

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

Том 26, № 2. С. 225-418

2024

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

МЕДИЦИНСКАЯ ИММУНОЛОГИЯ

ИЛЛЮСТРАЦИИ К СТАТЬЕ «ПОТЕНЦИАЛЬНЫЕ МИШЕНИ ГЕПАРИНА ПРИ ПРОГРЕССИВАНИИ И МЕТАСТАЗИРОВАНИИ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ НОВООБРАЗОВАНИЙ» (АВТОРЫ: МАЛАЩЕНКО В.В., ХЛУСОВ И.А., ЮРОВА К.А., ХАЗИАХМАТОВА О.Г., ТОДОСЕНКО Н.М., ЛИТВИНОВА Л.С. [с. 237-252])

ILLUSTRATIONS FOR THE ARTICLE "POTENTIAL TARGETS OF HEPARIN DURING PROGRESSION AND METASTASIS OF MALIGNANT NEOPLASMS" (AUTHORS: MALASHCHENKO V.V., KHLUSOV I.A., YUROVA K.A., KHAZIAKHMATOVA O.G., TODOSENKO N.M., LITVINOVA L.S. [pp. 237-252])

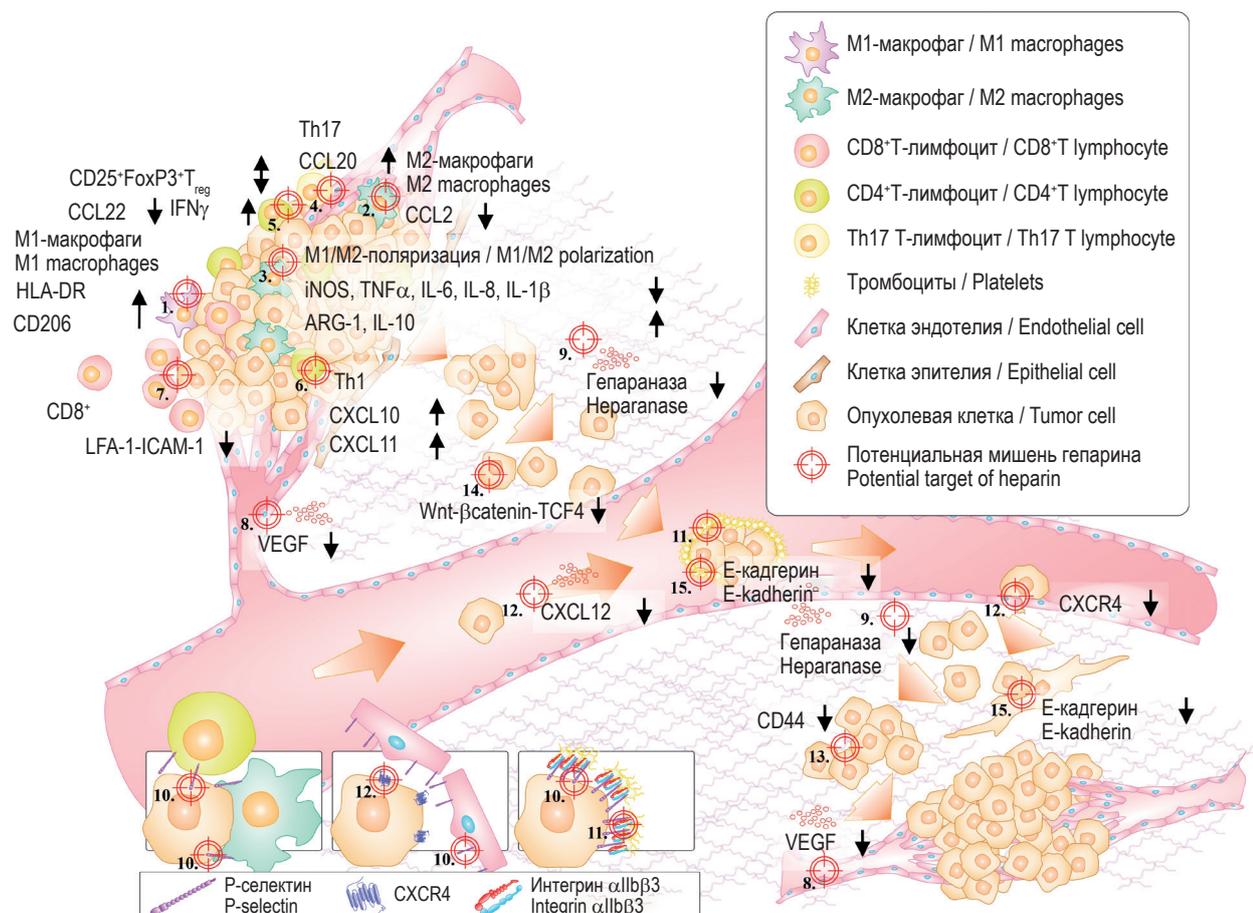


Рисунок 1. Плейотропные клеточные и молекулярные изменения при онкогенезе и метастазировании как потенциальные мишени для гепарина

Примечание. Эффекты воздействия гепарина или его производных на молекулярные мишени:

- | | |
|--|---|
| 1. M1-макрофаги (усиление функциональной активности). | 9. Инвазия (Гепараназа) (блокировка). |
| 2. M2-макрофаги (ослабление функциональной активности). | 10. Инвазия, миграция (P-селектин) (блокировка). |
| 3. M1/M2 (поляризация макрофагов). | 11. Инвазия, миграция (Интегрин α IIb β 3) (блокировка). |
| 4. Th17 T-лимфоциты (усиление функциональной активности). | 12. Миграция (CXCL12/CXCR4 взаимодействия) (ингибирование). |
| 5. CD25 ⁺ FoxP3 ⁺ Treg-клетки (модуляция функциональной активности). | 13. Микрометастазирование (CD44) (блокировка). |
| 6. CD4 ⁺ Th1-клетки (усиление функциональной активности). | 14. ЦОК/РСК (ослабление функциональной активности). |
| 7. CD8 ⁺ цитотоксические клетки (ингибирование LFA-1 – ICAM-1 взаимодействия). | 15. Эпителиально-мезенхимальный переход (ингибирование). |
| 8. Ангиогенез (VEGF) (блокировка). | * Циркулирующие опухолевые клетки (ЦОК) / раковые стволовые клетки (РСК). |

Figure 1. Pleiotropic cellular and molecular changes during oncogenesis and metastasis as potential targets for heparin

Note. The effects of heparin or its derivatives on molecular targets:

- | | |
|---|---|
| 1. M1 macrophages (increased functional activity). | 9. Invasion (Heparanase) (blocking). |
| 2. M2 macrophages (decreased functional activity). | 10. Invasion, migration (P-selectin) (blocking). |
| 3. M1/M2 (macrophage polarization). | 11. Invasion, migration (Integrin α IIb β 3) (blocking). |
| 4. Th17 T lymphocytes (increased functional activity). | 12. Migration (CXCL12/CXCR4 interactions) (inhibition). |
| 5. CD25 ⁺ FoxP3 ⁺ Treg cells (modulation of functional activity). | 13. Micrometastasis (CD44) (blocking). |
| 6. CD4 ⁺ Th1 cells (increased functional activity). | 14. CTC/CSC (decreased functional activity)*. |
| 7. CD8 ⁺ cytotoxic cells (inhibition of LFA-1 – ICAM-1 interaction). | 15. Epithelial-mesenchymal transition (inhibition). |
| 8. Angiogenesis (VEGF) (blocking). | * , circulating tumor cells (CTC)/cancer stem cells (CSC). |

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

МЕДИЦИНСКАЯ ИММУНОЛОГИЯ

март-апрель

2024, том 26

№ 2

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 28.12.2023 г. Формат 60 x 90 1/8. Печать офсетная.

Усл. печ. л. 24,25. Тираж 2000 экз. (1-й завод – 1000 экз.) Заказ № 058

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**

March-April

2024, volume 26

No.2

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, Malyye ave., Vasilevsky Island, 26, office 3.

E-mail: mail@mirmed.ru

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

Passed for printing 28.12.2023. Print format 60 x 90 1/8. Offset printing.

Printed sheets 24.25. Circulation 2000 copies. (1st edition – 1000 copies.)

Print in LLC «ARTEMIDA»

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

Phone: (812) 950-10-99

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

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

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

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

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

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

Editorial Council

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

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

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

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

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

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

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

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

СОДЕРЖАНИЕ

Обзоры

Козлов В.А.

ИНДУЦИРУЮЩАЯ РОЛЬ ТИМУСА В ПРОЦЕССЕ СТАРЕНИЯ ОРГАНИЗМА 231

Малашенко В.В., Хлусов И.А., Юрова К.А., Хазиахметова О.Г., Тодосенко Н.М., Литвинова Л.С.

ПОТЕНЦИАЛЬНЫЕ МИШЕНИ ГЕПАРИНА ПРИ ПРОГРЕССИРОВАНИИ И МЕТАСТАЗИРОВАНИИ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ
НОВООБРАЗОВАНИЙ 237

Оригинальные статьи

Фадеев Ф.А., Александрова А.Д., Могилевских А.С.

ФЕНОТИПИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ДЕНДРИТНЫХ КЛЕТОК ПРИ РАЗЛИЧНЫХ ВАРИАНТАХ СТИМУЛЯЦИИ СОЗРЕВАНИЯ 253

Ганковский В.А., Карпова Е.П., Ганковская Л.В., Авальян Я.С., Меркушова Е.Д., Зинина Е.В.

ОСОБЕННОСТИ ВРОЖДЕННОГО ИММУНИТЕТА У ДЕТЕЙ С ГИПЕРТРОФИЕЙ НЕБНЫХ МИНДАЛИН 263

Шлык И.Ф., Евсегнеева И.В., Беседина Д.Ю., Макачук И.В.

ДИНАМИКА ПРОФИЛЯ ВРОЖДЕННОГО ИММУННОГО ОТВЕТА У ПАЦИЕНТОВ С ИШЕМИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНЬЮ СЕРДЦА
В РАЗЛИЧНЫЕ СРОКИ ПОСЛЕ СТЕНТИРОВАНИЯ КОРОНАРНЫХ АРТЕРИЙ 271

Кузьмич Е.В., Павлова И.Е., Беляева Е.В., Бубнова Л.Н.

ИММУНОГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ДОНОРОВ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ СТЕЛОВЫХ КЛЕТОК, ЯВЛЯЮЩИХСЯ
ПРЕДСТАВИТЕЛЯМИ НАИБОЛЕЕ МНОГОЧИСЛЕННЫХ ЭТНИЧЕСКИХ ГРУПП РОССИИ 281

Хамаганова Е.Г., Хижинский С.П., Абдрахимова А.Р., Кузьминова Е.П., Леонов Е.А., Покровская О.С., Кузьмина Л.А., Паровичникова Е.Н.

МУЛЬТИЛОКУСНЫЕ НЛА-ГАПЛОТИПЫ (A-B-C-DRB1-DRB3/DRB4/DRB5-DQA1-DQB1-DPA1-DPB1) В СЕМЬЯХ БОЛЬНЫХ
С НАЗНАЧЕНИЕМ К ТРАНСПЛАНТАЦИИ АЛЛОГЕННЫХ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ СТЕЛОВЫХ КЛЕТОК 291

Барычева Л.Ю., Какулия Д.М., Минасян М.М., Кузнецова В.В., Козьмова Н.А.

ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНОВ ПРОВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ИНТЕРЛЕЙКИНОВ ПРИ ПЕРВИЧНОЙ ОТКРЫТОУГОЛЬНОЙ ГЛАУКОМЕ 303

Фабрикантов О.Л., Шурыгин С.Н., Липатова Т.Е., Судаков О.В., Потапов В.Н., Чернов А.В., Шавкута Г.В., Голиков А.В.,

Якунченко Т.И., Аксёнов В.В.
ЦИТОКИНОВЫЙ ПРОФИЛЬ ПАЦИЕНТОВ С СОЧЕТАННОЙ КАРДИО- И ОФТАЛЬМОПАТОЛОГИЕЙ 313

Чистова Н.П., Бодяенкова Г.М.

ЦИТОКИНОВЫЙ ПРОФИЛЬ У ПАЦИЕНТОВ С ВИБРАЦИОННОЙ БОЛЕЗНЬЮ, ОТЯГОЩЕННОЙ АРТЕРИАЛЬНОЙ ГИПЕРТЕНЗИЕЙ
И ОЖИРЕНИЕМ 321

Александрова Т.Н., Мулина И.И., Лямкина А.С., Студеникина А.А., Вараксин Н.А., Михайлова Е.С., Поспелова Т.И., Ауменшлюс А.И.

ЦИТОКИНОВЫЙ ПРОФИЛЬ БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКИМ МИЕЛОЛЕЙКОЗОМ 329

Изорова Н.В., Нохрин Д.Ю., Савочкина А.Ю., Узунова А.Н.

НЕЛИНЕЙНЫЕ ГЛАВНЫЕ КОМПОНЕНТЫ ЦИТОКИНОВОГО ПРОФИЛЯ У ДЕТЕЙ С ВНЕБОЛЬНИЧНОЙ ПНЕВМОНИЕЙ 337

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

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА КЛЕТОЧНОГО ИММУННОГО ОТВЕТА НА SARS-CoV-2 ПРИ ИНФЕКЦИИ И ВАКЦИНАЦИИ 345

Хромова Е.А., Костинов М.П., Сходова С.А., Осипцов В.Н., Бишева И.В., Пахомов Д.В., Курбатова Е.А., Хасанова А.А.,

Крюкова Н.О., Шатохин М.Н.
КОРРЕКЦИЯ ИММУННОГО СТАТУСА У ГОСПИТАЛИЗИРОВАННЫХ ПАЦИЕНТОВ С COVID-19 ИММУНОТРОПНЫМ
ПРЕПАРАТОМ НА ФОНЕ БАЗИСНОЙ ТЕРАПИИ 355

Боровиков И.О., Кравцова Е.И., Булгакова В.П., Боровикова О.И., Бирюкова М.И.

ВОЗМОЖНОСТИ КОРРЕКЦИИ ЛОКАЛЬНОГО ИММУННОГО СТАТУСА У ПАЦИЕНТОК С ХРОНИЧЕСКИМ ЭНДОМЕТРИТОМ 367

Афлитонов М.А., Стрельникова Е.Г., Безрукова Е.В., Артюшкин С.А., Варюшина Е.А., Моисеева Е.А.

ВЛИЯНИЕ ТОПИЧЕСКОГО ЛЕКАРСТВЕННОГО СРЕДСТВА НА ЛОКАЛЬНЫЕ КОНЦЕНТРАЦИИ IL-5 И МОМЕТАЗОНА ФУРОАТА
ПРИ ХРОНИЧЕСКОМ ПОЛИПОЗНОМ РИНОСИНСУЗИТЕ 379

Краткие сообщения

Дятлова Л.И., Глухова Т.Н.

РОЛЬ ИЗМЕНЕНИЙ ЦИТОКИНОВОГО СТАТУСА ОКОЛОПЛОДНЫХ ВОД В ПАТОГЕНЕЗЕ ФОРМИРОВАНИЯ
НЕСОСТОЯТЕЛЬНОСТИ ПЛОДНЫХ ОБОЛОЧЕК 389

Османова Г.Я., Александров В.А., Александров А.В., Шилова Л.Н., Черкесова Е.Г., Александрова Н.В., Зборовская И.А.

АНТИТЕЛА К ЦИКЛИЧЕСКОМУ ЦИТРУЛИНИРОВАННОМУ ПЕПТИДУ И АНГИОПОЭТИНОПОДОБНЫЙ БЕЛОК 4-ГО ТИПА
КАК МАРКЕРЫ ИММУННОГО ВОСПАЛЕНИЯ И ОСТЕОПОРОТИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ У БОЛЬНЫХ РЕВМАТОИДНЫМ АРТРИТОМ 393

Цибизова А.А., Ясеняская А.Л., Тюренков И.Н., Озеров А.А., Самотруева М.А.

ВЛИЯНИЕ ПРОИЗВОДНОГО ПИРИМИДИНА НА УРОВЕНЬ ЦИТОКИНОВ В УСЛОВИЯХ СТРЕПТОКОККОВОЙ РАНЕВОЙ ИНФЕКЦИИ 401

Случай из практики

Быкова Е.А., Фалалеева Н.А., Мясина С.А., Шегай П.В., Гривцова Л.Ю.

ОПЫТ ПРИМЕНЕНИЯ ЦИТОКИНОТЕРАПИИ В ЛЕЧЕНИИ РЕЦИДИВНОГО РАКА ШЕЙКИ МАТКИ 407

Правила для авторов 415

Авторский указатель 418

Предметный указатель 418

CONTENTS

Reviews

Kozlov V.A.

INDUCING ROLE OF THYMUS IN THE BODY'S AGEING PROCESS 231

Malashchenko V.V., Khlusov I.A., Yurova K.A., Khaziakhmatova O.G., Todosenko N.M., Litvinova L.S.

POTENTIAL TARGETS OF HEPARIN DURING PROGRESSION AND METASTASIS OF MALIGNANT NEOPLASMS 237

Original articles

Fadeyev F.A., Aleksandrova A.D., Mogilenskikh A.S.

PHENOTYPIC FEATURES OF DENDRITIC CELLS WHEN USING DIFFERENT MODES OF THEIR STIMULATED MATURATION 253

Gankovsky V.A., Karpova E.P., Gankovskaya L.V., Avalyan Ya.S., Merkusheva E.D., Zinina E.V.

FEATURES OF INNATE IMMUNITY IN CHILDREN WITH HYPERTROPHY OF THE PALATINE TONSILS 263

Shlyk I.F., Evsegneeva I.V., Besedina D.Yu., Makarchuk I.V.

DYNAMICS OF THE INNATE IMMUNE RESPONSE PROFILE IN PATIENTS WITH CORONARY HEART DISEASE AT DIFFERENT TERMS AFTER CORONARY ARTERY STENTING 271

Kuzmich E.V., Pavlova I.E., Belyaeva E.V., Bubnova L.N.

IMMUNOGENETIC CHARACTERISTICS OF HEMATOPOIETIC STEM CELL DONORS REPRESENTING THE MOST NUMEROUS ETHNIC GROUPS IN RUSSIA 281

Khamaganova E.G., Khizhinskiy S.P., Abdрахimova A.R., Kuzminova E.P., Leonov E.A., Pokrovskaya O.S., Kuzmina L.A., Parovichnikova E.N.

