС класса II имеют решающее значение для инициации антиген-специфического иммунного ответа. Активная экспрессия Т-лимфоцитами молекулы МНС-II может в полной мере отражать «зрелый» и длительный функциональный аффинитет активированных Т-клеток [5, 17].

В процессе развития поствакцинального иммунитета у биомоделей после иммунизации вакцинным штаммом бруцелл отмечалось постепенное прогрессирующее увеличение количества антигенреактивных CD3⁺МНС-II⁺ клеток, при этом во всех опытных группах наблюдалась схожая динамика. У животных 1-й группы на 7-е сутки после иммунизации медианные значения антигенреактивности CD3⁺МНС-II⁺ лимфоцитов, рассчитанные по коэффициенту стимуляции, составили 12,28% (12,35 ± 0,80%) и практически не отличались от аналогичных значений в контрольной группе Ме = 13,37 (13,26 ± 0,82%). В последующие сроки наблюдения с 14-х до 60-е сутки отмечается увеличение интенсивности антигенной активации CD3⁺МНС-II⁺ лимфоцитов – Ме КС составили 17,52% (18,17 ± 1,60%), 39,36% (42,04 ± 2,35%) и 45,02% (44,89 ± 1,62%) с последующим снижением к 90-м суткам до 35,07% (35,01 ± 1,27%).

У животных опытной группы № 2 (10^5 ж. м. к.) значения *ex vivo* антигенной активации практически не отличались от таковых у биомоделей группы

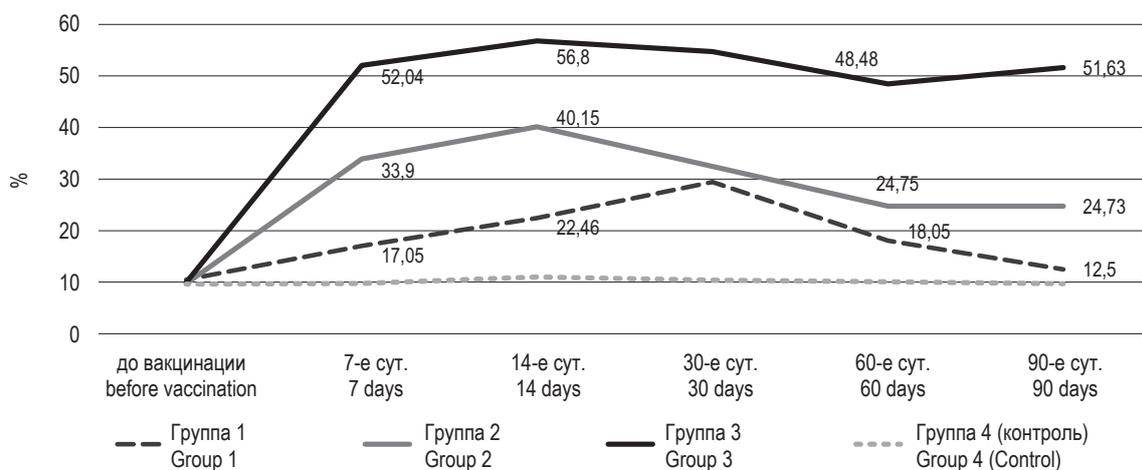


Рисунок 1. Динамика значений коэффициента антигенной стимуляции CD3⁺CD25⁺ лимфоцитов у биомоделей из групп сравнения

Figure 1. Dynamics of values of antigenic stimulation coefficient CD3⁺CD25⁺ lymphocytes in biomodels from comparison groups

№ 1. Медианное количество антигенреактивного пула CD3⁺МНС-II⁺ на 7-е сутки после иммунизации составило 14,31% (14,07±0,76%), 14-е сутки – 21,98% (21,87±1,92%), 30-е сутки – 42,12% (42,52±1,77%), 60-е сутки – 46,93% (47,03±2,05%), 90-е сутки – 42,74% (42,22±2,21%).

Статистически значимо высокие значения интенсивности антиген-индуцированной экспрессии Т-лимфоцитами молекул II класса главного комплекса гистосовместимости регистрировали в 3-й группе мышей, иммунизированных самой высокой дозой вакцинного штамма – 10⁸ ж.м.к. *B. abortus* 19ВА. На 7-е сутки после иммунизации КС составил в среднем 19,61±1,22% (Ме = 18,30%), 14-е сутки – 27,21±2,96% (Ме = 25,74%), 30-е сутки – 53,88±2,48% (Ме = 56,77%), 60-е сутки – 49,54±1,37% (Ме = 50,00%), 90 сут. – 42,19±1,59% (Ме = 43,18%) (рис. 2).

По результатам цитометрических исследований было установлено, что вне зависимости от срока наблюдения наиболее интенсивная активация пулов CD3⁺CD25⁺ и CD3⁺МНС-II⁺ клеток отмечалась в группе животных, иммунизированных наиболее высокой дозой *Brucella abortus* 19ВА (1 × 10⁸ ж. м. к.). Анализ тесноты связи динамики уровня интенсивности экспрессии рецепторов активации и увеличения количества вводимых ж.м.к. вакцинного штамма бруцелл указал на наличие прямой прямо пропорциональной зависимости. Высокой тесны связь установлена с динамикой антигенреактивного пула CD3⁺CD25⁺. Так, на 7-е сут. коэффициент линейной корреляции составил r = 0,844, 14-е сут. – r = 0,803, 30-е сут. – r = 0,843, 60-е сут. – r = 0,932 и 90-е сут. – r = 0,940. Значения корреляционного соотношения иммунизирующей дозы (ж.м.к. *Brucella abortus* 19-ВА) и интенсивности антигенреактивности CD3⁺МНС-II⁺ имели тенденцию к сниже-

нию в динамике наблюдения и составили на 7-е сут. r = 0,928, 14-е сут. r = 0,666, 30-е сут. r = 0,692, 60-е сут. r = 0,419 и 90-е сут. r = 0,473.