MULTILOCUS HLA HAPLOTYPES (A-B-C-DRB1-DRB3/DRB4/DRB5-DQA1-DQB1-DPA1-DPB1) IN FAMILIES OF PATIENTS SCHEDULED FOR ALLOGENEIC HEMATOPOIETIC STEM CELL TRANSPLANTATION 291

Barycheva L.Yu., Kakulia D.M., Minasyan M.M., Kuznetsova V.V., Kozmova N.A.

POLYMORPHISM OF PRO-INFLAMMATORY INTERLEUKIN GENES IN PRIMARY OPEN-ANGLE GLAUCOMA 303

Fabrikantov O.L., Shurygin S.N., Lipatova T.E., Sudakov O.V., Potapov V.N., Chernov A.V., Shavkuta G.V., Golikov A.V., Yakunchenko T.I., Aksenov V.V.

CYTOKINE PROFILE IN THE PATIENTS WITH COMBINED CARDIO- AND OPHTHALMOPATHIES 313

Chistova N.P., Bodienkova G.M.

CYTOKINE PROFILE IN PATIENTS WITH VIBRATION DISEASE, AGGRAVATED BY HYPERTENSION AND OBESITY 321

Aleksandrova T.N., Mulina I.I., Lyamkina A.S., Studenikina A.A., Varaksin N.A., Mikhaylova E.S., Pospelova T.I., Autenshlyus A.I.

CYTOKINE PROFILE IN PATIENTS WITH CHRONIC MYELOID LEUKEMIA 329

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

NONLINEAR MAIN COMPONENTS OF THE CYTOKINE PROFILE IN CHILDREN WITH COMMUNITY-ACQUIRED PNEUMONIA 337

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

COMPARATIVE CHARACTERISTICS OF THE CELLULAR IMMUNE RESPONSE TO SARS-CoV-2 DURING INFECTION AND POST-VACCINATION 345

Khromova E.A., Kostinov M.P., Skhodova S.A., Osipov V.N., Bisheva I.V., Pachomov D.V., Kurbatova E.A., Khasanova A.A., Kryukova N.O., Shatokhin M.N.

CORRECTION OF IMMUNE STATUS FROM HOSPITALIZED COVID-19-PATIENTS WITH IMMUNOTROPIC DRUG ADDED TO THE BASIC TREATMENT 355

Borovikov I.O., Kravtsova E.I., Bulgakova V.P., Borovikova O.I., Biryukova M.I.

OPTIONS FOR CORRECTION OF LOCAL IMMUNE STATUS IN PATIENTS WITH CHRONIC ENDOMETRITIS 367

Aflitonov M.A., Strelnikova E.G., Bezrukova E.V., Artyushkin S.A., Moiseeva E.A.

EFFECT OF TOPICAL DRUGS ON THE LOCAL CONCENTRATIONS OF IL-5 AND MOMETASONE FUROATE IN CHRONIC POLYPOUS RHINOSINUSITIS 379

Short communications

Dyatlova L.I., Glukhova T.N.

ROLE OF ALTERED AMNIOTIC FLUID CYTOKINE PROFILE IN DEVELOPMENT OF FETAL MEMBRANE INSUFFICIENCY 389

Osmanova G. Ya., Aleksandrov V.A., Aleksandrov A.V., Shilova L.N., Cherkesova E.G., Aleksandrova N.V., Zborovskaya I.A.

ANTIBODIES TO CYCLIC CITRULLINATED PEPTIDE AND ANGIOPOIETIN-LIKE PROTEIN TYPE 4 AS MARKERS OF IMMUNE INFLAMMATION AND OSTEOPOROTIC PROCESSES IN RHEUMATOID ARTHRITIS PATIENTS 393

Tsybizova A.A., Yasenyavskaya A.L., Tyurenkov I.N., Ozerov A.A., Samotrueva M.A.

EFFECT OF A PYRIMIDINE DERIVATIVE ON THE LEVEL OF CYTOKINES IN CONDITIONS OF STREPTOCOCCAL WOUND INFECTION 401

Clinical case

Bykova E.A., Falaleeva N.A., Myalina S.A., Shegai P.V., Grivtsova L.Yu.

EXPERIENCE OF CYTOKINE THERAPY IN THE TREATMENT OF RECURRENT CERVICAL CANCER 407

Instructions to Authors 415

Author index 418

Subject index 418

ИНДУЦИРУЮЩАЯ РОЛЬ ТИМУСА В ПРОЦЕССЕ СТАРЕНИЯ ОРГАНИЗМА

Козлов В.А.

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

Резюме. Процесс старения следует рассматривать с точки зрения участия в нем всех гомеостатических систем организма, учитывая их разнозначность для существования самого организма и принимая во внимание разновременность включения в процесс их возрастных изменений. По-видимому, следует обратить внимание на литературные данные о возрастных изменениях функциональной активности иммунной системы, которая практически равна нулю при рождении человека, достигает максимума в возрасте около 40-50 лет и значительно снижается в процессе старения организма. Именно с последним этапом возрастных изменений функциональной активности иммунной системы обоснованно связываются практически все наиболее социально значимые заболевания современного человека: онкологические, аутоиммунные, аллергические заболевания, сердечно-сосудистые и другие. До сих пор, наверное, нет единого мнения о том: старение — это болезнь или не болезнь, а так, некий естественный, временной износ «биологической машины». Во всяком случае, необходимо подчеркнуть, что одним из первых органов, где начинают регистрироваться возрастные изменения негативного характера, является тимус, один из двух центральных органов иммунной системы. Второй центральный орган — костный мозг. Возрастные изменения в тимусе не носят характер «все или ничего», «сейчас или никогда», они характеризуются в норме постепенным снижением производства клеток в тимусе с изменением их качественных характеристик, а значит, это несомненно будет сказываться в той или степени на показателях активности иммунной системы в сторону их негативных проявлений. Хроническое воспаление, один из значимых признаков процесса старения, участвует и в ускорении возрастной инволюции тимуса, и в повреждении ниши с располагающимися в ней стволовыми кроветворными клетками. Главным механизмом в нарушениях функциональной активности тимуса является нарушение центральной толерантности с миграцией из тимуса на периферию Т-клеток, миновавших (обманувших) негативную селекцию в силу различных причин. Необходимо разрабатывать новые подходы к оценке функциональных показателей тимуса с особым вниманием на поиски терапевтических воздействий на них с целью сохранить функциональную активность иммунной системы на высоком уровне в течение длительного времени.

Ключевые слова: тимус, старение, миграция Т-клеток, Т-регуляторные клетки, Т-эффекторные клетки, цитокины, иммунопатология

Адрес для переписки:

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

Address for correspondence:

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

Образец цитирования:

В.А. Козлов «Индукционная роль тимуса в процессе старения организма» // Медицинская иммунология, 2024. Т. 26, № 2. С. 231-236.
doi: 10.15789/1563-0625-IOT-2891

© Козлов В.А., 2024

Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

V.A. Kozlov "Inducing role of thymus in the body's ageing process", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2024, Vol. 26, no. 2, pp. 231-236.
doi: 10.15789/1563-0625-IOT-2891

© Kozlov V.A., 2024

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

DOI: 10.15789/1563-0625-IOT-2891

INDUCING ROLE OF THYMUS IN THE BODY'S AGEING PROCESS

Kozlov V.A.

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

Abstract. The ageing process should be considered with respect to all homeostatic systems of the body, their importance for the existence of the organism itself and different timing of their switching-on in the process of age-related changes. An attention should be paid to the literature data on age-related changes in the functional activity of immune system, which starts from almost zero at birth, reaches a maximum at the age of about 40-50 years and significantly decreases during the natural ageing process. The vast majority of most socially significant diseases of modern humans are reasonably associated with this last stage of age-related changes in the functional activity of the immune system. So far, there is probably no consensus on whether ageing is a disease, or not a disease, but just a kind of natural wear of the "biological machine". In any case, one should emphasize that thymic gland is one of the first organs where negative age-related changes are revealed, one of the two central organs of the immune system. Bone marrow is the second central immune organ. Age-related changes in the thymus are not "all or nothing", "now or never", they are normally characterized by a gradual decrease of the cell production and changes in their qualitative characteristics, which undoubtedly result into some negative effects upon the indices of immune system activity. There is a need to develop new approaches towards the assessment of functional parameters of the thymus, highlighting the search for therapeutic approaches that would maintain functional activity of the immune system at a high level.

Keywords: thymus, aging, migration of T cells, T regulatory cells, T effector cells, cytokines, immunopathology

Нельзя, говоря о тимусе, обойти проблему участия этого центрального органа иммунитета в процессах, именно в процессах, старения. Особенно это важно, учитывая данные о том, что тимус, как орган, один из первых, если не самый первый, подвергается инволюции на первых этапах онтогенеза. В названии этой статьи отсутствует слово «иммунопатогенез». Это связано с нечетким определением процесса старения организма: это болезнь, приводящая к гибели организма, или что? Если болезнь, ее можно и нужно лечить, но можно ли вылечить?

Все другие «болезни» вылечить можно, хотя бы теоретически, и нужно. Старение однозначно излечить нельзя! Тогда как обозначить процесс, который характеризуется целым рядом нарушений в процессе его протекания, который можно и нужно корректировать, но который все равно изойдет «на нет»? Есть над чем подумать, о чем порассуждать... Термин «устаревание» может быть лучше, чем «старение». Ну, устарел, но ведь еще работает, это же еще не конец. Подновить, подзаменить, подмазать и вперед, еще поработает?

Если попробовать обобщить все данные об изменениях в процессе старения функций тимуса, то мнение будет однозначное: все плохо. Атрофия органа отмечается, количество ранних эмигрантов из тимуса уменьшается, а это значит, что и число наивных Т-клеток на периферии снижа-

ется, подавляется продукция тимоцитами целого ряда цитокинов, включая IL-2, IL-9, IL-10, IL-13, IL-14, на фоне повышения выработки лейкомиа-ингибирующего фактора (LIF), онкостатина М (OSM), фактора стволовых клеток (SCF) [7, 18].

Существует мнение, что хроническое воспаление, один из значимых признаков процесса старения, участвует как в ускорении возрастной инволюции тимуса, так и в повреждении ниши с располагающимися в ней стволовыми кроветворными клетками [11].

Считается, что состояние ЭКТ (эпителиальные клетки тимуса) во многом определяет характер изменений функций тимуса в процессе старения организма. Эти клетки отвечают за экспрессию и презентацию тканево-рестриктированных антигенов AIRE-зависимым и AIRE-независимым образом, за привлечение в процесс негативной селекции ДК и индукцию образования в тимусе Treg. В настоящее время описаны два гена, функционирующие в клетках тимуса: AIRE (autoimmune regulator) и FEZF2 (forebrain expressed zink finger 2), продукты которых несут ответственность за формирование иммунной толерантности к аутоантигенам [18, 20]. По-видимому, деграция популяции ЭКТ со снижением их количества в органе является одним из главнейших факторов атрофии тимуса в процессе старения. Снижение количества ЭКТ, экспрессирующих AIRE-зависимые тканевые антигены, ложится в

основу миграции из тимуса тимоцитов с высоко-аффинными ТКР (Т-клеточный рецептор) к определенным тканевым антигенам с последующей индукцией аутоиммунной патологии в старческом возрасте [2, 10]. По существу, это приводит к полному центральной толерантности со всеми вытекающими последствиями в виде роста аутоиммунной патологии в процессе старения. Данные свидетельствуют о многокомпонентности процесса атрофии тимуса с участием гормонов (тестостерон, эстрогены, глюкокортикоиды), IL-7, IL-22, продукция которых в ЭКЕ снижается в процессе старения, с участием фактора транскрипции Forkhead box (FOX)N1, экспрессия которого в ЭКТ уменьшается в старости [5]. Весьма интересными представляются данные о возможном механизме инволюционной атрофии тимуса. Получены данные, свидетельствующие о процессе эпителиально-мезенхимальном переходе с появлением новых фибробластов в тимусе. Предполагается, что здесь имеет место трансдифференцировка эпителиальных клеток в преадипоциты при участии фактора PPAR γ (proliferator-activated receptor γ) [6, 22, 23]. При этом, прямое участие в процессе клеточного перехода принимает участие молекула CD147, которая экспрессируется на Т-клетках в тимусе и с помощью которой Т-клетки взаимодействуют с молекулой Annexin A2 на ЭКТ, а TGF- β , продукция которого возрастает в тимусе старых людей и мышей, способствует активации переходного процесса клеток в тимусе, поддерживая тем самым процесс инволюции тимуса в старом возрасте [3]. Возникает проблема терапии процесса возрастной инволюции тимуса с помощью воздействий, направленных на снижение экспрессии CD147 на тимоцитах и на подавление продукции в тимусе TGF- β .

По-видимому, одним из самых главных показателей снижения функции тимуса в процессе старения является факт уменьшения на порядки способности ТКР специфически распознавать чужеродные антигены, что в значительной степени ограничивается возможность Т-клеток отвечать на чужеродные антигены [12, 13] с формированием иммунодефицитного состояния в старости. При этом число лимфоцитов на периферии не столь выражено изменяется, но заметны флуктуации в соотношениях Т-клеточных популяций с увеличением содержания клеток памяти и уменьшением содержания наивных Т-клеток [18]. Возможно, этими изменениями можно объяснить данные о сохранении иммунной отзывчивости к антигенам, с которыми организм контактировал ранее в возрасте, но снижением иммунного ответа к антигенам инфекционным, опухолевым, вакцинальным, с которыми старческий организм встречается в пер-

вые [1]. Здесь следует напомнить о снижении поликлональности ТКР и возрастании настроенности к полному центральной толерантности и аутоиммунной реактивности. Последнее находит подтверждение в данных о снижении экспрессии в тимусе тканево-рестриктированных антигенов, по-видимому, вследствие уменьшения количества ЭКТ, экспрессирующих AIRE-ген, так же как снижения уровня его экспрессии в отдельно взятой клетке [2, 10]. В силу последних нарушений клетки тимуса не могут обеспечить формирование центральной толерантности к ауто-антигенам и Т-клетки с высоко аффинным рецептором мигрируют на периферию, где и обуславливают возрастание аутоиммунных реакций с возрастом.

В отношении характеристики тимусных Treg нельзя сказать, что имеются четкие представления об их статусе в старости. С одной стороны, данные свидетельствуют о снижении в тимусе их количества в процессе старения на фоне увеличения их пропорции среди циркулирующих Т-клеток на периферии. Одним из возможных механизмов негативного участия тимуса в процессах старения является у мышей ремиграция в тимус клеток Treg с периферии, где они ингибируют развитие *de novo* местных Treg. С возрастом пропорция мигрировавших в тимус Treg возрастает, а образование местных Treg уменьшается. Предполагается, что аналогичный процесс происходит и у человека [19].

Выше уже говорилось о том, что периферические, активированные и дифференцированные Treg мигрируют в тимус, где они ингибируют развитие *de novo* местных Treg. Очень важно то, что с возрастом пропорция мигрировавших в тимус Treg возрастает [19]. К сожалению, нет данных о возможности повторной миграции из тимуса ранее ремигрировавших в него Treg. Если да, то какова их иммуносупрессорная активность? Если повторной миграции нет, не является ли процесс ремиграции в Treg причиной увеличения в старости признаков аутоиммунной реактивности вследствие снижения миграции числа Treg, образованных в тимусе *de novo*? Можно думать, что при разных патологиях данный процесс может меняться в ту или другую сторону: увеличение миграции Treg в тимус с последующим снижением производства собственных Treg может характеризовать аутоиммунную патологию, а уменьшение миграции на фоне нормального воспроизводства Treg в тимусе станет характеристикой опухолевого процесса в организме.

В настоящее время представляется трудным объяснение увеличения частоты в старости двух несопоставимых заболеваний, различных с точки зрения участия в их патогенезе Treg. Это относится к онкозаболеваниям, где активность Treg

считается повышенной, и аутоиммунным заболеваниям, где сниженная активность Treg является одним из самых значимых факторов иммунопатогенеза. Данные свидетельствуют о снижении с возрастом производства Treg в тимусе и об увеличении пропорции Treg с возрастом в периферической крови с усилением супрессорной активности последних [4, 9, 16]. Можно предположить, что в иммунопатогенезе этих двух не очень сходных или совсем не сходных заболеваний принимают участие различные субпопуляции Treg, если учесть наличие в тимусе двух отличных предшественников Treg, потомки каждой из которых принимают участие в патогенезе различных заболеваний с разной иммуносупрессорной активностью, или, например, участие в аутоиммунном процессе tTreg тимусного происхождения, а в онкопроцессе — участие популяции индуцированных iTreg. В литературе имеются данные о разной супрессорной активности у клеток разных субпопуляций Treg [8]. Описаны еще две субпопуляции Treg, соотношение которых в периферической крови может меняться с возрастом, одна из которых CD25^{lo} накапливается с возрастом, для функционирования которой необходим IL-15 и ее клетки экспрессируют меньше фактора Vim, чем клетки другой субпопуляции CD25^{hi}, для выживания которых необходим IL-2. Уровень последнего с возрастом снижается [14, 15]. Однако возможна и другая интерпретация описанных результатов. В литературе накопились данные о появлении у T-клеток эффекторов резистентности к супрессорному механизму Treg при различных аутоиммунных заболеваниях, включая ревматоидный полиартрит [21]. Тогда можно предположить, что те же клетки Teff, попадая в опухолевое окружение, под его влиянием становятся, наоборот, более чувствительными к супрессорным механизмам Treg. В таком случае, даже в условиях сниженной супрессорной активности Treg в старческом возрасте, их (механизмов) достаточно, чтобы подавить противоопухолевую цитотоксическую активность Teff и способствовать росту опухоли. По крайней мере, имеются данные о разной чувствительности к супрессорному эффекту клеток Teff разных субпопуляций [8]. Если хотя бы формально в литературе описано существование в тимусе двух субпопуляций предшественников для Treg, потомки которых на периферии обладают разной супрессорной активностью [17], то в отношении предшественников Teff разной чувствительности к супрессорному эффекту Treg данные, по-видимому, отсутствуют и могут представлять значительный интерес для проводимых исследований. И все же вопрос остается не решенным. С одной стороны, полом механизмов центральной толерантности в тимусе

с последующей миграцией клеток на периферии с аутоагрессивной настроенностью на фоне снижения содержания Treg в тимусе и уменьшения миграции последних. Это неминуемо должно приводить к увеличению развития аутоиммунной патологии в старости. Так оно и есть, что и регистрируется проведенными исследованиями. Но, с другой стороны, увеличение содержания Treg на периферии, по-видимому, обуславливает рост онкологической патологии. И это так оно и есть. И это подтверждается многочисленными исследованиями. Где та середина, которая позволит добраться до истины? Здесь важен один момент. В обоих случаях первопричина лежит в нарушениях функциональной активности тимуса, как центрального органа иммунной системы. А главный механизм в этих нарушениях в обоих случаях практически один и тот же, а именно нарушение центральной толерантности с миграцией из тимуса на периферию T-клеток, миновавших (обманувших) негативную селекцию в силу различных причин. Только в случае аутоиммунной патологии формировалась резистентность клеток Teff к действию Treg (и других клеток с иммуносупрессорной активностью), что и способствует развитию аутоиммунных заболеваний. В случае онкопатологии, T-клетки-эффекторы были готовы реагировать на собственные аутоантигены, которыми являются ОАА, но здесь включаются механизмы формирования периферической толерантности в виде различного рода регуляторных клеток за счет активного включения в процесс подавления иммунного ответа к опухолевым антигенам с последующим ростом опухоли. Патологии разные, а основополагающий механизм развития один и тот же, связанный с патологией тимуса.

Заключение

Если говорить о механизмах процесса старения организма, то теоретических размышлений по данной проблеме достаточно множество. По-видимому, стоит согласиться с мнением, что не может быть единой, отдельно взятой теории. Скорее всего следует размышлять о теории комплексных механизмов, определяющих процесс старения. Про старость можно говорить так, что там все плохо, все системы гомеостатические работают все хуже и хуже. Мы еще далеки от познания механизмов нормального старения, старения без болезней, без видимых болезнетворных причин. Это дело будущего и, думается, далеко не ближайшего. Но другое дело, с участием в процессе старения различных заболеваний, с их самым различным патогенезом, так или иначе обуславливающих ускорение процесса старения, являясь порой причиной непо-

средственной гибели организма. По-видимому, не последнее место как в процессе нормального старения, так в процессе старения с участием патологических вмешательств, занимает гомеостатическая иммунная система с ее набором различных иммунокомпетентных клеток, большого количества цитокинов, набором реакций на изменения антигенно-структурного гомеостаза в ответ как на аутоантигены, так и на различного рода чужеродные антигены. По крайней мере, иммунная система с ее функциональными нарушениями ложится в основу наиболее социально значимых заболеваний современного человека: аутоиммунные, онкологические, аллергические заболевания, атеросклероз. Многочисленные ли-

тературные данные свидетельствуют о ведущей роли тимуса в механизмах процесса старения, начиная с того, что в тимусе, как в одном из двух главных органов иммунной системы, очень рано в онтогенезе регистрируются возрастные изменения, связанные с ослаблением функциональной активности органа, что в конце концов и проявляется в виде различных заболеваний и процесса старения организма.

Следует признать, что можно затянуть процесс старения организма с помощью корригирующих воздействий на тимус, но вряд ли возможно когда-нибудь совсем остановить его. Старение – это венец эволюции, и без него невозможно эволюционное развитие ни живого, ни неживого.

Список литературы / References

1. Belkaid Y., Rouse B.T. Natural regulatory T cells in infectious disease. *Nat. Immunol.*, 2005, Vol. 6, no. 4, pp. 353-360.
2. Bredenkamp N., Nowell C.S., Blackburn C.C. Regeneration of the aged thymus by a single transcription factor. *Development*, 2014, Vol. 141, no. 8, pp. 1627-1637.
3. Chen W., Ten Dijke P. Immunoregulation by members of the TGF β superfamily. *Nat. Rev. Immunol.*, 2016, Vol. 16, no. 12, pp. 723-740.
4. Elyahu Y., Hekselman I., Eizenberg-Magar I., Berner O., Strominger I., Schiller M., Mittal K., Nemirovsky A., Eremenko E., Vital A., Simonovsky E., Chalifa-Caspi V., Friedman N., Yeager-Lotem E., Monsonego A., Elyahu Y., Monsonego A. Aging promotes reorganization of the CD4 T cell landscape toward extreme regulatory and effector phenotypes. *Sci. Adv.*, 2019, Vol. 5, no. 8, eaaw8330. doi: 10.1126/sciadv.aaw8330.
5. Elyahu Y., Monsonego A. Thymus involution sets the clock of the aging T-cell landscape: Implications for declined immunity and tissue repair. *Ageing Res. Rev.*, 2021, Vol. 65, 101231. doi: 10.1016/j.arr.2020.101231.
6. Ernszt D., Banfai K., Kellermayer Z., Pap A., Lord J.M., Pongracz J.E., Kvell K. PPAR γ deficiency counteracts thymic senescence. *Front. Immunol.*, 2017, Vol. 8, 1515. doi: 10.3389/fimmu.2017.01515.
7. Kellogg C., Equils O. The role of the thymus in COVID-19 disease severity: implications for antibody treatment and immunization. *Hum. Vaccin. Immunother.*, 2021, Vol. 17, no. 3, pp. 638-643.
8. Kraczyk B., Remus R., Hardt C. CD49d Treg cells with high suppressive capacity are remarkably less efficient on activated CD45RA⁺ than on naive CD45RA⁺ Tef cells. *Cell Physiol. Biochem.*, 2014, Vol. 34, no. 2, pp. 346-355.
9. Lages C.S., Suffia I., Velilla P.A., Huang B., Warshaw G., Hildeman D.A., Belkaid Y., Chougnet C. Functional regulatory T cells accumulate in aged hosts and promote chronic infectious disease reactivation. *J. Immunol.*, 2008, Vol. 181, no. 3, pp. 1835-1848.
10. Lepletier A., Hun M.L., Hammett M.V., Wong K., Naeem H., Hedger M., Loveland K., Chidgey A.P. Interplay between follistatin, activin A, and BMP4 signaling regulates postnatal thymic epithelial progenitor cell differentiation during aging. *Cell Rep.*, 2019, Vol. 27, no. 13, pp. 3887-3901.
11. Lim S.O., Li C.W., Xia W., Cha J.H., Chan L.C., Wu Y., Chang S.S., Lin W.C., Hsu J.M., Hsu Y.H., Kim T., Chang W.C., Hsu J.L., Yamaguchi H., Ding Q., Wang Y., Yang Y., Chen C.H., Sahin A.A., Yu D., Hortobagyi G.N., Hung M.C. Deubiquitination and Stabilization of PD-L1 by CSN5. *Cancer Cell.*, 2016, Vol. 30, no. 6, pp. 925-939.
12. Nanda N.K., Apple R., Sercarz E. Limitations in plasticity of the T-cell receptor repertoire. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 1991, Vol. 88, no. 21, pp. 9503-9507.
13. Naylor K., Li G., Vallejo A.N., Lee W-W., Koetz K., Bryl E., Witkowski J., Fulbright J., Weyand C.M., Goronzy J.J. The influence of age on T cell generation and TCR diversity. *J. Immunol.*, 2005, Vol. 174, no. 11, pp. 7446-7452.
14. Nishioka T., Shimizu J., Iida R., Yamazaki S., Sakaguchi S. CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ T cells and CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ T cells in aged mice. *J. Immunol.*, 2006, Vol. 176, no. 11, pp. 6586-6593.
15. Raynor J., Sholl A., Plas D.R., Bouillet P., Chougnet C.A., Hildeman D.A. IL-15 fosters age-driven regulatory T cell accrual in the face of declining IL-2 levels. *Front. Immunol.*, 2013, Vol. 4, 161. doi: 10.3389/fimmu.2013.00161.
16. Rosenkranz D., Weyer S., Tolosa E., Gaenslen A., Berg D., Leyhe T., Gasser T., Stoltze L. Higher frequency of regulatory T cells in the elderly and increased suppressive activity in neurodegeneration. *J. Neuroimmunol.*, 2007, Vol. 188, no. 1-2, pp. 117-127.
17. Santamaria J.C., Borelli A., Irla M. Regulatory T cell heterogeneity in the thymus: impact on their functional activities. *Front. Immunol.*, 2021, Vol. 12, 643153. doi: 10.3389/fimmu.2021.643153.

18. Srinivasan J., Lancaste J., Singarapu N., Hale L., Ehrlich L., Richie E. Age-related changes in thymic central tolerance. *Front. Immunol.*, 2021, Vol. 12, 676236. doi: 10.3389/fimmu.2021.676236.
19. Thiault N., Darrigues J., Adoue V., Gros M., Binet B., Perals C., Leobon B., Fazilleau N., Joffre O.P., Robey E.A., van Meerwijk J.P.M., Romagnoli P. Peripheral regulatory T lymphocytes recirculating to the thymus suppress the development of their precursors. *Nat. Immunol.*, 2015, Vol. 16, no. 6, pp. 628-634.
20. Vobořil M., Brabec T., Dobeř J., Šplíchalová I., Březina J., Čepková A., Dobeřová M., Aidarova A., Kubovčiak J., Tsyklauri O., Štěpánek O., Beneš V., Sedláček R., Klein L., Kolář M., Filipp D. Toll-like receptor signaling in thymic epithelium controls monocyte-derived dendritic cell recruitment and Treg generation. *Nat. Commun.*, 2020, Vol. 11, no. 1, 2361. doi: 10.1038/s41467-020-16081-3.
21. Wehrens E.J., Vaster S.J., Mijneer G., Meeding J., Klein M., Wulffraat N.M., Prakken B.J., van Wijk F. Anti-tumor necrosis factor α targets protein kinase B/c-Akt-induced resistance of effector cells to suppression in juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis Rheum.*, 2013, Vol. 65, no. 12, pp. 3279-3284.
22. Yang H., Youm Y.H., Dixit V.D. Inhibition of thymic adipogenesis by caloric restriction is coupled with reduction in age-related thymic involution. *J. Immunol.*, 2009, Vol. 183, no. 5, pp. 3040-3052.
23. Youm Y.H., Yang H., Sun Y., Smith R.G., Manley N.R., Vandanmagsar B., Dixit V.D. Deficient ghrelin receptor-mediated signaling compromises thymic stromal cell microenvironment by accelerating thymic adiposity. *J. Biol. Chem.*, 2009, Vol. 284, no. 11, pp. 7068-7077.

Автор:

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

Author:

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

Поступила 12.07.2023

Отправлена на доработку 20.07.2023

Принята к печати 23.07.2023

Received 12.07.2023

Revision received 20.07.2023

Accepted 23.07.2023

ПОТЕНЦИАЛЬНЫЕ МИШЕНИ ГЕПАРИНА ПРИ ПРОГРЕССИРОВАНИИ И МЕТАСТАЗИРОВАНИИ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ НОВООБРАЗОВАНИЙ

Малащенко В.В.¹, Хлусов И.А.^{1,2}, Юрова К.А.¹, Хазиахматова О.Г.¹,
Тодосенко Н.М.¹, Литвинова Л.С.^{1,2}

¹ Научно-технологический парк «Фабрика», ФГАОУ ВО «Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта», г. Калининград, Россия

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

Резюме. Онкологические заболевания занимают одну из лидирующих позиций в структуре смертности населения. Комплексный подход в онкотерапии, помимо прямого воздействия на злокачественные опухоли, направлен на снижение рисков их рецидивов и метастазирования, а также снижение тяжести побочных эффектов противоопухолевой химио- и радиотерапии заболевания. При онкологических заболеваниях повышается вязкость крови, что сопровождается гиперкоагуляционным синдромом. Для преодоления его последствий активно используются прямые и непрямые антикоагулянты, в частности гепарин и его производные. Биологические функции и структурные особенности гепарина делают его потенциальной универсальной платформой в разработке препаратов для широкого применения, в том числе в онкологии. Появление технологии фракционирования гепаринов и получения низкомолекулярных форм и их производных позволило сосредоточиться не только на антикоагуляционных эффектах, но и получать фракции с целевой фармакологической активностью. Применение антикоагулянтов в некоторых случаях позволило выявить их противоопухолевый эффект, что послужило основанием для более детального исследования фармакотерапевтических эффектов этой группы препаратов. В настоящее время получены данные о множественных путях взаимодействия гепарина и опухолевых клеток. В процессе развития первичной опухоли и при формировании вторичных метастазов в отдаленных органах есть ряд общих черт, обусловленных использованием одних и тех же молекулярно-клеточных механизмов. В качестве мишеней для гепарина здесь могут выступать молекулы, отвечающие за межклеточные взаимодействия как между опухолевыми клетками, так и между клетками опухоли и опухоль ассоциированными иммунокомпетентными клетками, преимущественно лимфоцитами и макрофагами, что способствует уходу опухоли от иммунного надзора. Другой важной мишенью являются цитокины, стимулирующие опухолевый ангиогенез. Производные гепарина способны подавлять активность опухолей и нарушать процессы

Адрес для переписки:

Литвинова Лариса Сергеевна
Научно-технологический парк «Фабрика»
236001, Россия, г. Калининград, уд. Гайдара, 6.
Тел.: 8 (4012) 59-55-95 (доп. 6634).
E-mail: larisalitvinova@yandex.ru

Address for correspondence:

Larisa S. Litvinova
Science and Technology Park "Fabrica"
6 Gaidar St
Kaliningrad
236001 Russian Federation.
Phone: +7 (4012) 59-55-95 (acc. 6634).
E-mail: larisalitvinova@yandex.ru

Образец цитирования:

В.В. Малащенко, И.А. Хлусов, К.А. Юрова,
О.Г. Хазиахматова, Н.М. Тодосенко,
Л.С. Литвинова «Потенциальные мишени гепарина
при прогрессировании и метастазировании
злокачественных новообразований» // Медицинская
иммунология, 2024. Т. 26, № 2. С. 237-252.
doi: 10.15789/1563-0625-PTO-2864

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

For citation:

V.V. Malashchenko, I.A. Khlusov, K.A. Yurova,
O.G. Khaziakhmatova, N.M. Todosenko, L.S. Litvinova
"Potential targets of heparin during progression and metastasis
of malignant neoplasms", Medical Immunology (Russia)/
Meditsinskaya Immunologiya, 2024, Vol. 26, no. 2,
pp. 237-252. doi: 10.15789/1563-0625-PTO-2864

© Malashchenko V.V. et al., 2024
The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License
DOI: 10.15789/1563-0625-PTO-2864

метастазирования на различных этапах, ингибируя активность гепараназы, P-/L-селектина, ангиогенез, модулируя хемокиновую ось CXCL12-CXCR4, регулируя активность ОАМ.

Данный краткий обзор рассматривает реальные контуры понимания и использования потенциальных антиметастатических свойств гепарина и его производных при злокачественных новообразованиях костной ткани, поскольку препараты на основе гепарина применяются в качестве антикоагулянтов при эндопротезировании крупных суставов и дефектов кости у больных остеосаркомой.

Ключевые слова: гепарин, антикоагулянты, онкология, онкогенез, метастазирование, хемокины

POTENTIAL TARGETS OF HEPARIN DURING PROGRESSION AND METASTASIS OF MALIGNANT NEOPLASMS

Malashchenko V.V.^a, Khlusov I.A.^{a,b}, Yurova K.A.^a,
Khaziakhmatova O.G.^a, Todosenko N.M.^a, Litvinova L.S.^{a,b}

^a Science and Technology Park "Fabrica", Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russian Federation

^b Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation

Abstract. In the modern world, oncological diseases occupy the leading positions in the structure of mortality. An integrated approach to oncotherapy is not only aimed at immediate affection of malignant tumors, but also directed at reducing the risk of tumor recurrence and metastasis, as well as alleviating side effects of chemotherapy and radiotherapy of the disease. In oncologic disorders, blood viscosity increases, thus being associated with hypercoagulation syndrome. To prevent its consequences, the direct and indirect anticoagulants, especially heparin and its derivatives, are actively used. Biological functions and structural features of heparin make it a potential universal platform of a drug development for broad application, including oncology. With the advent of heparin fractionation technology and preparation of low-molecular weight forms and their derivatives, it has become possible to focus not only on anticoagulant activity but also to obtain fractions with targeted pharmacological activity. Usage of the anticoagulants has shown their antitumor activity in some cases, thus providing a basis for a more detailed study of pharmacotherapeutic effects of this group of drugs. Currently, some data suggest various pathways of interaction between heparin and tumor cells. There are multiple common features in development of a primary tumor and formation of secondary distant metastases, which may be attributed to similar molecular cellular mechanisms. The molecules mediating intercellular interactions, both between the tumor cells and between malignant cells and tumor-associated immune cells (e.g., lymphocytes and macrophages) may serve as targets for heparin thus helping the tumor to evade immune surveillance. The cytokines that stimulate tumor angiogenesis represent another important therapeutic target. Heparin derivatives are able to suppress tumor activity and prevent metastatic processes at various stages by inhibiting heparanase, P-/L-selectin, and angiogenesis activity, modulating the CXCL12-CXCR4 chemokine axis, and regulating OAM activity.

This brief review addresses the current understanding and application of the potentially antimetastatic properties of heparin and its derivatives in malignant bone tumors since the heparin-based drugs are used as anticoagulants in arthroplasty of large joints and bone defects in patients with osteosarcoma.

Keywords: heparin, anticoagulants, oncology, oncogenesis, metastasis, chemokines

Работа выполнена при финансовой поддержке Государственного задания № FZWM-2020-0010 Балтийского федерального университета им. И. Канта.