Результаты анализа сероконверсии у биомоделей в динамике на 7-й, 14-й, 30-й, 60-й и 90-й день после вакцинации во всех опытных группах были выявлены в целом сходные значения СГТ противобруцеллезных антител (log₂), особенно во 2-й и 3-й группах биомоделей. Наивысший уровень (пик) титров антител был выявлен на 14-е сутки после вакцинации с последующим постепенным снижением (табл. 1). Анализ наличия и силы корреляции увеличения дозы вакцины и изменения СГТ указал на отсутствие выраженной коррелятивной связи. На 7-е сутки после иммунизации в группах сравнения выявлено очень слабое соотношение (r = 0,404), а в последующие сроки наблюдения корреляция отсутствовала (14-е сут. – 0,362, 30-е сут. – 0,357, 60-е сут. – 0,358 и 90-е сут. – 0,369).

В результате проведения биологических и бактериологических исследований было установлено, что после заражения мышей референтным патогенным штаммом *B. melitensis* 16М (1 × 10³ ж. м. к.) у 100% особей контрольной группы регистрировалось развитие бруцеллезной инфекции, из которых 25% с регионарной, 75% с генерализованной инфекцией, ИИ составил 73,3%, ИИОВО – 0,521 ед. Среди животных 1-й группы у 9 особей (75%) был исследованиями подтвержден бруцеллез (55% – регионарная, 45% – генерализованная инфекция), ИИ составил 31,7%, ИИОВО – 0,204. В результате инфицирования мышей из 2-й группы только у 41,7% отмечалось развитие бруцеллеза, из которых у 80% – регионарная, 20% – генерализованная инфекция), ИИ составил 21,7%, ИИОВО – 0,108. У животных 3-й группы не регистрировалось развитие бруцел-

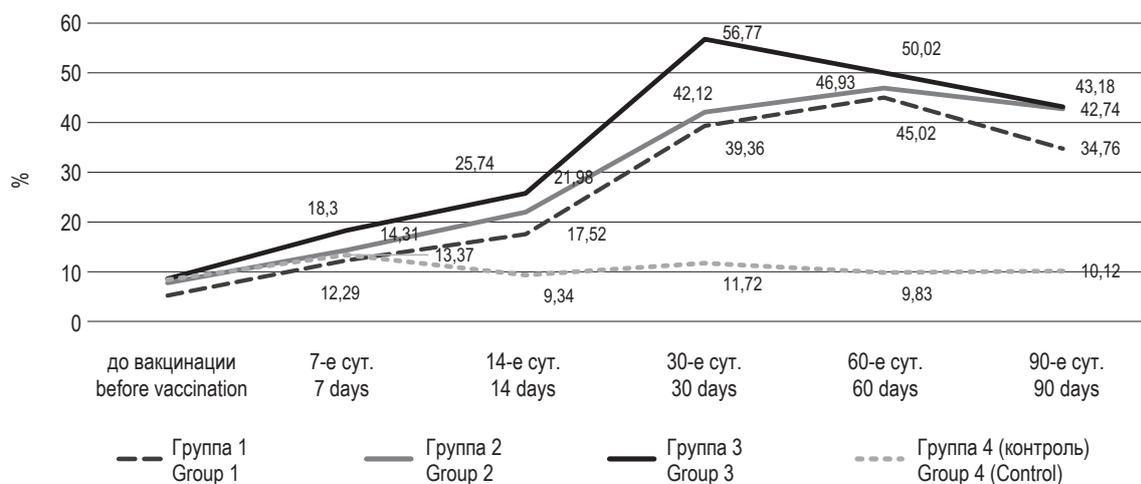


Рисунок 2. Динамика значений коэффициента антигенной стимуляции CD3⁺МНС-II⁺ лимфоцитов у биомоделей из групп сравнения

Figure 2. Dynamics of values of antigenic stimulation coefficient CD3⁺МНС-II⁺ lymphocytes in biomodels from comparison groups

ТАБЛИЦА 1. ЗНАЧЕНИЯ СРЕДНЕГО ГЕОМЕТРИЧЕСКОГО ТИТРА ПРОТИВОБРУЦЕЛЛЕЗНЫХ АНТИТЕЛ У БИОМОДЕЛЕЙ ИЗ ГРУПП СРАВНЕНИЯ В ДИНАМИКЕ РАЗВИТИЯ ПОСТВАКЦИНАЛЬНОГО ИММУНИТЕТА

TABLE 1. VALUES OF MEAN GEOMETRIC TITER ANTI-BRUCELLOSIS ANTIBODIES IN BIOMODELS FROM COMPARISON GROUPS IN DYNAMICS OF POST-VACCINATION IMMUNITY DEVELOPMENT