Введение

Современные онкологические заболевания занимают одну из лидирующих позиций в структуре смертности населения. Комплексный под-

ход в онкотерапии, помимо прямого воздействия на злокачественные опухоли, направлен на снижение рисков их рецидивов и метастазирования, а также снижение тяжести побочных эффектов противоопухолевой химио- и радиотерапии заболевания [111]. При онкологических заболеваниях повышается вязкость крови (прежде всего, при опухолевом метастазировании), что сопровождается гиперкоагуляционным синдромом. Для пре-

одоления его последствий активно используются прямые и непрямые антикоагулянты, в частности, гепарин и его производные [19]. Применение антикоагулянтов в некоторых случаях позволило выявить их противоопухолевый эффект [19], что послужило основанием для более детального исследования фармакотерапевтических эффектов этой группы препаратов. В настоящее время получены данные о множественных путях взаимодействия гепарина и опухолевых клеток [60]. В то же время нефракционированные гепарины – это функционально гетерогенная смесь гепаринов. Появление технологии фракционирования гепаринов и получения низкомолекулярных форм и их производных позволило сосредоточиться не только на антикоагуляционных эффектах, но и получать фракции с целевой фармакологической активностью. Таким образом, гепарин и его производные становятся инструментом точечного воздействия на рост и развитие опухолей и сопутствующие этим процессам эффекты, такие как гиперкоагуляция и метастазирование.

Целью данного обзора стала оценка современных данных по влиянию гепарина и его производных на различные этапы онкогенеза и опухолевого метастазирования.

Гепарины (характеристики гепарина и его производных)

Гепарины – это группа структурно гомологичных, но функционально плейотропных природных гликозаминогликанов (ГАГ), что обусловлено электростатическими взаимодействиями и влиянием сульфатирования на четвертичную структуру молекул. Обычно гепарины подразделяют на две группы: нефракционированный гепарин (НФГ) и низкомолекулярные гепарины (НМГ) [86].

НФГ содержит смесь молекул гепарина с молекулярной массой от 6 кДа до 60 кДа и чаще всего извлекается из тканей животных (в основном из слизи у свиней). Это накладывает ряд ограничений, в частности существуют риски микробного загрязнения фармацевтического гепарина, этические и коммерческие риски и издержки, обусловленные особенностями получения сырья, что в сочетании с растущим спросом привело к поиску новых источников гепаринов, как животного происхождения, так и полученных биотехнологическими методами. НФГ, как и другие ГАГ, представляет из себя сложную линейную полисахаридную структуру повторяющихся единиц уроновой кислоты и D-глюкозамина/N-ацетил-D-глюкозамина, содержащую большое количество сульфатированных групп. Функционально, полианионные молекулы гепаринового проте-

огликана способны концентрировать различные положительно заряженные молекулы цитокинов, факторов роста, протеаз, которые секретируются тучными клетками при их стимуляции/дегрануляции [86]. Таким образом, структурные особенности и биологическая роль гепарина объясняют его функциональную плейотропность при использовании в качестве фармацевтического препарата.

Известно, что из полностью процессированных молекул гепарина только одна из трех способна связываться с антитромбином (АТ) [92]. Также показано, что гепарины, из-за особенностей сульфатирования, по-разному проявляют антикоагулянтные эффекты к фактору свертывания Ха (FXa) и тромбину. Это позволило разработать технологии получения более коротких вариантов гепарина с оптимизированной антикоагулянтной активностью и сниженным риском кровотечений по сравнению с НФГ. Фрагментация НФГ химическими или ферментативными методами позволяет получать более короткие варианты гепарина (НМГ) с молекулярной массой от 1 кДа до 10 кДа [9, 10]. Использование современных методов биосинтеза позволяет синтетически модифицировать НМГ путем добавления или замены некоторых химических групп в структуру молекулы [74]. Среди производных НМГ можно выделить гепариноподобные гликозаминогликаны (HLGAG), сульфатированный неантикоагулянтный гепарин (S-NACH), низкомолекулярный гепарин-таурохолат-тетрамер дезоксихолат (LHTD4), LHTD4/DCK (комплекс LHTD4 и дезоксихолилэтиламина DCK), высокомолекулярный гепариноподобный полисахарид, полученный из *Escherichia coli* K5 (K5-NSOS), LHsura (комплекс гепарина и фрагмента сурамина) и LHbisD4 (конъюгат низкомолекулярного гепарина и четырех бис-дезоксихолатов) и др. [60]. Они способны связываться с широким спектром белков, что определяет высокое разнообразие регуляторных эффектов, а также имеют разные фармакокинетические профили, что необходимо для диверсифицированного применения в клинической практике. НМГ, в отличие от НФГ, обладают более высокой биодоступностью, лучше дозируются и вызывают меньше побочных эффектов [46, 103]. Антикоагулянтные эффекты гепарина нами подробнее рассматривались ранее [56], далее речь пойдет преимущественно о неантикоагулянтных эффектах. Разнообразие подобных эффектов привело к разработке альтернативных препаратов на основе гепарина, не проявляющих антикоагулянтную активность [17], а

особый интерес представляет их использование в онкологии.

Онкогенез и метастазирование

Благодаря современным медицинским технологиям, продолжительность жизни людей значительно выросла. Вместе с тем «старение» населения увеличивает частоту онкологических заболеваний, как одной из самых смертоносных и социально значимых патологий, особенно в развитых регионах планеты [89]. Ключевым фактором неблагоприятных исходов при злокачественных опухолях является метастазирование. Метастазирование – сложный, многоэтапный и многофакторный процесс, в рамках которого на фоне развития и прогрессирования первичного опухолевого узла, происходит отделение и диссеминация циркулирующих опухолевых клеток (ЦОК) через лимфатические или кровеносные сосуды [45, 99].

Прогрессирование солидных опухолей во многом обусловлено не только накопленными в раковых клетках генетическими мутациями, но и опухолевым микроокружением, которое играет ключевую роль и является необходимой предпосылкой для метастазирования [35]. Ведущим компонентом опухолевого микроокружения являются иммунокомпетентные клетки, среди которых можно выделить Т-клетки, дендритные клетки и макрофаги. При этом опухоль-ассоциированные макрофаги (ОАМ) представлены не только тканевыми макрофагами, исходно контактировавшими с клетками до их злокачественной трансформации, но и макрофагами, происходящими из моноцитов периферической крови, инфильтрирующих опухоль в процессе ее формирования и развития, а также супрессорными клетками миелоидного происхождения (Myeloid-derived suppressor cells (MDSCs)) [33].

ОАМ – наиболее многочисленная, хотя и достаточно гетерогенная и полифункциональная популяция иммунных клеток, инфильтрирующих опухоль [22, 80]. В целом макрофаги, в том числе и ОАМ, обладают высокой функциональной пластичностью. Вместе с тем можно выделить два наиболее выраженных состояния их функциональной поляризации: классический активированный М1-фенотип и альтернативно активированный М2-фенотип [20, 75, 91]. Важно, что в ответ на сигналы, генерируемые опухолевыми клетками, например ИЛ-8, может происходить М2-поляризация ОАМ [77, 104]. М2-макрофаги секретируют широкий спектр противовоспалительных цитокинов, в том числе ИЛ-10, ИЛ-13 и TGF- β , что в контексте опухолевого микроокружения стимулирует развитие опухоли и ее уход от иммунного надзора. Есть ряд исследований,

которые наглядно демонстрируют, что плотность и локализация М2-ОАМ связаны с неблагоприятным клиническим исходом при различных вариантах солидных опухолей [28, 62].

В свою очередь М2-ОАМ способствуют эпителиально-мезенхимальному переходу клеток опухоли, что увеличивает их миграционный и инвазивный потенциал. Раковые клетки после такого перехода могут дополнительно секретировать GM-CSF и CCL2, что стимулирует рекрутирование макрофагов [109] и формирует петлю обратной связи («порочный круг»). ЦОК, происходящие из первичной опухоли или из метастатических очагов, считаются предшественниками метастазов [7]; приобретение ими дополнительных мезенхимальных признаков в результате эпителиально-мезенхимального перехода способствует их выживанию и метастазированию [67, 79]. Таким образом, взаимодействие между ОАМ и опухолью создает условия для метастазирования, опосредованного ЦОК, за счет регуляции их мезенхимальной трансформации по оси STAT3/miR-506-3p/FoxQ1 [106]. Другой механизм, способствующий выживанию ЦОК, это формирование так называемой «тромбоцитарной оболочки» [53]. Однако, помимо защитной функции, тромбоциты способствуют прикреплению ЦОК, ангиогенезу, опухолевому росту и образованию метастатического очага [52]. ЦОК активно синтезируют множество медиаторов, активирующих тромбоциты: тромбоксан А₂, тромбин, АДФ, CD97, и HMGB1 [65, 83]. Это приводит к повышенной активации тромбоцитов, которая способствует усилению адгезии между тромбоцитами и ЦОК и является одной из причин протромботического состояния при раке [63]. Активированные тромбоциты экспрессируют молекулы адгезии, в частности различные интегрины (α IIb β III, α 2 β 1, α 5 β 1, α 6 β 1, α L β 2, α v β 3), GPIb-IX-V, GPVI, CLEC-2 и P-селектин [110]. Достаточно подробно описано блокирующее взаимодействие гепарина со многими из перечисленных молекул, что делает их возможной мишенью для противоопухолевой и противометастатической терапии с использованием гепарина (рис. 1, см. 2-ю стр. обложки).

В целом процессы опухолевого прогрессирования и метастазирования можно разделить на следующие этапы: прогрессирование первичной опухоли, инвазия и интравасация, циркуляция, экстравазация и формирование метастазов (формирование преметастатической ниши, формирование микрометастазов и метастатическая колонизация) [68]. Далее мы опишем различные потенциальные мишени для гепарина и его производных на разных этапах.

В процессе развития первичной опухоли и при формировании вторичных метастазов в отдаленных органах есть ряд общих черт, обусловленных использованием одних и тех же молекулярно-клеточных механизмов. В качестве мишеней для гепарина здесь могут выступать молекулы, отвечающие за межклеточные взаимодействия как между опухолевыми клетками, так и между клетками опухоли и опухоль-ассоциированными иммунокомпетентными клетками, преимущественно лимфоцитами и макрофагами, что способствует уходу опухоли от иммунного надзора [105]. Другой важной мишенью являются цитокины, стимулирующие опухолевый ангиогенез [72].

1. Первичная опухоль, ангиогенез и опухоль ассоциированный «иммунитет»

1.1. Опухоль-ассоциированные макрофаги и гепарин

Наиболее многочисленной группой иммунокомпетентных клеток, взаимодействующих с раковыми клетками, принято считать ОАМ [105], что делает их наиболее вероятной целью для воздействия гепарином или его производными. В этом плане НФГ, как правило, подавляет провоспалительную активность макрофагов. Так, на примере мышинных перитонеальных макрофагов было продемонстрировано, что в присутствии гепарина снижается LPS-индуцированная продукция провоспалительных цитокинов: TNF α , IL-6, IL-8 и IL-1 β , за счет индукции Кавеолина-1 и активации p38/MAPK-пути (рис. 1.3) [57]. Важно, что индукция Кавеолина-1 происходит не только на макрофагах, но и на опухолевых клетках. Его роль в онкогенезе неоднозначна, с одной стороны, он повышает клеточную подвижность, что способствует распространению опухолевых клеток, а с другой – снижает их пролиферативный потенциал [87, 108].

В других работах продемонстрировано, что гепарин снижает продукцию TGF- β макрофагами при пуромициновом гломерулосклерозе. Интерес представляет тот факт, что при этом снижается инфильтрация воспаленных участков макрофагами [18]. В то же время, что на фоне гипергликемического стресса гепарин способствует снижению макрофагальной продукции провоспалительных факторов (iNOS и TNF α), и, напротив, приводит к увеличению содержания в кровотоке противовоспалительных молекул, таких как: ARG-1 и IL-10 в мышинной модели гипергликемии [1]. Исследования по взаимодействию гепарина с HMGB1 (ядерным негистоновым ДНК-связывающим белком) также демонстрируют его противовоспалительный эффект. HMGB1 секретируется во время воспаления, но не обладает

выраженной провоспалительной активностью, однако взаимодействуя с другими активаторами, например, LPS может значительно усиливать их эффекты. HMGB1 способствует фосфорилированию p38 и ERK1/2, что в свою очередь приводит к усилению продукции TNF α [51]. При этом гепарин напрямую связывается с HMGB1 и препятствует его взаимодействию с рецептором конечных продуктов усиленного гликирования (RAGE); добавление гепарина также ингибирует TNF α и IL-6, высвобождаемые макрофагами в ответ на HMGB1 [55]. Здесь важно отметить, что HMGB1 способствует тромбозу, воспалению, инициирует иммунный ответ посредством рекрутирования/активации моноцитов/макрофагов [102]. Таким образом, блокирование HMGB1 с помощью НФГ будет иметь разнонаправленный эффект.

Для более избирательного воздействия на опухоль можно использовать НМГ вместо НФГ. Для опухолевых клеток характерно использование клеточных механизмов, задействованных при эмбриогенезе, в том числе и при формировании иммунной толерантности. Общность этих механизмов предполагает и схожие эффекты гепарина на них. В контексте первичной невынашиваемости беременности наблюдается повышенная экспрессия HLA-DR и CD206 в макрофагах в ответ на НМГ Innoher[®] (тинзапарин натрия) (рис. 1.1). Это сопровождается повышенной секрецией хемокина CCL20, ассоциированного с Th17 клетками (рис. 1.4), и пониженной секрецией молекул CCL2, связанных с M2-фенотипом макрофагов (рис. 1.2) [82]. Таким образом, НМГ, и, в частности Innoher[®], теоретически могут способствовать и провоспалительной M1-поляризации ОАМ. Использование НМГ и его производных с заданными свойствами может быть направлено на снижение протективного цитокинового фона опухоли.

1.2. Иммуносупрессивное микроокружение опухоли и гепарин

Одной из причин выживания опухолей, наряду с ОАМ, является формирование иммуносупрессорного микроокружения, важную роль в котором играют CD25⁺FoxP3⁺Treg клетки, которые отвечают за иммунотолерантность к раковым клеткам. В контексте ускользания опухоли от иммунного надзора особый интерес представляют эффекты гепарина, направленные на регуляцию активности лимфоидного звена иммунной системы. Существует потенциальная возможность модуляции иммунореактивности инфильтрирующих опухоль Т-лимфоцитов (ИОЛ) с помощью гепарина и/или его производных с отрицательно заряженным сульфатированием.

По крайней мере реакция трансплантат против хозяина (РТПХ) и первичная невынашиваемость при беременности показывают возможность такого подхода. Введение гепарина значительно увеличивает долю CD25⁺FoxP3⁺Treg среди CD4⁺ клеток, что снижает выраженность РТПХ, как это было показано на мышинной модели, и на человеческих клеточных линиях. При этом наблюдается подавление активности эффекторных Т-клеток, общее снижение количества CD8⁺ и CD4⁺Т-лимфоцитов, увеличение продукции IL-2 наивными Т-клетками, стимулированными антителами против CD3 в присутствии трансформирующего фактора роста-бета (TGF-β) [39]. В то же время в случае первичной невынашиваемости беременности описаны противоположные результаты. При использовании НМГ наблюдается пониженный уровень CCL22, связанного с Th2-лимфоцитами, и снижение доли регуляторных Т-клеток (CD25⁺FoxP3⁺Treg) на фоне увеличения продукции IFN (рис. 1.5) [14]. Следует подчеркнуть, что такая разнонаправленность эффектов НМГ требует более тщательного подбора НМГ во избежание нежелательных эффектов при онкологической патологии. Среди ожидаемых положительных эффектов гепарина стоит отметить увеличение концентрации Th1-ассоциированных хемокинов CXCL10 и CXCL11 (рис. 1.6) и Th17-ассоциированного хемокина CCL20 (рис. 1.4), аналогичное тому, что наблюдается в плазме у женщин, получавших НМГ [82]. В случае беременности такие результаты являются негативными, приводящими к выкидышу. Однако в отношении регуляции активности опухоль-ассоциированных иммунных клеток они выглядят вполне обнадеживающими. Гепарин может оказывать влияние на CD8⁺Т-лимфоциты. Существует проблема кластеризации Т-клеток за счет ICAM-1-опосредованной агрегации активированных CD8⁺ гомотипических лимфоцитов из микроокружения опухоли, как опухоль-опосредованного механизма торможения иммунитета. Это приводит к нарушению миграции клеток в дренирующие опухоль лимфатические узлы в моделях *in vitro*. Нарушение взаимодействий LFA-1-ICAM-1 с последующей декластеризацией может быть полезно для улучшения прохождения активированных лимфоцитов к лимфатическим узлам и их последующей рециркуляции [112]. Есть данные о влиянии гепарина на LFA-1-ICAM-1 опосредованную межклеточную коммуникацию. Так, в модели взаимодействия клеток линии HUVEC и полиморфоядерных лейкоцитов, стимулированных IL-1β, LPS и TNFα, НФГ, НМГ и О-десульфатированные производные гепарина оказывали выраженный ингибирующий

эффект на клеточную адгезию, опосредованную LFA-1-ICAM-1 и дополнительно способствовали небольшому снижению экспрессии ICAM-1 и E-селектинов [48]. Подобный эффект может быть реализован и в отношении опухоли инфильтрирующих CD8⁺Т-лимфоцитов (рис. 1.7), что может иметь положительное действие при противоопухолевой терапии с использованием гепарина и/или его производных.

1.3. Опухолевый ангиогенез и гепарин

Важным фактором развития злокачественной опухоли и ее метастазирования является опухолевый ангиогенез. Одними из ключевых цитокинов, регулирующих этот процесс, считаются белки семейства фактора роста эндотелия сосудов (VEGF). Они индуцируют митотические процессы, инвазию эндотелиальных клеток и формирование капилляров. Предполагается наличие гепаринсвязывающего домена у всех белков семейства VEGF, что обуславливает эффекты гепарина и его производных не только в отношении лимфоангиогенеза, но и в более широком контексте. Известно, что при эпителиальных злокачественных опухолях частота метастазирования клеток через кровеносные сосуды в 3-5 раз меньше, чем через лимфатические. Примечательно, что в лимфоангиогенезе важную роль играет взаимодействие VEGF-C/VEGFR-3 [93, 97]. Среди различных производных гепарина, в качестве ингибитора этого сигнального пути наилучшим образом себя зарекомендовал конъюгат НМГ и четырех бис-дезоксихолатов (LHbisD4) (рис. 1.8) [21]. В модели рака молочной железы (опухоли 4T1 и MDA-MB-231) было продемонстрировано, что применение LHbisD4 приводит к снижению метастазирования в лимфатические сосуды по сравнению с контрольной группой [32, 81]. Эффект от LHbisD4 был более выражен, чем от НМГ, и не был ассоциирован с антикоагуляционным эффектом гепарина. Другое производное гепарина, комплекс LHTD4 и дезоксихолилэтиламина DCK (LHTD4/DCK) также ингибирует ангиогенез, что приводит к торможению роста опухоли уже в мышинной модели плоскоклеточной карциномы [3]. Комплексная терапия НМГ и адриамицином приводит к снижению экспрессии VEGF в опухолевой ткани, запускает апоптоз опухолевых клеток и уменьшает метастазирование в мышинной модели рака молочной железы [113]. При сравнении НМГ и его конъюгата с сурамином (LHsura) выяснено, что противоангиогенная активность конъюгата заметно более выражена [76]. В дополнение к ингибированию ангиогенеза, гепарин и его производные способны снижать VEGF-индуцированную проницаемость эндотелиального барьера [40]. Совокупные

эффекты гепарина в отношении лимфоангиогенеза и ангиогенеза обусловлены его биологическими свойствами, способностью концентрировать различные молекулы, тем самым делая их недоступными. Это позволяет развигать новые терапевтические подходы с применением гепарина, помогающие блокировать развитие опухолей и препятствующие метастазированию.

2. Инвазия и интравасазия/экстравасазия. Формирование метастазов (преметастатическая ниша, микрометастазы, метастатическая колонизация) и гепарин

Опухоль обладает слаборазвитой сосудистой сетью, которая формирует микроокружение с постоянно меняющимися уровнями кислорода и питательных веществ, что приводит к периодическому воздействию окислительного стресса и гипоксии на опухолевые клетки [25], накоплению мутаций и способствует миграции и метастазированию. При диапедезе клетки проникают (инвазируют) через базальную мембрану, которая состоит из сложной сети производных коллагена и гликозаминогликанов (в частности гепарансульфата) и может быть не фенестрированной. Поэтому эффективность клеточной миграции во многом зависит от активности гидролитических ферментов, в том числе гепараназы, которая обеспечивает расщепление гепарансульфата, консолидирующего, наряду с другими ГАГ, волокнистый экстрацеллюлярный матрикс (ЭЦМ) [78, 95]. Макромолекулы гепарансульфата, благодаря своей способности связываться с цитокинами и ростовыми факторами, могут создавать «резервуар» сигнальных молекул во внеклеточном матриксе и на поверхности клеток, тем самым регулируя передачу сигналов и межклеточную коммуникацию, а активность гепараназы способствует ремоделированию ЭЦМ как части клеточного микроокружения [36]. Таким образом, гепараназа является важным модификатором микроокружения самой опухоли и окружающих ее сосудов и здоровых тканей, участвует в процессах ангиогенеза, инвазии и метастазирования, что делает ее принципиальной мишенью для противораковой терапии [5, 27, 71]. Известны два высокоафинных гепарин/гепарисульфат-связывающих домена, блокировка которых ингибирует активность гепараназы [49]. Это делает перспективным использование гепарина для нейтрализации гепараназы, что должно способствовать снижению инвазивного потенциала опухолевых клеток (рис. 1.9). Однако активность гепараназы характерна не для всех видов опухолей, например, при карциноме толстой кишки наблюдается низкая экспрессия гепараназы, и, что интересно, гепарин и его производные не

проявляли антиметастатической активности в ее отношении. В то же время продемонстрирована эффективность производных гепарина в качестве ингибитора метастазирования меланомы [27]. Гепариноподобный гликополимер со специфическим паттерном сульфатирования, разработанный в качестве ингибитора гепараназы, подавляет метастазирование рака молочной железы [58]. Есть ряд клинических испытаний препаратов на основе миметиков гепарина (ронепарстат и некупараниб) для терапии рака с выраженной активностью гепараназы [26, 116]. Миметик гепарина PG545 проявляет сильный эффект за счет активации аутофагии через сигнальный путь NF-κB в клетках лимфомы [107]. Он же в сочетании с сорафенибом (ингибитор тирозинкиназы) продемонстрировал высокую антиметастатическую активность в отношении рака печени в мышинной модели [24]. В целом применение производных гепарина и его миметиков с высокой аффинностью к гепараназе, демонстрирует перспективные результаты подавлении метастазирования некоторых видов рака (рис. 1.9).

На начальном этапе развития метастаз ключевую роль играет формирование клеточных конгломератов, микрометастазов; в этот процесс включены различные трансмембранные молекулы, в том числе и CD44, который является рецептором гиалуронана и обладает аффинностью к E- и L-селектинам [2, 88]. В этом отношении экзогенный гепарин ингибирует образование опухолевых сфер гепатомы, по-видимому, за счет конкурентного связывания с CD44-рецептором и блокирования его сигналинга (рис. 1.13) [54]. Это делает перспективным использование производных гепарина для профилактики опухолевого метастазирования, воздействуя на ранние этапы этого процесса.

Ключевым фактором, необходимым для эффективной трансэндотелиальной миграции клеток, является активация эндотелия, что в сочетании с формированием хемокинового градиента при замедлении кровотока способствует управляемому рекрутированию клеток из кровеносного русла с последующим прикреплением к стенке сосуда. Селектины – ключевые молекулы адгезии, в норме опосредующие взаимодействие между лейкоцитами, эндотелиальными клетками и тромбоцитами [50]. Выделяют 3 типа селективов: P-селектин, который хранится в α-гранулах тромбоцитов и тельцах Вейбеля–Паладе эндотелиальных клеток; E-селектин экспрессируется *de novo* в ответ на активацию клеток эндотелия и L-селектин, который конститутивно экспрессируется на клеточной поверхности почти всех субпопуляций лейкоцитов [38]. Селективная

клеточная адгезия осуществляется за счет гетеротипических взаимодействий их С-лектинового домена с гликанами. Межклеточные контакты опухолевых клеток с лейкоцитами, тромбоцитами и клетками эндотелия, опосредованные селектинами, ассоциированы с неблагоприятным прогнозом у онкологических больных [13, 31, 37]. Важно, что Р- и L-селектин могут связываться с сульфатированными гликанами, включая гепарин, гепарансульфат, фукоидан и сульфатированные гликолипиды [43, 73, 100], что препятствует взаимодействию селектинов с лигандами опухолевых клеток. Это указывает на то, что гепарин способен препятствовать селектин-опосредованным межклеточным контактам и, как следствие, опухолевому метастазированию (рис. 1.10) [12, 24, 47, 94]. Применения модифицированных аналогов гепарина с анти-Р-селективной активностью продемонстрировано снижение очагов метастатических поражений на мышинной модели, однако подобный эффект не наблюдался у мышей с дефицитом Р-селектина [34]. В модели рака поджелудочной железы MPanc96 сульфатированный неантикоагулянтный гепарин (S-NACH) подавлял адгезию и последующую инвазию опухолевых клеток [96]. Также показано, что гепарин нарушает адгезию между клетками аденокарциномы толстой кишки LS180 мышей и Р-селектином [12, 101]. Похожий эффект наблюдался и при исследовании гликополимеров, имитирующих гепарин в модели метастатической меланомы B16 у мышей [16]. Ранее, аналогичный эффект был описан при оценке влияния конъюгатов гепарина (поли-2-аминоэтилметакрилатного гликополимера с нативным гепариндисахаридом) в отношении клеток меланомы [15]. Совокупные результаты исследований демонстрируют эффективность гепарина и его производных в качестве ингибитора селектин-опосредованного опухолевого метастазирования.

3. Циркуляторное русло

3.1. Тромбоциты

Метастатическое распространение опухоли — многоэтапный процесс, который во многом базируется на перекрестных взаимодействиях, трансформированных и стромальных клеток опухолевого и тканевого микроокружения. Как уже упоминалось выше, селектины активно экспрессируются на поверхности тромбоцитов и обеспечивают адгезию, в том числе с клетками опухоли. В кровотоке ЦОК часто окружены тромбоцитами. Тромбоцитарный Р-селектин может связываться с муцинами гликокаликса опухолевых клеток (в частности карциномы), что, в дальнейшем, способствует метастазированию [12]. Тромбоциты могут, с одной стороны, способствовать

защите опухолевых клеток, а с другой — служат «мостом» между клетками опухоли и эндотелием сосудов [69, 70]. Таким образом, гепарин и его производные, направленные на взаимодействие с Р-селектином (описанные выше), эффективно препятствуют тромбоцитарно-опухолевому взаимодействию, снижая выживаемость ЦОК и их миграционный, инвазивный и метастатический потенциал (рис. 1.10). Однако тромбоциты могут опосредовать взаимодействие опухолевых клеток и ЭЦМ за счет экспрессии интегринов, но и в этом случае производные гепарина демонстрируют свою эффективность. Модифицированные гепарины с низкой антикоагулянтной активностью (RO-гепарин, CR-гепарин, N-2,3-DS-гепарин и 2,3-O-DS-гепарин) могут препятствовать адгезии между тромбоцитами и клетками меланомы A375 за счет блокирования интегрин $\alpha\text{IIb}\beta_3$ (рис. 1.11) [114]. Также гепарин и его производные способны блокировать взаимодействие VLA-4 (Интегрин $\alpha_4\beta_1$) / VCAM-1 в клетках меланомы B16F10 и меланомы MV3 [84, 85]. Но этот эффект практически не наблюдается для коротких вариантов гепарина и во многом зависит от плотности его сульфатирования [84]. Помимо селектинов и интегринов, важное значение в межклеточной коммуникации играют также кадгеринины. На клеточной линии MPanc96-luc показан антиметастатический эффект от применения гепарина [6]. Интересно, что на фоне снижения метастатической активности наблюдалось снижение концентрации E-кадгерина. Здесь стоит отметить важную роль E-кадгерина в эпителиально-мезенхимальном переходе. По-видимому, гепарин (S-NACH) может препятствовать функциональной модификации опухолевых клеток за счет снижения экспрессии E-кадгерина. Таким образом, гепарин и его производные могут снижать эффективность взаимодействия опухолевых клеток и тромбоцитов с одной стороны и препятствовать их эпителиально-мезенхимальному переходу — с другой (рис. 1.15). Это важно, так подобные эффекты проявляются в отношении ЦОК, пока они циркулируют и, соответственно, являются более уязвимыми, теряя при это очень важный защитный механизм.

3.2. Хемокины

Другим важным элементом межклеточных взаимодействий является хемокиновый сигналинг. Хемокины на основании количества и расположения N-концевых остатков цистеина разделяют на четыре семейства: C, CC, CXC и CX₂C. Их эффекты обусловлены взаимодействием со специфическими рецепторами на клеточной поверхности и обеспечивают регуляцию клеточного трафика и таргетную миграцию (хоуминг), что очень

важно для адекватного функционирования, в том числе иммунной системы. Вместе с тем, ЦОК также активно используют хемокиновый сигналинг при миграции и метастазировании [98]. Наиболее изучен вклад оси CXCL12/CXCR4 в этот процесс [8]. В норме эта система регулирует трафик нейтрофилов, мобилизацию стволовых клеток и их хоуминг. По-видимому, ЦОК после эпителиально-мезенхимального перехода также начинают активно использовать данную систему. В то же время гликозаминогликаны участвуют в регуляции хемокиновой активности; собственно гепарин может блокировать активность хемокинов, связывая их, выполняя функцию хемокинового депо [29]. Способность гепарина модулировать активность оси CXCL12/CXCR4 является важной составляющей его антиметастатического эффекта (рис. 1.12) [90]. В модели рака молочной железы с повышенной экспрессией CXCR4 использование гепарина и тинзапарина уменьшало метастазирование опухолевых клеток в легочную ткань [30, 64]. Эноксапарин, также способствовал снижению метастатической активности рака толстой кишки, что также обусловлено блокированием CXCL12/CXCR4 взаимодействия [59]. Низкомолекулярный гепарин-таурохолат-тетрамер дезоксихолат (LHTD4) ингибировал миграцию раковых клеток MDA-MB-231 [4]. НМГ (фраксипарин) сильно снижал инвазивную, миграционную и адгезивную способность клеток аденокарциномы легкого человека A549, которая обусловлена активностью CXCL12/CXCR4 [115]. Помимо метастазирования, блокирование CXCL12/CXCR4 гепарином может быть эффективно в качестве компонента при комбинированной терапии острого миелолейкоза (ОМЛ), так как его активность зависит от хемокиновой регуляции [44]. Общие механизмы опухолевого метастазирования и регуляции активности лейкозных клеток, основанные на взаимодействии CXCL12/CXCR4, позволяют расширить спектр применения гепарина и его производных в терапии злокачественных опухолей мезенхимного происхождения.

3.3. Раковые стволовые клетки

Основной проблемой рецидива первичного опухолевого узла и его метастазирования является формирование раковых стволовых клеток (РСК). По-видимому, РСК и ЦОК – это сильно пересекающиеся группы клеток, но не являющиеся синонимами, так как РСК могут сохраняться в первичном очаге, но именно эти клетки во многом отвечают и за метастазирование. Использование звеньев сигнальных путей в качестве мишеней для таргетной терапии рака может нести серьезные последствия, поскольку многие

сигнальные пути, например, Wnt- β catenin-TCF4, являются общими для нормальных стволовых клеток и РСК. В связи с этим тонкая регуляция активности стволовых клеток, которая во многом обусловлена эпигеномным взаимодействием с различными компонентами ЭЦМ, включая ГАГ, представляется перспективным направлением. Например, G2.2 сульфатированный несахаридный ГАГ-миметик гексасахарид гепарина способен избирательно ингибировать РСК толстой кишки за счет активации p38 MAP киназы [11]. Таким образом, гепарин и его производные или миметики способны напрямую влиять на РСК и регулировать их функциональную активность, что может быть использовано как высокоспецифичный антиметастатический инструмент (рис. 1.14).

3.4. Тромбоэмболия

Помимо метастазирования, серьезной проблемой при многих онкологических заболеваниях является венозная тромбоэмболия (ВТЭ) [66]. Гепарин, в частности НМГ, широко используется для лечения онкологических больных с признаками гиперкоагуляционного синдрома. Например, он рекомендуется в качестве препарата первого выбора, в соответствии с руководством по терапии первой линии для краткосрочного и долгосрочного лечения ВТЭ (рекомендации Европейского общества медицинской онкологии (ESMO), Национальной комплексной онкологической сети (NCCN) или Американского общества клинической онкологии (ASCO) [23, 41, 42, 61]. Опыт клинического применения НМГ в онкологии насчитывает несколько десятилетий и демонстрирует сбалансированный профиль безопасности. Комплексное сочетание антикоагуляционных и неантикоагуляционных эффектов гепарина может заметно повысить эффективность противоопухолевой терапии в плане борьбы с гиперкоагуляцией крови, а также препятствовать опухолевому метастазированию за счет ингибирования взаимодействий с тромбоцитами и нарушению межклеточной коммуникации.

Заключение

В терапии опухолевых заболеваний гепарин и его производные могут служить современной универсальной платформой. Его биологические свойства связывания с широким спектром молекул позволяют разрабатывать разнообразные модификации гепарина, регулируя, тем самым, его активность и придавая новые качества. На сегодняшний день существует широкий спектр препаратов на основе гепарина, которые активно исследуются в качестве перспективных медицинских

препаратов, в том числе и в онкологии. Производные гепарина способны подавлять активность опухолей и нарушать процессы метастазирования на различных этапах, ингибируя активность гепараназы, P-/L-селектина, ангиогенез, модулируя хемокиновую ось CXCL12-CXCR4, регулируя активность ОАМ, что в будущем позволит надеяться на более сбалансированные варианты комплексной противоопухолевой терапии. Данный краткий обзор не затрагивает ряд сложных вопросов прогрессирования и метастазирования, для которых требуется дополнительное изучение влияния гепарина и его производных. Тем не менее просматриваются реальные контуры понима-

ния и использования потенциальных антиметастатических свойств гепарина и его производных при злокачественных новообразованиях костной ткани, поскольку препараты на основе гепарина применяются в качестве антикоагулянтов при эндопротезировании крупных суставов и дефектов кости у больных остеосаркомой.

Благодарности

Авторы выражают благодарность Сибирскому государственному медицинскому университету за частичную поддержку в рамках Программы стратегического академического лидерства «Приоритет – 2030».