Группы Groups	до вакцинации before vaccination	СГТ противобруцеллезных антител (\log_2) после иммунизации различными дозами <i>B. abortus</i> 19-BA MGT anti-brucellosis antibodies (\log_2) after immunization with various doses <i>B. abortus</i> 19-BA				
		через 7-е сут. after 7 days	через 14-е сут. after 14 days	через 30-е сут. after 30 days	через 60-е сут. after 60 days	через 90-е сут. after 90 days
№ 1 (1×10^3 ж. м. к.) No. 1 (1×10^3 l. m. c.)	0	2,422	4,422	3,622	3,522	3,151
№ 2 (1×10^5 ж. м. к.) No. 2 (1×10^5 l. m. c.)	0	2,422	4,722	3,822	3,722	3,422
№ 3 (1×10^8 ж. м. к.) No. 3 (1×10^8 l. m. c.)	0	2,622	4,722	3,822	3,722	3,422

ТАБЛИЦА 2. СГТ АНТИТЕЛ, КОЛИЧЕСТВО АНТИГЕНРЕАКТИВНЫХ Т-ЛИМФОЦИТОВ И ПОКАЗАТЕЛИ ИНФИЦИРОВАННОСТИ БРУЦЕЛЛАМИ У БИОМОДЕЛЕЙ ИЗ ГРУПП СРАВНЕНИЯ

TABLE 2. MGT ANTIBODIES, NUMBER OF ANTIGEN-REACTIVE T LYMPHOCYTES AND INDICATORS BRUCELLA INFECTION IN BIOMODELS FROM COMPARISON GROUPS

Группы Groups	СГТ антител и медианные значения КС Т-лимфоцитов у биомоделей на 90-е сутки после иммунизации различными дозами <i>B. abortus</i> 19-BA MGT antibodies and median values CS T lymphocytes in biomodels on 90 th day after immunization with various doses <i>B. abortus</i> 19-BA			Результаты бактериологических исследований после инфицирования <i>B. melitensis</i> 16M Results of bacteriological studies after infection <i>B. melitensis</i> 16M		
	СГТ (\log_2) MGT (\log_2)	CD3 ⁺ CD25 ⁺ , %	CD3 ⁺ МНС-II ⁺ , %	Количество заразившихся животных, % Number of infected animals, %	ИИ, % Infection index, %	ИИОВО, ед. Index of intensity insemination internal organs, units
Контроль Control	0	9,69	10,12	100	73,3	0,521
№ 1 (1×10^3 ж. м. к.) No. 1 (1×10^3 l. m. c.)	3,151	12,5	34,76	75	31,7	0,204
№ 2 (1×10^5 ж. м. к.) No. 2 (1×10^5 l. m. c.)	3,422	24,73	41,36	41,7	21,7	0,108
№ 3 (1×10^8 ж. м. к.) No. 3 (1×10^8 l. m. c.)	3,422	51,63	43,18	0	0	0

лезной инфекции после заражения патогенным штаммом бруцелл (табл. 2).

Анализ зависимости изменения доли антиген-реактивного пула CD3⁺CD25⁺ клеток, количества животных, заразившихся бруцеллезом, а также количественных данных ИИ, ИИОВО у биомоделей из групп сравнения указал на высокую степень корреляции исследуемых показателей.

Исследования показали наличие обратно пропорциональной совместной изменчивости – увеличения доли пула антигенреактивных Т-клеток и снижения количества биомоделей, заразившихся бруцеллезом ($r = -0,966$), ИИ ($r = -0,837$), ИИОВО ($r = -0,795$). Аналогичная тенденция выявлена и при анализе связи повышения доли антигенреактивных CD3⁺МНС-II⁺ клеток и сни-

жения количества животных, заболевших бруцеллезом после инфицирования патогенным штаммом бруцелл ($r = -0,841$) ИИ ($r = -0,965$), ИИОВО ($r = -0,985$). Вместе с тем отмечено наличие тесной обратной связи динамики СГТ противобруцеллезных антител и количества животных, заразившихся бруцеллезом ($r = -0,748$), а также значений у этих биомоделей ИИ ($r = -0,924$), ИИОВО ($r = -0,949$).

Регрессионный анализ зависимости интенсивности антигенспецифической *ex vivo* активации Т-клеток с уровнем инфицированности и интенсивности обсеменения внутренних органов организма биомоделей из групп сравнения после заражения патогенным штаммом бруцелл показал высокую степень влияния состояния антигенреактивности у животных CD3⁺CD25⁺ ($R_2 = 0,932, 0,701, 0,632$) и CD3⁺МНС-II⁺ ($R_2 = 0,708, 0,931$ и $0,969$) на протективные свойства поствакцинального иммунитета. Вместе с тем отмечено наличие менее выраженной связи уровня агглютининов с иммунологической защитой против возбудителя бруцеллеза. Степень влияния (связи) СГТ антител на устойчивость животных к заражению ($R_2 = 0,560$), ИИ составила $R_2 = 0,675$, ИИОВО – $R_2 = 0,663$.

Заключение

По результатам исследований была установлена тесная (сильная) прямая пропорциональная связь между количеством вводимых ж.м.к. вакцинного штамма *Brucella abortus* 19ВА и увеличением уровня *ex vivo* активации CD3-клеток (интенсивности антиген-стимулированной экспрессии рецептора к IL-2). У животных экспериментальной группы № 3, которых иммунизировали наибольшей дозой вакцины (1×10^8 ж.м.к.), была выявлена статистически значимо самая высокая численность пула антигенреактивных CD3⁺CD25⁺, которая сохранялась во все сроки наблюдения – до 90 суток после иммунизации.