Список литературы / References

1. Abbadi A., Loftis J., Wang A., Yu M., Wang Y., Shakya S., Li X., Maytin E., Hascall V. Heparin inhibits proinflammatory and promotes anti-inflammatory macrophage polarization under hyperglycemic stress. *J. Biol. Chem.*, 2020, Vol. 295, no. 15, pp. 4849-4857.
2. AbuSamra D.B., Al-Kilani A., Hamdan S.M., Sakashita K., Gadhoum S.Z., Merzaban J.S. Quantitative characterization of E-selectin interaction with native CD44 and P-selectin glycoprotein ligand-1 (PSGL-1) using a real time immunoprecipitation-based binding assay. *J. Biol. Chem.*, 2015, Vol. 290, no. 35, pp. 21213-21230.
3. Alam F., Al-Hilal T.A., Chung S.W., Seo D., Mahmud F., Kim H.S., Kim S.Y., Byun Y. Oral delivery of a potent anti-angiogenic heparin conjugate by chemical conjugation and physical complexation using deoxycholic acid. *Biomaterials*, 2014, Vol. 35, no. 24, pp. 6543-6552.
4. Alam F., Al-Hilal T.A., Park J., Choi J.U., Mahmud F., Jeong J.H., Kim I.S., Kim S.Y., Hwang S.R., Byun Y. Multi-stage inhibition in breast cancer metastasis by orally active triple conjugate, LHTD4 (low molecular weight heparin-taurocholate-tetrameric deoxycholate). *Biomaterials*, 2016, Vol. 86, pp. 56-67.
5. Alekseeva A., Mazzini G., Giannini G., Naggi A. Structural features of heparanase-inhibiting non-anticoagulant heparin derivative Roneparstat. *Carbohydr. Polym.*, 2017, Vol. 156, pp. 470-480.
6. Alyahya R., Sudha T., Racz M., Stain S.C., Mousa S.A. Anti-metastasis efficacy and safety of non-anticoagulant heparin derivative versus low molecular weight heparin in surgical pancreatic cancer models. *Int. J. Oncol.*, 2015, Vol. 46, no. 3, pp. 1225-1231.
7. Au S.H., Storey B.D., Moore J.C., Tang Q., Chen Y.L., Javaid S., Sarioglu A.F., Sullivan R., Madden M.W., O'Keefe R. Clusters of circulating tumor cells traverse capillary-sized vessels. *Proc. Natl Acad. Sci.*, 2016, Vol. 113, no. 18, pp. 4947-4952.
8. Benovic J.L., Marchese A. A new key in breast cancer metastasis. *Cancer Cell*, 2014, Vol. 6, no. 5, pp. 429-430.
9. Bertini S., Bisio A., Torri G., Bensi D., Terbojevich M. Molecular weight determination of heparin and dermatan sulfate by size exclusion chromatography with a triple detector array. *Biomacromolecules*, 2005, Vol. 6, no. 1, pp. 168-173.
10. Bertini S., Fareed J., Madaschi L., Risi G., Torri G., Naggi A. Characterization of PF4-heparin complexes by photon correlation spectroscopy and zeta potential. *Clin. Appl. Thromb. Hemost.*, 2017, Vol. 23, no. 7, pp. 725-734.
11. Boothello R.S., Patel N.J., Sharon C., Abdelfadiel E.I., Morla S., Brophy D.F., Lippman H.R., Desai U.R., Patel B.B. A unique nonsaccharide mimetic of heparin hexasaccharide inhibits colon cancer stem cells via p38 MAP kinase activation. *Mol. Cancer Ther.*, 2019, Vol. 18, no. 1, pp. 51-61.
12. Borsig L., Wong R., Feramisco J., Feramisco J., Nadeau D.R., Varki N.M., Varki A. Heparin and cancer revisited: mechanistic connections involving platelets, P-selectin, carcinoma mucins, and tumor metastasis. *Proc. Natl Acad. Sci.*, 2001, Vol. 98, no. 6, pp. 3352-3357.
13. Borsig L., Stevenson J.L., Varki A. Heparin in cancer: role of selectin interactions. Cancer-associated thrombosis. CRC Press, A.A. Khorana, and C.W. Francis, editors. New York: Informa Healthcare, 2007, pp. 113-130.
14. Bruno V., Svensson-Arvelund J., Rubér M., Berg G., Piccione E., Jenmalm M.C., Ernerudh J. Effects of low molecular weight heparin on the polarization and cytokine profile of macrophages and T helper cells in vitro. *Sci. Rep.*, 2018, Vol. 8, no. 1, pp. 1-9.
15. Cai Z., Teng L., Zhou J., Yan Y., Zhang Y., Lv G., Chen J. Design and synthesis of a native heparin disaccharide grafted poly 2 aminoethyl methacrylate glycopolymer for inhibition of melanoma cell metastasis. *Int. J. Biol. Macromol.*, 2019, Vol. 126, pp. 612-619.

16. Cai Z., Yan Y., Zhou J., Yang Y., Zhang Y., Chen J. Multifunctionalized brush-like glycopolymers with high affinity to P-selectin and antitumor metastasis activity. *Biomacromolecules*, 2021, Vol. 22, no. 3, pp. 1177-1185.
17. Cassinelli G., Naggi A. Old and new applications of non-anticoagulant heparin. *Int. J. Cardiol.*, 2016, Vol. 212, pp. S14-S21.
18. Ceol M., Vianello D., Schleicher E., Anglani F., Barbanti M., Bonfante L., Bertaglia G., Graziotto R., d'Angelo A., del Prete D., Gambaro G. Heparin reduces glomerular infiltration and TGF-beta protein expression by macrophages in puromycin glomerulosclerosis. *J. Nephrol.*, 2003, Vol. 16, no. 2, pp. 210-218.
19. Chen D. Heparin beyond anti-coagulation. *Curr. Res. Transl. Med.*, 2021, Vol. 69, no. 4, 103300. doi: 10.1016/j.retram.2021.103300.
20. Chen Y., Song Y., Du W., Gong L., Chang H., Zou Z. Tumor-associated macrophages: an accomplice in solid tumor progression. *J. Biomed. Sci.*, 2019, Vol. 26, no. 1, pp. 1-13.
21. Choi J.U., Chung S.W., Al-Hilal T.A., Alam F., Park J., Mahmud F., Jeong J.H., Kim S.Y., Byun Y. A heparin conjugate, LHbisD4, inhibits lymphangiogenesis and attenuates lymph node metastasis by blocking VEGF-C signaling pathway. *Biomaterials*, 2017, Vol. 139, pp. 56-66.
22. Dehne N., Mora J., Namgaladze D., Weigert A., Brüne B. Cancer cell and macrophage cross-talk in the tumor microenvironment. *Curr. Opin. Pharmacol.*, 2017, Vol. 35, pp. 12-19.
23. Falanga A., Ay C., di Nisio M., Gerotziafas G., Langer F., Lecumberri R., Mandala M., Maraveyas A., Pabinger I., Sinn M., Syrigos K., Young A., Jordan K. Venous thromboembolism in cancer patients: ESMO Clinical Practice Guideline. *Ann. Oncol.*, 2023. doi: 10.1016/j.annonc.2022.12.014.
24. Ferro V., Liu L., Johnstone K.D., Wimmer N., Karoli T., Handley P., Rowley J., Dredge K., Li C. P., Hammond E., Davis K., Sarimaa L., Harenberg J., Bytheway I. Discovery of PG545: a highly potent and simultaneous inhibitor of angiogenesis, tumor growth, and metastasis. *J. Med. Chem*, 2012, Vol. 55, no. 8, pp. 3804-3813.
25. Fiedler E.C., Hemann M.T. Aiding and abetting: how the tumor microenvironment protects cancer from chemotherapy. *Ann. Rev. Cancer Biol.*, 2019, Vol. 3, pp. 409-428.
26. Galli M., Chatterjee M., Grasso M., Specchia G., Magen H., Einsele H., Celeghini I., Barbieri P., Paoletti D., Pace S., Sanderson R.D., Rambaldi A., Nagler A. Phase I study of the heparanase inhibitor roneparstat: An innovative approach for multiple myeloma therapy. *Haematologica*, 2018, Vol. 103, no. 10, e469. doi: 10.3324/haematol.2017.182865.
27. Gomes A.M., Kozłowski E.O., Borsig L., Teixeira F.C., Vlodaysky I., Pavao M.S. Antitumor properties of a new non-anticoagulant heparin analog from the mollusk *Nodipecten nodosus*: Effect on P-selectin, heparanase, metastasis and cellular recruitment. *Glycobiology*, 2015, Vol. 25, no. 4, pp. 386-393.
28. Guo J., Yan Y., Yan Y., Guo Q., Zhang M., Zhang J., Goltzman D. Tumor-associated macrophages induce the expression of FOXQ1 to promote epithelial-mesenchymal transition and metastasis in gastric cancer cells. *Oncol. Rep.*, 2017, Vol. 38, no. 4, pp. 2003-2010.
29. Handel T.M., Johnson Z., Crown S.E., Lau E.K., Sweeney M., Proudfoot A.E. Regulation of protein function by glycosaminoglycans – as exemplified by chemokines. *Annu. Rev. Biochem*, 2005, Vol. 74, pp. 385-410.
30. Harvey J.R., Mellor P., Eldaly H., Lennard T.W., Kirby J.A., Ali S. Inhibition of CXCR4-mediated breast cancer metastasis: a potential role for heparinoids? *Clin. Cancer Res.*, 2007, Vol. 13, no. 5, pp. 1562-1570.
31. Häuselmann I., Borsig L. Altered tumor-cell glycosylation promotes metastasis. *Front. Oncol.*, 2014, Vol. 4, 28. doi: 10.3389/fonc.2014.00028.
32. He Y., Kozaki K., Karpanen T., Koshikawa K., Yla-Herttuala S., Takahashi T., Alitalo K. Suppression of tumor lymphangiogenesis and lymph node metastasis by blocking vascular endothelial growth factor receptor 3 signaling. *J. Natl Cancer Inst.*, 2002, Vol. 94, no. 11, pp. 819-825.
33. Hegde S., Leader A.M., Merad M. MDSC: Markers, development, states, and unaddressed complexity. *Immunity*, 2021, Vol. 54, no. 5, pp. 875-884.
34. Hostettler N., Naggi A., Torri G., Ishai-Michaeli R., Casu B., Vlodaysky I., Borsig L. P-selectin-and heparanase-dependent antimetastatic activity of non-anticoagulant heparins. *FASEB J.*, 2007, Vol. 21, no. 13, pp. 3562-3572.
35. Huang Z., Yin Y., Yao S., Hu Y., Feng Y., Li M., Bian Z., Zhang J., Qin Y., Qi X. The Immune-microenvironment Confers Chemoresistance of Colorectal Cancer through Macrophage-Derived IL6. *Clin. Cancer Res.*, 2017, Vol. 23, no. 23, pp. 7375-7387.
36. Iozzo R.V., Sanderson R.D. Proteoglycans in cancer biology, tumour microenvironment and angiogenesis. *J. Cell. Mol. Med.*, 2011, Vol. 15, no. 5, pp. 1013-1031.
37. Kannagi R., Izawa M., Koike T., Miyazaki K., Kimura N. Carbohydrate-mediated cell adhesion in cancer metastasis and angiogenesis. *Cancer Sci.*, 2004, Vol. 95, no. 5, pp. 377-384.
38. Kansas G.S. Selectins and their ligands: current concepts and controversies. *Blood*, 1996, Vol. 88, pp. 3259-3287.

39. Kashiwakura Y., Kojima H., Kanno Y., Hashiguchi M., Kobata T. Heparin affects the induction of regulatory T cells independent of anti-coagulant activity and suppresses allogeneic immune responses. *Clin. Exp. Immunol.*, 2020, Vol. 202, no. 1, pp. 119-135.
40. Kevane B., Egan K., Allen S., Kevane B., Egan K., Allen S., Maguire P., Neary E., Lennon Á., Áinle F.N. Endothelial barrier protective properties of low molecular weight heparin: A novel potential tool in the prevention of cancer metastasis? *Res. Pract. Thromb. Haemost.*, 2017, Vol. 1, no. 1, pp. 23-32.
41. Key N.S., Khorana A.A., Kuderer N.M., Bohlke K., Lee A.Y., Arcelus J.I., Wong S.L., Balaban E.P., Flowers C.R., Francis C.W., Gates L.E., Kakkar A.K., Levine M.N., Liebman H.A., Tempero M.A., Lyman G.H., Falanga A. Venous thromboembolism prophylaxis and treatment in patients with cancer: ASCO clinical practice guideline update. *J. Clin. Oncol.*, 2020, Vol. 38, no. 5, pp. 496-520.
42. Khorana A.A., Cohen A.T., Carrier M., Meyer G., Pabinger I., Kavan P., Wells P. Prevention of venous thromboembolism in ambulatory patients with cancer. *Esmo Open*, 2020, Vol. 5, no. 6, e000948. doi: 10.1136/esmoopen-2020-000948.
43. Koenig A., Norgard-Sumnicht K., Linhardt R., Varki A. Differential interactions of heparin and heparan sulfate glycosaminoglycans with the selectins. Implications for the use of unfractionated and low molecular weight heparins as therapeutic agents. *J. Clin. Invest.*, 1998, Vol. 101, no. 4, pp. 877-889.
44. Kovacovics T.J., Mims A., Salama M.E., Pantin J., Rao N., Kosak K.M., Ahorukomeye P., Glenn M.J., Deininger M.W.N., Boucher K.M., Bavisotto L.M., Gutierrez-Sanchez G., Kennedy T.P., Marcus S.G., Sham P.J. Combination of the low anticoagulant heparin CX-01 with chemotherapy for the treatment of acute myeloid leukemia. *Blood Adv.*, 2018, Vol. 2, no. 4, pp. 381-389.
45. Lambert A.W., Pattabiraman D.R., Weinberg R.A. Emerging biological principles of metastasis. *Cell*, 2017, Vol. 168, no. 4, pp. 670-691.
46. Laporte S., Liotier J., Bertoletti L., Kleber F.X., Pineo G.F., Chapelle C., Moulin N., Mismetti P. Individual patient data meta-analysis of enoxaparin vs. unfractionated heparin for venous thromboembolism prevention in medical patients. *J. Thromb. Haemost.*, 2011, Vol. 9, no. 3, pp. 464-472.
47. Läubli H., Stevenson J.L., Varki A., Varki N.M., Borsig L. L-selectin facilitation of metastasis involves temporal induction of Fut7-dependent ligands at sites of tumor cell arrest. *Cancer Res.*, 2006, Vol. 66, no. 3, pp. 1536-1542.
48. Lever R., Hoult J.R.S., Page C.P. The effects of heparin and related molecules upon the adhesion of human polymorphonuclear leucocytes to vascular endothelium in vitro. *Br. J. Pharmacol.*, 2000, Vol. 129, no. 3, pp. 533-540.
49. Levy-Adam F., Abboud-Jarrou G., Guerrini M., Beccati D., Vlodaysky I., Ilan N. Identification and characterization of heparin/heparan sulfate binding domains of the endoglycosidase heparanase. *J. Biol. Chem.*, 2005, Vol. 280, no. 21, pp. 20457-20466.
50. Ley K., Laudanna C., Cybulsky M.I., Nourshargh S. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat. Rev. Immunol.*, 2007, Vol. 7, no. 9, pp. 678-689.
51. Li L., Ling Y., Huang M., Yin T., Gou S.M., Zhan N.Y., Xiong J.X., Wu H.S., Yang Z.Y., Wang C.Y. Heparin inhibits the inflammatory response induced by LPS and HMGB1 by blocking the binding of HMGB1 to the surface of macrophages. *Cytokine*, 2015, Vol. 72, no. 1, pp. 36-42.
52. Li N. Platelets in cancer metastasis: To help the “villain” to do evil. *Int. J. Cancer*, 2016, Vol. 138, no. 9, pp. 2078-2087.
53. Liebsch A.G., Schillers H. Quantification of heparin’s antimetastatic effect by single-cell force spectroscopy. *J. Mol. Recognit.*, 2021, Vol. 34, no. 1, e2854. doi: 10.1002/jmr.2854.
54. Lin S.C., Wu C.P., Tseng T., Jhang Y., Lee S.C. Role of syndecan-1 and exogenous heparin in hepatoma sphere formation. *Biochem. Cell Biol.*, 2020, Vol. 98, no. 2, pp. 112-119.
55. Ling Y., Yang Z.Y., Yin T., Li L., Yuan W.W., Wu H.S., Wang C.Y. Heparin changes the conformation of high-mobility group protein 1 and decreases its affinity toward receptor for advanced glycation endproducts in vitro. *Int. immunopharmacol.*, 2011, Vol. 11, no. 2, pp. 187-193.
56. Litvinova L.S., Yurova K.A., Khaziakhmatova O.G., Khlusova M.Y., Malashchenko V.V., Shunkin E.O., Todosenko N.M., Norkin I.K., Ivanov P.A., Khlusov I.A. Osteogenic and angiogenic properties of heparin as a system for delivery of biomolecules for bone bioengineering: a brief critical review. *Biochemistry (Moscow), Supplement Series B: Biomedical Chemistry*, 2021, Vol. 15, no. 2, pp. 147-152.
57. Liu Z., Wang L., Dong Z., Pan J., Zhu H., Zhang Z., Ma X. Heparin inhibits lipopolysaccharide-induced inflammation via inducing caveolin-1 and activating the p38/mitogen-activated protein kinase pathway in murine peritoneal macrophages. *Mol. Med. Rep.*, 2015, Vol. 12, no. 3, pp. 3895-3901.
58. Loka R.S., Sletten E.T., Barash U., Vlodaysky I., Nguyen H.M. Specific inhibition of heparanase by a glycopolymer with well-defined sulfation pattern prevents breast cancer metastasis in mice. *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 2018, Vol. 11, no. 1, pp. 244-254.

59. Ma L., Qiao H., He C., Yang Q., Cheung C.H.A., Kanwar J.R., Sun X. Modulating the interaction of CXCR4 and CXCL12 by low-molecular-weight heparin inhibits hepatic metastasis of colon cancer. *Invest. New Drugs*, 2012, Vol. 30, pp. 508-517.
60. Ma S.N., Mao Z.X., Wu Y., Liang M.X., Wang D.D., Chen X., Chang P., Zhang W., Tang J.H. The anti-cancer properties of heparin and its derivatives: A review and prospect. *Cell Adh. Migr.*, 2020, Vol. 14, no. 1, pp. 118-128.
61. Mandalà M., Labianca R. Venous thromboembolism (VTE) in cancer patients. ESMO clinical recommendations for prevention and management. *Thromb. Res.*, 2010, Vol. 125, pp. S117-S119.
62. Martínez V.G., Rubio C., Martínez-Fernández M., Segovia C., López-Calderón F., Garín M. I., Teijeira A., Munera-Maravilla E., Varas A., Sacedón R., Guerrero F., Villacampa F., de la Rosa F., Castellano D., López-Collazo E., Paramio J.M., Vicente Á., Dueñas M. BMP4 induces M2 macrophage polarization and favors tumor progression in bladder. *Clin. Cancer Res.*, 2017, Vol. 23, no. 23, pp. 7388-7399.
63. Mege D., Aubert M., Lacroix R., Dignat-George F., Panicot-Dubois L., Dubois C. Involvement of platelets in cancers. *Semin. Thromb. Hemost.*, 2019, Vol. 45, no. 6, pp. 569-575.
64. Mellor P., Harvey J.R., Murphy K.J., Pye D., O'Boyle G., Lennard T.W.J., Kirby J.A. Ali S. Modulatory effects of heparin and short-length oligosaccharides of heparin on the metastasis and growth of LMD MDA-MB 231 breast cancer cells in vivo. *Br. J. Cancer*, 2007, Vol. 97, no. 6, pp. 761-768.
65. Menter D.G., Tucker S.C., Kopetz S., Sood A.K., Crissman J.D., Honn K.V. Platelets and cancer: a casual or causal relationship: revisited. *Cancer Metastasis Rev.*, 2014, Vol. 33, pp. 231-269.
66. Meyer G., Belmont L. Maladie veineuse thromboembolique et cancer. *Rev. Mal. Respir.*, 2011, Vol. 28, no. 4, pp. 443-452.
67. Micalizzi D.S., Haber D.A., Maheswaran S. Cancer metastasis through the prism of epithelial-to-mesenchymal transition in circulating tumor cells. *Mol. Oncol.*, 2017, Vol. 11, no. 7, pp. 770-780.
68. Motofei I.G. Biology of cancer; from cellular cancerogenesis to supracellular evolution of malignant phenotype. *Cancer Invest.*, 2018, Vol. 36, no. 5, pp. 309-317.
69. Mousa S.A., Mohamed S. Inhibition of endothelial cell tube formation by the low molecular weight heparin, tinzaparin, is mediated by tissue factor pathway inhibitor. *Thromb. Haemost.*, 2004, Vol. 92, no. 9, pp. 627-633.
70. Mousa S.A., Petersen L.J. Anti-cancer properties of low-molecular-weight heparin: preclinical evidence. *Thromb. Haemost.*, 2009, Vol. 102, no. 8, pp. 258-267.
71. Nahain A. A., Ignjatovic V., Monagle P., Tsanaktsidis J., Vamvounis G., Ferro V. Anticoagulant heparin mimetics via RAFT polymerization. *Biomacromolecules*, 2019, Vol. 21, no. 2, pp. 1009-1021.
72. Nguyen K.G., Gillam F.B., Hopkins J.J., Jayanthi S., Gundampati R.K., Su G., Bear J., Pilkington G. R., Jalah R., Felber B.K., Liu J., Thallapuram S.K., Zaharoff D.A. Molecular mechanisms of heparin-induced modulation of human interleukin 12 bioactivity. *J. Biol. Chem.*, 2019, Vol. 294, no. 12, pp. 4412-4424.
73. Norgard-Sumnicht K.E., Varki N.M., Varki A. Calcium-dependent heparin-like ligands for L-selectin in nonlymphoid endothelial cells. *Science*, 1993, Vol. 261, no. 5120, pp. 480-483.
74. Oduah E.I., Linhardt R.J., Sharfstein S.T. Heparin: past, present, and future. *Pharmaceuticals*, 2016, Vol. 9, no. 3, 38. doi: 10.3390/ph9030038.
75. Ostuni R., Kratochvill F., Murray P.J., Natoli G. Macrophages and cancer: from mechanisms to therapeutic implications. *Trends Immunol.*, 2015, Vol. 36, no. 4, pp. 229-239.
76. Park J., Kim J.Y., Hwang S.R., Mahmud F., Byun Y. Chemical conjugate of low molecular weight heparin and suramin fragment inhibits tumor growth possibly by blocking VEGF165. *Mol. Pharm.*, 2015, Vol. 12, no. 11, pp. 3935-3942.
77. Pei X., Long X., Zhang L., Ye Y., Guo J., Liu P., Rui Z., Ning J., Yu W., Feng W. Neurotensin/IL-8 pathway orchestrates local inflammatory response and tumor invasion by inducing M2 polarization of tumor-associated macrophages and epithelial-mesenchymal transition of hepatocellular carcinoma cells. *Oncoimmunology*, 2018, Vol. 7, no. 7, e1440166. doi: 10.1080/2162402x.2018.1440166.
78. Petrovich E., Feigelson S.W., Stoler-Barak L., Hatzav M., Solomon A., Bar-Shai A., Ilan N., Li J.P., Engelhardt B., Vlodavsky I., Alon R. Lung ICAM-1 and ICAM-2 support spontaneous intravascular effector lymphocyte entrapment but are not required for neutrophil entrapment or emigration inside endotoxin-inflamed lungs. *FASEB J.*, 2016, Vol. 30, no. 5, pp. 1767-1778.
79. Qi L.N., Xiang B.D., Wu F.X., Ye J.Z., Zhong J.H., Wang Y.Y., Chen Y.Y., Chen Z.S., Ma L., Chen J. Circulating tumor cells undergoing EMT provide a metric for diagnosis and prognosis of patients with hepatocellular carcinoma. *Cancer Res.*, 2018, Vol. 78, no. 16, pp. 4731-4744.
80. Qian B.Z., Pollard J.W. Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis. *Cell*, 2010, Vol. 141, no. 1, pp. 39-51.
81. Roberts N., Kloos B., Cassella M., Podgrabinska S., Persaud K., Wu Y., Pytowski B., Skobe M. Inhibition of VEGFR-3 activation with the antagonistic antibody more potently suppresses lymph node and distant metastases than inactivation of VEGFR-2. *Cancer Res.*, 2006, Vol. 66, no. 5, pp. 2650-2657.

82. Roeske E.R., Bruno V., Nedstrand E., Boij R., Strid C.P., Piccione E., Berg G., Svensson-Arvelund J., Jenmalm M.C., Rubér M., Ernerudh J. Author Correction: Low-molecular-weight-heparin increases Th1- and Th17-associated chemokine levels during pregnancy in women with unexplained recurrent pregnancy loss: a randomised controlled trial. *Sci.Rep.*, 2020, Vol. 10, 10600. doi: 10.1038/s41598-020-67807-8.
83. Schlesinger M. Role of platelets and platelet receptors in cancer metastasis. *J. Hematol. Oncol.*, 2018, Vol. 11, no. 1, pp. 1-15.
84. Schlesinger M., Schmitz P., Zeisig R., Naggi A., Torri G., Casu B., Bendas G. The inhibition of the integrin VLA-4 in MV3 melanoma cell binding by non-anticoagulant heparin derivatives. *Thromb. Res.*, 2012, Vol. 129, no. 5, pp. 603-610.
85. Schlesinger M., Simonis D., Schmitz P., Fritzsche J., Bendas G. Binding between heparin and the integrin VLA-4. *Thromb. Haemost.*, 2009, Vol. 102, no. 11, pp. 816-822.
86. Seyrek E., Dubin P. Glycosaminoglycans as polyelectrolytes. *Adv. Colloid Interface Sci.*, 2010, Vol. 158, no. 1-2, pp. 119-129.
87. Shatz M., Liscovitch M. Caveolin-1: a tumor-promoting role in human cancer. *Int. J. Radiat. Biol.*, 2008, Vol. 84, no. 3, pp. 177-189.
88. Shirure V.S., Liu T., Delgado L.F., Cuckler C.M., Tees D.F., Benencia F., Goetz D.J., Burdick M.M. CD44 variant isoforms expressed by breast cancer cells are functional E-selectin ligands under flow conditions. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, 2015, Vol. 308, no. 1, pp. C68-C78.
89. Siegel R.L., Miller K.D., Jemal A. Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis. *CA Cancer J. Clin.*, 2015, Vol. 65, no. 1, pp. 5-29.
90. Simka M. Anti-metastatic activity of heparin is probably associated with modulation of SDF-1-CXCR4 axis. *Med. Hypotheses*, 2007, Vol. 69, no. 3, 709. doi: 10.1016/j.mehy.2007.01.008.
91. Skuratovskaia D., Vulf M., Khaziakhmatova O., Malashchenko V., Komar A., Shunkin E., Shupletsova V., Goncharov A., Urazova O., Litvinova L. Tissue-specific role of macrophages in noninfectious inflammatory disorders. *Biomedicines*, 2020, Vol. 8, no. 10, 400. doi: 10.3390/biomedicines8100400.
92. Smith S.A., Morrissey J.H. Heparin is procoagulant in the absence of antithrombin. *Thromb. Haemost.*, 2008, Vol. 100, no. 7, pp. 160-162.
93. Stacker S.A., Achen M.G., Jussila L., Baldwin M.E., Alitalo K. Lymphangiogenesis and cancer metastasis. *Nat. Rev. Cancer*, 2002, Vol. 2, no. 8, pp. 573-583.
94. Stevenson J.L., Choi S.H., Varki A. Differential metastasis inhibition by clinically relevant levels of heparins – correlation with selectin inhibition, not antithrombotic activity. *Clin. Cancer Res.*, 2005, Vol. 11, no. 19, pp. 7003-7011.
95. Stoler-Barak L., Petrovich E., Aychek T., Gurevich I., Tal O., Hatzav M., Ilan N., Feigelson S.W., Shakhar G., Vlodavsky I., Alon R. Heparanase of murine effector lymphocytes and neutrophils is not required for their diapedesis into sites of inflammation. *FASEB J.*, 2015, Vol. 29, no. 5, pp. 2010-2021.
96. Sudha T., Phillips P., Kanaan C., Linhardt R.J., Borsig L., Mousa S.A. Inhibitory effect of non-anticoagulant heparin (S-NACH) on pancreatic cancer cell adhesion and metastasis in human umbilical cord vessel segment and in mouse model. *Clin. Exp. Metastasis*, 2012, Vol. 29, pp. 431-439.
97. Tammela T., Alitalo K. Lymphangiogenesis: molecular mechanisms and future promise. *Cell*, 2010, Vol. 140, no. 4, pp. 460-476.
98. Teicher B.A., Fricker S.P. CXCL12 (SDF-1)/CXCR4 pathway in cancer. *Clin. Cancer Res.*, 2010, Vol. 16, no. 11, pp. 2927-2931.
99. Valastyan S., Weinberg R.A. Tumor metastasis: molecular insights and evolving paradigms. *Cell*, 2011, Vol. 147, no. 2, pp. 275-292.
100. Varki A. Selectin ligands: will the real ones please stand up? *J. Clin. Invest.*, 1997, Vol. 99, no. 2, pp. 158-162.
101. Varki A., Varki N.M. P-selectin, carcinoma metastasis and heparin: novel mechanistic connections with therapeutic implications. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 2001, Vol. 34, pp. 711-717.
102. Vogel S., Bodenstein R., Chen Q., Feil S., Feil R., Rheinlaender J., Schäffer T.E., Bohn E., Frick J.S., Borst O., Münzer P., Walker B., Markel J., Csanyi G., Pagano P.J., Loughran P., Jessup M.E., Watkins S.C., Bullock G.C., Sperry J.L., Zuckerbraun B.S., Billiar T.R., Lotze M.T., Gawaz M., Neal M.D. Platelet-derived HMGB1 is a critical mediator of thrombosis. *J. Clin. Invest.*, 2015, Vol. 125, no. 12, pp. 4638-4654.
103. Walenga J.M., Lyman G.H. Evolution of heparin anticoagulants to ultra-low-molecular-weight heparins: a review of pharmacologic and clinical differences and applications in patients with cancer. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, 2013, Vol. 88, no. 1, pp. 1-18.
104. Wang X., Luo G., Zhang K., Cao J., Huang C., Jiang T., Liu B., Su L., Qiu Z. Hypoxic tumor-derived exosomal miR-301a mediates M2 macrophage polarization via PTEN/PI3Kγ to promote pancreatic cancer Metastasis. *Cancer Res.*, 2018, Vol. 78, no. 16, pp. 4586-4598.

105. Wang S., Zhao X., Wu S., Cui D., Xu Z. Myeloid-derived suppressor cells: key immunosuppressive regulators and therapeutic targets in hematological malignancies. *Biomark. Res.*, 2023, Vol. 11, no. 1, pp. 1-20.
106. Wei C., Yang C., Wang S., Shi D., Zhang C., Lin X., Liu Q., Dou R., Xiong B. Crosstalk between cancer cells and tumor associated macrophages is required for mesenchymal circulating tumor cell-mediated colorectal cancer metastasis. *Mol. Cancer*, 2019, Vol. 18, no. 1, pp. 1-23.
107. Weissmann M., Bhattacharya U., Feld S., Hammond E., Ilan N., Vlodaysky I. The heparanase inhibitor PG545 is a potent anti-lymphoma drug: Mode of action. *Matrix Biol.*, 2019, Vol. 77, pp. 58-72.
108. Wong T.H., Dickson F.H., Timmins L.R., Nabi I.R. Tyrosine phosphorylation of tumor cell caveolin-1: impact on cancer progression. *Cancer Metastasis Rev.*, 2020, Vol. 39, pp. 455-469.
109. Wu W., Lin L., Yao H., Su F., Su S., Liu Q., Chen J., Chen J., Chen F., He C. A positive feedback loop between mesenchymal-like cancer cells and macrophages is essential to breast cancer metastasis. *Cancer Cell*, 2014, Vol. 25, no. 5, pp. 605-620.
110. Xu X.R., Carrim N., Neves M.A.D., McKeown T., Stratton T.W., Coelho R.M.P., Lei X., Chen P., Xu J., Dai X., Li B.X., Ni H. Platelets and platelet adhesion molecules: novel mechanisms of thrombosis and anti-thrombotic therapies. *Thromb. J.*, 2016, Vol. 14, pp. 37-46.
111. Yahya E.B., Alqadhi A.M. Recent trends in cancer therapy: A review on the current state of gene delivery. *Life Sci.*, 2021, Vol. 269, 119087. doi: 10.1016/j.lfs.2021.119087.
112. Yanguas A., Garasa S., Teijeira Á., Aubá C., Melero I., Rouzaut A. ICAM-1-LFA-1 dependent CD8⁺ T-lymphocyte aggregation in tumor tissue prevents recirculation to draining lymph nodes. *Front. Immunol.*, 2018, Vol. 9, 2084. doi: 10.3389/fimmu.2018.02084.
113. Yin W., Zhang J., Jiang Y., Juan S. Combination therapy with low molecular weight heparin and Adriamycin results in decreased breast cancer cell metastasis in C3H mice. *Exp. Ther. Med.*, 2014, Vol. 8, no. 4, pp. 1213-1218.
114. Zhang C., Liu Y., Gao Y., Shen J., Zheng S., Wei M., Zeng X. Modified heparins inhibit integrin α IIb β 3 mediated adhesion of melanoma cells to platelets in vitro and in vivo. *Int. J. Cancer*, 2009, Vol. 125, no. 9, pp. 2058-2065.
115. Zhong G.X., Gong Y., Yu C.J., Wu S.F., Ma Q.P., Wang Y., Ren J., Zhang X.C., Yang W.H., Zhu W. Significantly inhibitory effects of low molecular weight heparin (Fraxiparine) on the motility of lung cancer cells and its related mechanism. *Tumor Biol.*, 2015, Vol. 36, pp. 4689-4697.
116. Zhou H., Roy S., Cochran E., Zouaoui R., Chu C.L., Duffner J., Zhao G., Smith S., Galcheva-Gargova Z., Karlgren J., Dussault N., Kwan R.Y., Moy E., Barnes M., Long A., Honan C., Qi Y.W., Shriver Z., Ganguly T., Schultes B., Venkataraman G., Kishimoto T.K. M402, a novel heparan sulfate mimetic, targets multiple pathways implicated in tumor progression and metastasis. *PLoS One*, 2011, Vol. 6, no. 6, e21106. doi: 10.1371/journal.pone.0021106.

Авторы:

Малашенко В.В. — к.б.н., научный сотрудник
Центра иммунологии и клеточных биотехнологий,
Научно-технологический парк «Фабрика», ФГАОУ ВО
«Балтийский федеральный университет имени
Иммануила Канта», г. Калининград, Россия

Хлусов И.А. — д.м.н., старший научный сотрудник
Центра иммунологии и клеточных биотехнологий,
Научно-технологический парк «Фабрика», ФГАОУ ВО
«Балтийский федеральный университет имени
Иммануила Канта», г. Калининград; профессор кафедры
морфологии и общей патологии ФГБОУ ВО «Сибирский
государственный медицинский университет»
Министерства здравоохранения РФ, г. Томск, Россия

Authors:

Malashchenko V.V., PhD (Biology), Research Associate,
Center for Immunology and Cellular Biotechnology, Science
and Technology Park "Fabrica", Immanuel Kant Baltic
Federal University, Kaliningrad, Russian Federation

Khlyusov I.A., PhD, MD (Medicine), Senior Research
Associate, Center for Immunology and Cellular Biotechnology,
Science and Technology Park "Fabrica", Immanuel Kant
Baltic Federal University, Kaliningrad; Professor, Department
of Morphology and General Pathology, Siberian State Medical
University, Tomsk, Russian Federation

Юрова К.А. — к.м.н., научный сотрудник Центра иммунологии и клеточных биотехнологий, Научно-технологический парк «Фабрика», ФГАОУ ВО «Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта», г. Калининград, Россия

Хазиахматова О.Г. — к.б.н., научный сотрудник Центра иммунологии и клеточных биотехнологий, Научно-технологический парк «Фабрика», ФГАОУ ВО «Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта», г. Калининград, Россия

Тодосенко Н.М. — к.б.н., старший научный сотрудник Центра иммунологии и клеточных биотехнологий, Научно-технологический парк «Фабрика», ФГАОУ ВО «Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта», г. Калининград, Россия

Литвинова Л.С. — д.м.н., директор Центра иммунологии и клеточных биотехнологий Научно-технологический парк «Фабрика», ФГАОУ ВО «Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта», г. Калининград; научный сотрудник ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Томск, Россия

Yurova K.A., PhD (Medicine), Research Associate, Center for Immunology and Cellular Biotechnology, Science and Technology Park "Fabrica", Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russian Federation

Khaziakhmatova O.G., PhD (Biology), Research Associate, Center for Immunology and Cellular Biotechnology, Science and Technology Park "Fabrica", Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russian Federation

Todosenko N.M., PhD (Biology), Senior Research Associate, Center for Immunology and Cellular Biotechnology, Science and Technology Park "Fabrica", Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russian Federation

Litvinova L.S., PhD, MD (Medicine), Director, Center for Immunology and Cellular Biotechnology, Science and Technology Park "Fabrica", Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad; Research Associate, Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation

Поступила 05.02.2023

Отправлена на доработку 02.05.2023

Принята к печати 07.05.2023

Received 05.02.2023

Revision received 02.05.2023

Accepted 07.05.2023

ФЕНОТИПИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ДЕНДРИТНЫХ КЛЕТОК ПРИ РАЗЛИЧНЫХ ВАРИАНТАХ СТИМУЛЯЦИИ СОЗРЕВАНИЯ

Фадеев Ф.А., Александрова А.Д., Могиленских А.С.

ГАУЗ СО «Институт медицинских клеточных технологий», г. Екатеринбург, Россия

Резюме. Дендритные клетки, полученные из моноцитов периферической крови, могут использоваться для клеточной иммунотерапии онкологических заболеваний. Чаще всего для иммунотерапии используют зрелые ДК, сенсibilизированные опухолеассоциированными антигенами. Функциональная активность ДК при иммунотерапии во многом определяется их иммунофенотипом и секреторным профилем, формирующимся после созревания. Целью данной работы являлась оценка фенотипических свойств ДК при стимуляции созревания различными способами.