Вместе с тем была выявлена тесная корреляция ($r = -0,841 \div -0,966$, $R_2 = 0,708 \div 0,969$) величины *ex vivo* антиген-индуцированной стимуляции CD3-лимфоцитов и уровня иммунологической защиты после иммунизации против бруцеллеза, обеспечивающего защиту от заражения наиболее патогенным для человека и лабораторных животных видом бруцелл – *Brucella melitensis*.

Список литературы / References

1. Бруцеллез. Современное состояние проблемы (издание второе, дополненное) / Под ред. Г.Г. Онищенко, А.Н. Куличенко. Н. Новгород: Союзполиграф, Кириллица, 2021. 356 с. [Brucellosis. The current state of the problem(second edition, supplemented) / Ed. G.G. Onishchenko, A.N. Kulichenko]. Nizhniy Novgorod: Souzpoligaf, Kirillitsa, 2021. 356 p.
2. Кайтмазова Е.И., Островская Н.Н. Сравнительная вирулентность разных биотипов бруцелл вида *melitensis, abortus, suis* // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии, 1967. № 2. С. 66-69. [Kaitmazova E.I., Ostrovskaya N.N. Comparative virulence of different biotypes of *Brucella* species *melitensis, abortus, suis*. *Zhurnal mikrobiologii epidemiologii i immunologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*, 1967, no. 2, pp. 66-69. (In Russ.)]

Выявлено, что у вакцинированных против бруцеллеза биомоделей при значении коэффициента стимуляции Т-лимфоцитов 50% и более (по интенсивности антиген-индуцированной *ex vivo* экспрессии CD25⁺) обеспечивается 100%-ная защита от развития бруцеллезной инфекции после заражения *Brucella melitensis* в дозе 1×10^3 живых микробных клеток.

Показано отсутствие тесной коррелятивной связи увеличения дозы вводимого биомоделем вакцинного штамма бруцелл и изменения среднего геометрического титра во все сроки наблюдения ($R_2 = 0,357 \div 0,404$). Вместе с тем отмечено наличие слабо выраженной связи уровня агглютининов с иммунологической защитой биомоделей от развития бруцеллезной инфекции. Установлена умеренная степень влияния титра антител на индексы инфицированности и обсеменения внутренних органов организма биомоделей после заражения патогенным штаммом бруцелл ($R_2 = 0,663 \div 0,675$).

Таким образом, по результатам исследования продемонстрирована возможность количественно оценивать формирование и протективную активность Т-клеточного иммунитета к возбудителю бруцеллеза на основании анализа уровня антигенреактивности CD3-лимфоцитов *ex vivo*. Анализ корреляции состояния антигенреактивности Т-лимфоцитов и иммунологической устойчивости к бруцеллезной инфекции указал на высокую степень тесноты этих переменных. Ключевое влияние на активность протективного иммунитета оказывает уровень антигенреактивности Т-лимфоцитов, при этом к наиболее информативному показателю активности иммунологической защиты можно отнести коэффициент антигенной стимуляции CD3⁺CD25⁺, значения которого 51% и более указывают на наличие иммунологической защиты против бруцеллезной инфекции.

Полученные данные и описанный методический подход (КАСТ) можно использовать в качестве прогностического критерия при оценке защитного уровня клеточного иммунитета к возбудителю бруцеллеза у вакцинированных или переболевших, а также с целью анализа эффективности специфической профилактики бруцеллеза, в т. ч. на ранних сроках (7-14-е сут.) после прививки и изучения иммуногенности, протективных свойств кандидатных препаратов противобруцеллезных вакцин.

3. Костюченко М.В., Пономаренко Д.Г., Ракитина Е.Л., Логвиненко О.В., Санникова И.В., Дейнека Д.А., Голубь О.Г. Перспектива оценки антигенреактивности лимфоцитов *in vitro* для диагностики острого бруцеллеза. *Инфекция и иммунитет*. 2017. Т. 7, № 1. С. 91-96. [Kostyuchenko M.V., Ponomarenko D.G., Rakitina E.L., Logvinenko O.V., Sannikova I.V., Deineka D.A., Golub O.G. Perspective of *in vitro* lymphocytes antigenicity evaluation for the diagnostics of acute brucellosis. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2017. Vol. 7, no. 1, pp. 91-96. (In Russ.)] doi: 10.15789/2220-7619-2017-1-91-96.
4. Костюченко М.В., Ракитина Е.Л., Пономаренко Д.Г., Логвиненко О.В., Курчева С.А., Бердникова Т.В., Русанова Д.В., Куличенко А.Н. Изучение формирования клеточного поствакцинального иммунитета против бруцеллеза в лимфоцитарных тестах *in vitro* с использованием экспериментального антигенного комплекса // *Медицинская иммунология*, 2019. Т. 21, № 3. С. 547-554. [Kostyuchenko M.V., Rakitina E.L., Ponomarenko D.G., Logvinenko O.V., Kurcheva S.A., Berdnikova T.V., Rusanova D.V., Kulichenko A.N. Studying development of post-vaccinal cellular immunity against brucellosis by means of lymphocyte *in vitro* tests using an experimental antigenic complex. *Meditinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2019, Vol. 21, no. 3, pp. 547-554. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2019-3-547-554.
5. Литвинова Л.С., Гуцол А.А., Сохоневич Н.А., Кофанова К.А., Хазиахматова О.Г., Шуплецова В.В., Кайгородова Е.В., Гончаров А.Г. Основные поверхностные маркеры функциональной активности Т-лимфоцитов // *Медицинская иммунология*, 2014. Т. 16, № 1. С. 7-26. [Litvinova L.S., Gutsol A.A., Sokhoneyevich N.A., Kofanova K.A., Khaziakhmatova O.G., Shupletsova V.V., Kaigorodova E.V., Goncharov A.G. Basic surface markers of functional activity T-lymphocytes. *Meditinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2014, Vol. 16, no. 1, pp. 7-26. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2014-1-7-26.
6. Методические рекомендации МР 3.1.0207-20 «Цитометрический анализ антигенреактивности лейкоцитов *in vitro* для диагностики и оценки эффективности иммунопрофилактики бруцеллеза у людей». [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://base.garant.ru/402622756/> (Дата обращения: 01.08.2022). [Methodological recommendations MR 3.1.0207-20 "Cytometric analysis of leukocyte antigen reactivity *in vitro* for the diagnosis and evaluation of the effectiveness of immunoprophylaxis of brucellosis in humans". [Electronic resource]. Access mode: <https://base.garant.ru/402622756/>. (Date of the application: August 1, 2022).
7. Методические указания МУК 3.1.7.3402-16 «Эпидемиологический надзор и лабораторная диагностика бруцеллеза». [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://docs.cntd.ru/document/456083631>. (Дата обращения: 02.08.2022). [Methodological guidelines of MUC 3.1.7.3402-16 "Epidemiological surveillance and laboratory diagnostics of brucellosis". [Electronic resource]. Access mode: <https://docs.cntd.ru/document/456083631>. (Date of the application: August 2, 2022).
8. Методические указания МУ 3.3.2.2124-06 «Контроль диагностических питательных сред по биологическим показателям для возбудителей чумы, холеры, сибирской язвы, туляремии». [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://docs.cntd.ru/document/1200047517>. (Дата обращения: 02.08.2022). [Methodological guidelines of MU 3.3.2.2124-06 "Control of diagnostic nutrient media by biological indicators for pathogens of plague, cholera, anthrax, tularemia". [Electronic resource]. Access mode: <https://docs.cntd.ru/document/1200047517>. (Date of the application: August 2, 2022).
9. Пономаренко Д.Г., Саркисян Н.С., Куличенко А.Н. Патогенез бруцеллеза: анализ иммунопатологической концепции // *Инфекционные болезни: новости, мнения, обучение*, 2020. Т. 9, № 3. С. 96-105. [Ponomarenko D.G., Sarkisyan N.S., Kulichenko A.N. Pathogenesis of brucellosis: analysis of the immunopathological concept. *Infektsionnye bolezni: novosti, mneniya, obuchenie = Infectious Diseases: News, Opinions, Training*, 2020, Vol. 9, no. 3, pp. 96-105. (In Russ.)]
10. Ременцова М.М., Грушина Т.А. Влияние гидрокортизона и методов заражения на высеваемость бруцелл из организма белых мышей // *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*, 1978. № 1. С. 61-65. [Rementsova M.M., Grushina T.A. Effect of hydrocortisone and methods of infection on the isolation of *Brucella* from the body of albino mice. *Zhurnal mikrobiologii epidemiologii i immunologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*, 1978, no. 1, pp. 61-65. (In Russ.)]
11. СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней». [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://docs.cntd.ru/document/573660140>. (Дата обращения: 01.08.2022). [SanPiN 3.3686-21 "Sanitary and epidemiological requirements for the prevention of infectious diseases". [Electronic resource]. Access mode: <https://docs.cntd.ru/document/573660140>. (Date of the application: August 1, 2022).
12. Способ оценки фактической привитости людей против бруцеллеза на ранних сроках после вакцинации / Пономаренко Д.Г., Ракитина Е.Л., Костюченко М.В., Логвиненко О.В., Курчева С.А., Жарникова И.В., Русанова Д.В., Бердникова Т.В., Хачатурова А.А., Куличенко А.Н. Патент на изобретение RU 2714136 C1, 12.02.2020. Заявка № 2019109438 от 29.03.2019. [Method for assessing actual vaccination of people against brucellosis in the early stages after vaccination / Ponomarenko D.G., Rakitina E.L., Kostyuchenko M.V., Logvinenko O.V., Kurcheva S.A., Zharnikova I.V., Rusanova D.V., Berdnikova T.V., Khachaturova A.A., Kulichenko A.N. Patent for invention RU 2714136 C1, 02/12/2020. Application no. 2019109438 dated 29.03.2019].
13. Avila-Calderón E.D., Flores-Romo L., Sharon W., Donis-Maturano L., Becerril-García M.A., Arreola M., Reynoso B.A., Güemes F.S., Contreras-Rodríguez A. Dendritic cells and *Brucella* spp. interaction: the sentinel host and the stealthy pathogen. *Folia Microbiol. (Praha)*, 2020, Vol. 65, no. 1, pp. 1-16.

14. Fernandes D.M., Jiang X., Jung J.H., Baldwin C.L. Comparison of T cell cytokines in resistant and susceptible mice infected with virulent *Brucella abortus* strain 2308. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 1996, Vol. 16, no. 3-4, pp. 193-203.
15. Gerber W.A. Focus on chronic variable immunodeficiency for primary care practitioners, the gatekeepers to optimal health outcomes for primary immunodeficiency syndromes. *Curr. Pediatr. Rep.*, 2019, Vol. 7, pp. 130-144.
16. Hare S., Bayliss R., Baron C., Waksman G. A large domain swap in the VirB11 ATPase of *Brucella suis* leaves the hexameric assembly intact. *J. Mol. Biol.*, 2006, Vol. 360, no. 1, pp. 56-66.
17. Holling T., Schooten E., van den Elsen P. Function and regulation of MHC Class II Molecules in T-Lymphocytes: Of Mice and Men. *Hum. Immunol.*, 2004, Vol. 65, no. 4, pp. 282-290.
18. Jiao H., Zhou Z., Li B., Xiao Y., Li M., Zeng H., Guo X., GuG. The mechanism of facultative intracellular parasitism of brucella. *Int. J. Mol. Sci.*, Vol. 22, no. 7, 3673. doi: 10.3390/ijms22073673.
19. López-Santiago R., Sánchez-Argáez A.B., de Alba-Núñez L.G., Baltierra-Urbe S.L., Moreno-Lafont M.C. Immune response to mucosal brucella infection. *Front. Immunol.*, 2019, Vol. 10, 1759. doi: 10.3389/fimmu.2019.01759.
20. Vitry M.A., de Trez C., Goriely S., Dumoutier L., Akira S., Ryffel B., Carlier Y., Letesson J.J., Muraille E. Crucial role of gamma interferon-producing CD4⁺ Th1 cells but dispensable function of CD8⁺ T cell, B cell, Th2, and Th17 responses in the control of *Brucella melitensis* infection in mice. *Infect. Immun.*, 2012, Vol. 80, no. 12, pp. 4271-4280.
21. Xavier M.N., Winter M.G., Spees A.M., Nguyen K., Atluri V.L., Silva T.M., Bäumlner A.J., Müller W., Santos R.L., Tsolis R.M. CD4⁺ T cell-derived IL-10 promotes *Brucella abortus* persistence via modulation of macrophage function. *PLoS Pathog.*, 2013, Vol. 9, no. 6, e1003454. doi: 10.1371/journal.ppat.1003454.

Авторы:

Пономаренко Д.Г. — к.б.н., заведующий лабораторией бруцеллеза ФКУЗ «Ставропольский противочумный институт» Роспотребнадзора, г. Ставрополь, Россия

Костюченко М.В. — биолог сектора иммунологии и патоморфологии особо опасных инфекционных заболеваний ФКУЗ «Ставропольский противочумный институт» Роспотребнадзора, г. Ставрополь, Россия

Ракитина Е.Л. — к.м.н., врач КЛД сектора иммунологии и патоморфологии особо опасных инфекционных заболеваний ФКУЗ «Ставропольский противочумный институт» Роспотребнадзора, г. Ставрополь, Россия

Логвиненко О.В. — к.б.н., заведующая сектором иммунологии и патоморфологии особо опасных инфекционных заболеваний ФКУЗ «Ставропольский противочумный институт» Роспотребнадзора, г. Ставрополь, Россия

Хачатурова А.А. — биолог лаборатории бруцеллеза ФКУЗ «Ставропольский противочумный институт» Роспотребнадзора, г. Ставрополь, Россия

Лукашевич Д.Е. — младший научный сотрудник лаборатории бруцеллеза ФКУЗ «Ставропольский противочумный институт» Роспотребнадзора, г. Ставрополь, Россия

Курчева С.А. — к.б.н., ведущий научный сотрудник научно-производственной лаборатории препаратов для диагностики особо опасных и других инфекций ФКУЗ «Ставропольский противочумный институт» Роспотребнадзора, г. Ставрополь, Россия

Русанова Д.В. — к.м.н., заведующая научно-производственной лабораторией препаратов для диагностики особо опасных и других инфекций ФКУЗ «Ставропольский противочумный институт» Роспотребнадзора, г. Ставрополь, Россия

Куличенко А.Н. — д.м.н., профессор, академик РАН, директор ФКУЗ «Ставропольский противочумный институт» Роспотребнадзора, г. Ставрополь, Россия

Authors:

Ponomarenko D.G., PhD (Biology), Head, Laboratory of Brucellosis, Stavropol Anti-Plague Institute, Stavropol, Russian Federation

Kostyuchenko M.V., Biologist, Sector of Immunology and Pathomorphology of Particularly Dangerous Infectious Diseases, Stavropol Anti-Plague Institute, Stavropol, Russian Federation

Rakitina E.L., PhD (Medicine), Leading Research Associate, Sector of Immunology and Pathomorphology of Particularly Dangerous Infectious Diseases, Stavropol Anti-Plague Institute, Stavropol, Russian Federation

Logvinenko O.V., PhD (Biology), Head, Sector of Immunology and Pathomorphology of Particularly Dangerous Infectious Diseases, Stavropol Anti-Plague Institute, Stavropol, Russian Federation

Khachaturova A.A., Biologist, Laboratory of Brucellosis, Stavropol Anti-Plague Institute, Stavropol, Russian Federation

Lukashevich D.E., Junior Research Associate, Laboratory of Brucellosis, Stavropol Anti-Plague Institute, Stavropol, Russian Federation

Kurcheva S.A., PhD (Biology), Leading Research Associate, Laboratory of Diagnostic Drugs for the Particularly Dangerous and Other Infections, Stavropol Anti-Plague Institute, Stavropol, Russian Federation

Rusanova D.V., PhD (Medicine), Head, Laboratory of Diagnostic Drugs for the Particularly Dangerous and Other Infections, Stavropol Anti-Plague Institute, Stavropol, Russian Federation

Kulichenko A.N., PhD, MD (Medicine), Professor, Full Member, Russian Academy of Sciences, Director, Stavropol Anti-Plague Institute, Stavropol, Russian Federation

Поступила 02.11.2022

Отправлена на доработку 07.11.2022

Принята к печати 16.02.2023

Received 02.11.2022

Revision received 07.11.2022

Accepted 16.02.2023

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.	169	Зементова М.С.	7	Маркова К.Л.	7	Смирнова О.В.	27
Аляхнович Н.С.	151	Зима А.П.	57	Матьянина А.И.	75	Смирнова С.В.	67
Антонов А.В.	159	Зубкова Т.Г.	191	Минаева Н.В.	121	Соколов Д.И.	7
Байрамов П.В.	159	Исаева Н.В.	121	Минасян С.М.	127	Спицина С.С.	175
Барило А.А.	67	Карасева А.Б.	127	Мозговая Е.Э.	175	Стенина М.А.	181
Бедина С.А.	175	Карзакова Л.М.	181	Мун С.А.	159	Стукова М.А.	191
Бомбела Т.В.	143	Карпов Р.С.	37	Мусина Н.Н.	57	Суворов А.Н.	127
Борщева О.В.	127	Клюева С.Н.	135	Назарова Е.Л.	121	Трофименко А.С.	175
Борщев В.Ю.	127	Ковалева С.В.	107	Неклюдова Г.В.	37	Фокина Е.С.	121
Борщев Ю.Ю.	127	Кожевников В.А.	135	Нестерова И.В.	107	Хачатурова А.А.	211
Буторкова С.А.	135	Колосова М.В.	37	Ошева Л.В.	75	Чапурин В.Н.	107
Бузицкая Ж.В.	191	Колпинский Г.И.	159	Павлюкова Е.Н.	37	Чудилова Г.А.	107
Буровенко Д.В.	127	Костюченко М.В.	211	Парилова О.В.	27	Шабалдин А.В.	89
Буровенко И.Ю.	127	Кравцов А.Л.	135	Перевязкина М.А.	7	Ширинкина А.С.	143
Варюшина Е.А.	191	Кудряшов С.И.	181	Перетягко О.В.	67	Шмулевич С.А.	89
Васильев К.А.	191	Куличенко А.Н.	211	Пестрикова А.О.	121	Штина И.Е.	75
Вафин И.А.	159	Курчева С.А.	211	Полоник Е.Г.	159	Шурыгина А.-П.С.	191
Вашукова Е.С.	7	Ладыгина М.Д.	191	Пономаренко Д.Г.	211	Эндакова А.И.	121
Верхбицкая Н.Е.	159	Лебеденко А.А.	151	Попонина Е.А.	121	Янченко В.В.	151
Воронина Е.А.	169	Лев И.В.	169	Прохоренко Т.С.	57	Bebyakov A.M.	203
Галагуза М.М.	127	Лиознов Д.А.	191	Ракитина Е.Л.	211	Ostankova Yu.V.	203
Глушков А.Н.	159	Логвиненко О.В.	211	Русанова Д.В.	211	Pechnikova N.A.	203
Гордеева Л.А.	159	Ломтагидзе Л.В.	107	Саприна Т.В.	57	Saitgalina M.A.	203
Гришачева Е.О.	89	Лукашевич Д.Е.	211	Сельков С.А.	7	Totalian Areg A.	203
Дианова Д.Г.	143	Луткова Т.С.	181	Семерник О.Е.	151		
Долгих О.В.	143	Мамус М.А.	175	Синицкая А.В.	89		
Ермакова О.В.	75	Маркина А.Н.	27	Смерчинская Т.В.	107		

ПРЕДМЕТНЫЙ УКАЗАТЕЛЬ

аллергия	151	иммунные клетки	8	проточная цитометрия	136, 192
алопеция	76	иммуноглобулины	76	псориаз	68
амброзия	151	иммуномодулирующая		пыльца	151
анализ <i>in silico</i>	204	активность	144	размер инфаркта	128
анализ патогенности мутации	204	иммуносупрессия	182	рак молочной железы	160
анемии	58	индекс инфицированности	212	реактивное воспаление	176
анемия хронических заболеваний	58	интерлейкины	68, 76	ревматоидный артрит	176
антигенреактивность		интерлейкины крови	170	редкий синонимичный вариант	204
Т-лимфоциты	212	ишемия	128	рекомбинантный интерлейкин-2	182
антиидиотипические антитела	160	кардиопротекция	128	реперфузия	128
атопический дерматит	68	кверцетин	144	сахарный диабет	58
аутоиммунное воспаление	176	коморбидная патология	76	секреторный иммуноглобулин А	68
аутосыворотка	90	костный мозг	122	сердце	128
биологические пленки	28	коэффициент антигенной		синдром системной	
биомаркеры	8	стимуляции	212	воспалительной реакции	128
бруцеллез	212	лечение гломерулонефритов	182	синоназальный микробиом	28
вакцинация	212	лимфоциты	76, 90	скорость оседания эритроцитов	58
вакцинный штамм <i>Yersinia pestis</i>		лютеолин	144	стероидные рецепторы	160
EV НИИЭГ	136	маркеры воспаления	58	стимуляция	122
везикулы	8	мезенхимальные стромальные		тирозиновая протеинфосфатаза	
вирус гриппа	192	клетки	122	CD45	136
внеклеточные	8	микровезикулы	8	ускоренное старение	170
внеклеточные ловушки		микроРНК	8	фагоцитоз	76, 144
нейтрофилов	176	микрохимизм	38	фенотип	108
внутривенные иммуноглобулины	108	множественная миелома	122	ферменты	151
врожденная пневмония	108	наследственный ангиоотек	204	хронический риносинусит	28
врожденные пороки сердца	90	недоношенность	38	цитокины	68, 122
гемопоэтические стволовые		нейтрофилы	122, 144, 176	экзосомы	8, 38
клетки	122	нейтрофильные гранулоциты	108	эксперимент <i>in vitro</i>	144
генетические факторы	28	неонатальный сепсис	108	экспрессия	90
гепсидин	58	нефротический синдром	182	экспрессия CD45 нейтрофилами ..	136
гломерулонефрит	182	остеоартрит	176	эозинофильный катионный	
грудное вскармливание	38	пептиды	151	протеин	68
грудное молоко	38	первичные иммунодефициты	204	эстрадиол	160
дети	76	плазмобласты	192	В-клетки памяти	192
детское сердце	38	полиморбидность	128	В-лимфоциты	192
диабетическая ретинопатия	170	полипы	28	HLA-DR	90
диагностика	151	пробиотики	128	HLA-G	90
дисфункции	108	протективный иммунитет	212	KNG1	204
дифференциальная диагностика	58	противогриппозные вакцины	192	NETоз	176
иммунитет	28	противочумная вакцинация	136	Treg-клетки	182

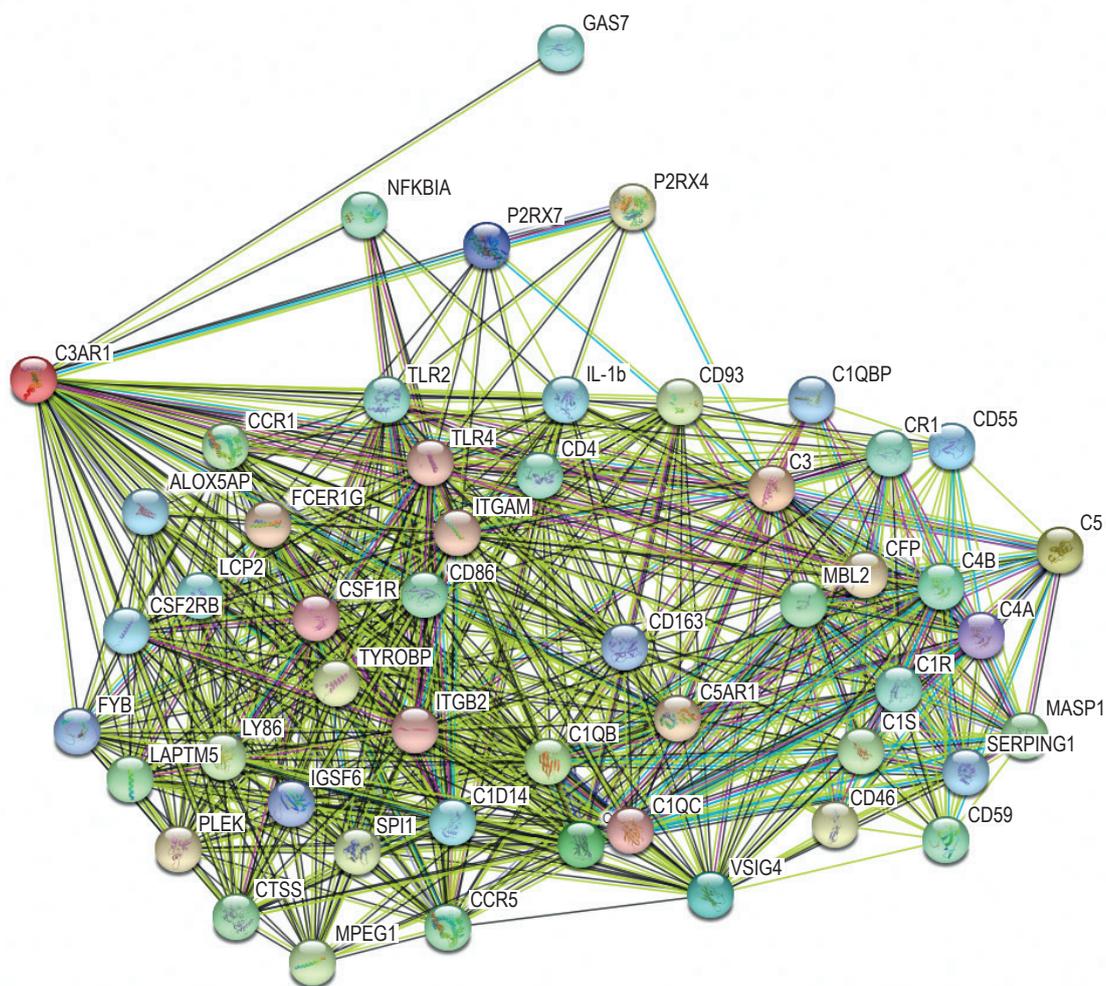


Рисунок 1. Регуляторное взаимодействие белка-рецептора – C3a anaphylatoxin chemotactic receptor (C3AR1)

Figure 1. Regulatory interaction of protein-receptor – C3a anaphylatoxin chemotactic receptor (C3AR1)

**ПОДПИСНОЙ ИНДЕКС:
УРАЛ-ПРЕСС – 42311**

ISSN 1563-0625



9 771563 062002 >