Стимуляция созревания ДК осуществлялась с использованием провоспалительных цитокинов и их смесей, а также лигандов дендритноклеточных TLRs. Для стимуляции были использованы: TNF, poly I:C, LPS, цитокиновый коктейль (TNF + IL-1 + IL-6 + PGE2), коктейль в смеси с poly I:C, а также лизат клеток меланомы. Через 48 часов после стимуляции созревания оценивали уровень экспрессии ДК-рецепторов, принимающих участие во взаимодействии с Т-лимфоцитами, используя метод проточной цитофлуориметрии. Также оценивали секрецию клетками IL-12 (активатора Т-клеточного иммунного ответа) и IL-10 (ингибитора Т-клеточного иммунного ответа) с помощью ИФА.

Нами было показано, что ДК, полученные после стимуляции цитокиновым коктейлем, демонстрируют наиболее высокий уровень экспрессии рецепторов, необходимых для взаимодействия с Т-лимфоцитами и активации клеточного звена иммунитета: антигенпрезентирующих (HLA-DR), костимулирующих (CD83, CD40, CD86) и рецепторов, контролирующих миграцию ДК в лимфоузлы (CCR7). Кроме того, стимулированные с помощью коктейля ДК активно секретируют как IL-12, так и IL-10. Эффект от применения TNF и poly I:C был умеренным: экспрессия большинства рецепторов была существенно ниже, чем при использовании коктейля; достоверных отличий от контроля (без стимуляции созревания) по уровню секреции IL-12 выявлено не было. LPS и лизат клеток меланомы практически не оказали влияния как на иммунофенотип, так и на секреторный профиль ДК. Добавление к цитокиновому коктейлю poly I:C практически не оказало влияния на рецепторный пейзаж ДК, но привело к значительному увеличению секреции как провоспалительного IL-12, так и противовоспалительного IL-10.

Полученный результат позволяет предварительно рассматривать смесь цитокинового коктейля с poly I:C как наиболее эффективное средство для стимуляции созревания ДК. В то же время требуются

Адрес для переписки:

Фадеев Федор Алексеевич
ГАУЗ СО «Институт медицинских клеточных технологий»
620026, Россия, г. Екатеринбург,
ул. Карла Маркса, 22а.
Тел.: 8 (912) 618-24-97.
Факс: 8 (343) 355-62-40.
E-mail: fdf79@mail.ru

Address for correspondence:

Fedor A. Fadeyev
Institute of Medical Cell Technologies
22a Carl Marx St
Ekaterinburg
620026 Russian Federation
Phone: +7 (912) 618-24-97.
Fax: +7 (343) 355-62-40.
E-mail: fdf79@mail.ru

Образец цитирования:

Ф.А. Фадеев, А.Д. Александрова, А.С. Могиленских
«Фенотипические свойства дендритных клеток
при различных вариантах стимуляции созревания»
// Медицинская иммунология, 2024. Т. 26, № 2.
С. 253–262. doi: 10.15789/1563-0625-PFO-2875
© Фадеев Ф.А. и соавт., 2024
Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

F.A. Fadeyev, A.D. Aleksandrova, A.S. Mogilenskikh
“Phenotypic features of dendritic cells when using different
modes of their stimulated maturation”, *Medical Immunology
(Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2024, Vol. 26, no. 2,
pp. 253–262.
doi: 10.15789/1563-0625-PFO-2875
© Fadeyev F.A. et al., 2024
The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License
DOI: 10.15789/1563-0625-PFO-2875

дальнейшие эксперименты по сравнению функциональной активности ДК, полученных с использованием разных способов стимуляции созревания.

Ключевые слова: дендритные клетки моноцитарного происхождения, стимуляция созревания, рецепторы, цитокины, иммунофенотипирование, секреторный профиль

PHENOTYPIC FEATURES OF DENDRITIC CELLS WHEN USING DIFFERENT MODES OF THEIR STIMULATED MATURATION

Fadeyev F.A., Aleksandrova A.D., Mogilenskikh A.S.

Institute of Medical Cell Technologies, Ekaterinburg, Russian Federation

Abstract. Monocyte-derived dendritic cells (DCs) can be used for cell immunotherapy of cancer. In most cases, mature DCs, loaded with tumor-associated antigens, are used for immune therapy. The functionality of DCs for immunotherapy substantially depends on their immunophenotype and secretory profile, which are established after DCs maturation. The purpose of this research was to explore the phenotype of DCs after using various approaches for stimulation of their maturation.

Maturation of DCs was stimulated by pro-inflammatory cytokines and their mixtures, or by ligands to the TLRs of DCs. DCs were stimulated by the following means: TNF; poly I:C; LPS; cytokine cocktail (TNF + IL-1 + IL-6 + PGE2); the cocktail mixed with poly I:C; and melanoma cells lysate. Forty-eight hours after stimulation, the expression of DCs' receptors involved into their interaction with T cells, was evaluated by flow cytometry. Moreover, the secretion of IL-12 (activator of T cell response) and IL-10 (inhibitor of T cell response) was estimated by ELISA technique.

We have shown that, following stimulation with cytokine cocktail, the DCs exhibit highest expression of receptors, which are necessary for interaction with T cells and for activation of T cell mediated immune response, i.e., antigen-presenting receptors (HLA-DR), co-stimulatory receptors (CD83, CD40, CD86), and receptors controlling the migration of DCs to lymph nodes (CCR7). Moreover, the cocktail-stimulated DCs intensively secrete both IL-12 and IL-10. The stimulatory effect of TNF and poly I:C proved to be moderate: the expression of most receptors was significantly lower than after using the cocktail; no significant differences from control (in absence of induced maturation) in IL-12 secretion were detected. LPS and melanoma cell lysate did not affect both expression of receptors and secretory profile of DCs. Addition of poly I:C to the cytokine cocktail did not affect the receptor expression, but significantly increased the secretion of both pro-inflammatory IL-12 and anti-inflammatory IL-10.

The results of experiments demonstrate that the mixture of cytokine cocktail and poly I:C seems to be the most effective tool for stimulation of DCs maturation. However, further experiments are required to compare the functionality of DCs when using different tools for induced DC maturation.

Keywords: dendritic cells of monocytic origin, induced maturation, receptors, cytokines, immunophenotyping, secretion profile

Введение

Одним из современных направлений в терапии онкологических заболеваний является иммунотерапия. Данное направление предполагает искусственную стимуляцию иммунных механизмов защиты против опухолевых клеток и включает в себя, в частности, клеточную терапию с использованием клеток, участвующих в развитии противоопухолевого иммунного ответа.

Ключевую роль в инициации и развитии адаптивного противоопухолевого иммунного ответа играют дендритные клетки (ДК). Эти клетки выполняют функцию антигенпрезентирующих клеток, которые представляют эпитопы опухолеассоциированных антигенов Т-лимфоцитам и иницируют их дальнейшую пролиферацию и дифференцировку. Кроме того, ДК во многом

определяют направление дифференцировки наивных Т-лимфоцитов.

В то же время ДК сами по себе не обладают наборами рецепторов, способными напрямую распознавать опухолеассоциированные антигены, что в значительной мере затрудняет инициацию Т-зависимого противоопухолевого иммунного ответа. Помимо этого, сами опухолевые клетки обладают иммуносупрессивной активностью, вследствие чего противоопухолевая активность иммунной системы остается зачастую недостаточной для предотвращения дальнейшего их роста [6].

Способность дендритных клеток иницировать иммунный ответ и презентировать антигены Т-клеткам позволяет рассматривать их в качестве перспективного средства для терапии онкологических заболеваний посредством акти-

вазии Т-звена иммунитета, хотя их медицинское применение носит пока, в основном, характер клинических испытаний. Дендритноклеточные вакцины использовали для лечения меланомы [3, 16], глиобластомы [13], рака предстательной железы [29], молочной железы [1, 20].

В большинстве случаев в терапевтических целях используют полученные *in vitro* аутогенные дендритные клетки. Эти клетки сенсибилизируются опухлеассоциированными антигенами и, кроме того, подвергаются дополнительному воздействию для стимуляции созревания. В ходе созревания ДК приобретают способность к презентации антигенов и к активации Т-клеток. Полученные зрелые ДК после введения пациенту должны мигрировать в лимфоузлы, презентовать наивным CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоцитам эпитопы опухлеассоциированных антигенов и стимулировать их пролиферацию и дифференцировку в обладающие противоопухолевой активностью Т-хелперы-1 и цитотоксические Т-лимфоциты соответственно [7, 25]. В то же время клинические испытания демонстрируют, как правило, ограниченную эффективность дендритноклеточной терапии [17, 32]. Причинами низкой эффективности ДК вакцин могут являться как иммуносупрессорный эффект опухолевых клеток и снижение уровня экспрессии ими опухлеассоциированных антигенов, так и ограниченная функциональная активность самих введенных пациенту дендритных клеток и, в частности, низкий уровень их миграции в периферические лимфоузлы для последующего контакта с Т-клетками [30].

Очевидным способом повышения функциональной активности ДК может являться подбор способа стимуляции их созревания, обеспечивающий максимальный уровень экспрессии рецепторов, участвующих во взаимодействии с Т-клетками, а также секреции ДК цитокинов, влияющих на дифференцировку Т-лимфоцитов.

В данной работе нами было проанализировано влияние состава смесей, применяемых для стимуляции созревания ДК, на экспрессию ими антигенпрезентирующих и костимулирующих рецепторов, а также на их секреторную активность. В качестве факторов стимуляции созревания ДК эти смеси содержали провоспалительные цитокины и лиганды для паттерн-распознающих рецепторов (PRR).

Материалы и методы

Получение незрелых дендритных клеток

В работе использовали периферическую кровь здоровых доноров в возрасте 23-43 лет после получения от них информированного согласия. ДК получали из моноцитов крови путем их цитокиновой стимуляции, согласно модифицированной

методике [2]. Взятую из вены периферическую кровь в объеме 70 мл смешивали с равным объемом раствора Дюльбекко (DPBS) без кальция и магния. Из полученной смеси выделяли фракцию мононуклеарных клеток с помощью раствора для сепарации клеток Lympholyte-H (Cedarlane, Канада). Кровь смешанную с DPBS, наслаивали на раствор для сепарации клеток и центрифугировали при 800 g в течение 20 мин., после чего на границе раздела фаз собирали кольцо из мононуклеарных клеток. Собранную мононуклеарную фракцию отмывали дважды раствором Эрла, ресуспендировали в 30 мл среды RPMI-1640 («ПанЭко», Россия) и переносили в культуральный флакон T175 (Nunc, Дания). Флакон инкубировали в течение 2 часов в CO₂-инкубаторе. В течение этого времени происходила адгезия моноцитов на пластике флакона. По завершении инкубации флакон отмывали от неадгезировавшихся клеток (преимущественно лимфоцитов); адгезировавшиеся на пластике моноциты оставались во флаконе.

После отмывки во флакон с моноцитами вносили ростовую среду с AIM-V (Gibco, Thermo Fisher Scientific, США) с добавлением цитокинов: гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (GM-CSF, 72 нг/мл) и интерлейкина-4 (IL-4, 30 нг/мл) (SCI-STORE, Россия) для стимуляции дифференцировки клеток. Клетки культивировали в CO₂-инкубаторе (37 °C, 5% CO₂) на протяжении 6 суток. На 2-е и 4-е сутки в среду дополнительно вносили цитокины в тех же концентрациях.

Стимуляция созревания ДК

Из флакона с полученными незрелыми ДК удаляли ростовую среду. Клетки инкубировали в течение 15 мин. в TrypLE (Thermo Fisher Scientific, США), после чего дополнительно снимали неоткрепившиеся клетки скребком. ДК отмывали от остатков TrypLE, ресуспендировали в свежей ростовой среде того же состава и рассевали их в лунки 12-луночных планшетов (Eppendorf, Германия) с плотностью посева 200 тыс. клеток/см². После этого в лунки планшетов вносили смеси для созревания ДК следующего состава:

- фактор некроза опухоли α (TNFα, итоговая концентрация в среде 20 нг/мл) (ProSpec, Израиль);
- полиинозиновая/полицитидиловая кислота (poly I:C, 25 мкг/мл) (InvivoGen, США);
- липополисахарид (LPS, 1 мкг/мл) (Thermo Fisher Scientific, США);
- «коктейль» из TNFα (20 нг/мл) + IL-1 (10 нг/мл) (ProSpec, Израиль) + IL-6 (20 нг/мл) (SCI-STORE, Россия) + простагландин E2 (PGE2, 1 мкг/мл) (Santa Cruz Biotechnology, США);
- «коктейль», смешанный с poly I:C (концентрации компонентов – те же);
- лизат опухолевых клеток (из расчета 1 лизированная опухолевая клетка на 1 ДК).

Планшеты с ДК со смесями для стимуляции созревания инкубировали в CO₂-инкубаторе в течение 48 часов. По завершении инкубации ростовую среду с неадгезированными клетками переносили в пробирки и центрифугировали при 1200 об/мин в течение 10 мин., после чего надосадочную жидкость переносили в отдельные пробирки и замораживали для ИФА. Параллельно адгезированные на дне лунок планшета ДК инкубировали с TrypLE в течение 15 мин., после чего клетки снимали пластика с помощью скребка и переносили их в пробирки с неадгезированными клетками из тех же лунок. Экспрессию рецепторов полученными ДК определяли методом проточной цитофлуориметрии.

Подсчет количества клеток осуществляли с использованием счетчика клеток TC20 (Bio-Rad, США).

Получение лизата опухолевых клеток

Для получения лизата опухолевых клеток использовали линию клеток меланомы кожи SK-mel-2. Клетки выращивали в среде DMEM + F-12 («ПанЭко», Россия) с добавлением 10%-ной фетальной телячьей сыворотки (FBS) (Biosera, Франция). После формирования 80%-ного монослоя клетки снимали с пластика раствором 0,25%-ным раствором трипсина с ЭДТА («ПанЭко», Россия), фермент подвергали нейтрализации раствором Эрла с 10% FBS. Клетки в суспензии осаждали центрифугированием и, после удаления надосадочной жидкости, лизировали их 5-кратным замораживанием в жидком азоте — оттаиванием.

Проточная цитофлуориметрия

Клетки отмывали фосфатным буфером (PBS) от остатков среды и окрашивали их красителем Zombie Aqua (BioLegend, США) для дифференцировки живых и мертвых клеток. После отмывки от красителя к клеткам добавляли антитела с флуоресцентными метками к соответствующим

рецепторам. Все операции выполняли в соответствии с инструкциями производителей. В работе использовали антитела анти-CD86-PC5.5, анти-CD40-PC7, анти-CD14-APC, анти-CD11c-APC-Cy7, анти-HLA-DR-PB, анти-CCR7-PE, анти-CD83-PC5.5, анти-CD1a-PC7 (все антитела производства BioLegend). Цитофлуориметрию проводили на проточном цитофлуориметре Navios 10 (Beckman Coulter, США).

Иммуноферментный анализ (ИФА)

Концентрацию цитокинов (IL-12 и IL-10) в супернатанте оценивали методом ИФА с использованием тест-систем ELISA MAXTM Deluxe Set Human IL-12 (p70) (кат. номер 431704, BioLegend, США) и Интерлейкин-10-ИФА-БЕСТ (кат. номер А-8774, АО «Вектор-Бест», Россия) в соответствии с инструкциями производителей.

Статистика

Все эксперименты выполнены в 4 повторах, по 3-4 технических дубля для каждого повтора. Для всех повторов использовали МНК, полученные от разных доноров. Для оценки достоверности различий при проведении множественных сравнений с контрольной группой применяли критерий Данетта, для проведения парных множественных сравнений — односторонний тест ANOVA. Для проверки нормальности распределения использовали критерий Колмогорова—Смирнова. Уровнем статистической достоверности различий считали $p < 0,05$.

Результаты

Для получения ДК использовали моноциты, выделенные из крови 4 доноров. После 6 суток дифференцировки в среде с GM-CSF и IL-4 клетки приобретали характерную для незрелых ДК отростчатую форму, оставаясь при этом, большей частью, адгезированными на пластике (рис. 1А). При этом отмечалось практически полное пре-

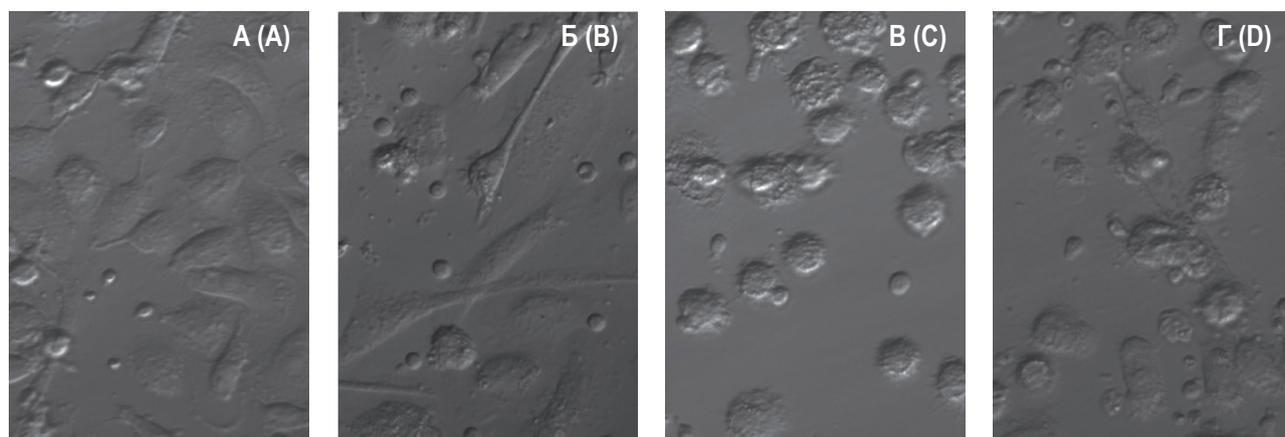


Рисунок 1. Дендритные клетки после стимуляции созревания (репрезентативные изображения)

Примечание. А – контроль без стимуляции. Б – TNF. В – коктейль. Г – poly I:C. Световая микроскопия, увеличение 400х.

Figure 1. Dendritic cells after stimulation of maturation (representative images)

Note. A, control without stimulation. B, TNF. C, cocktail. D, poly I:C. Light microscopy, magnification 400x.

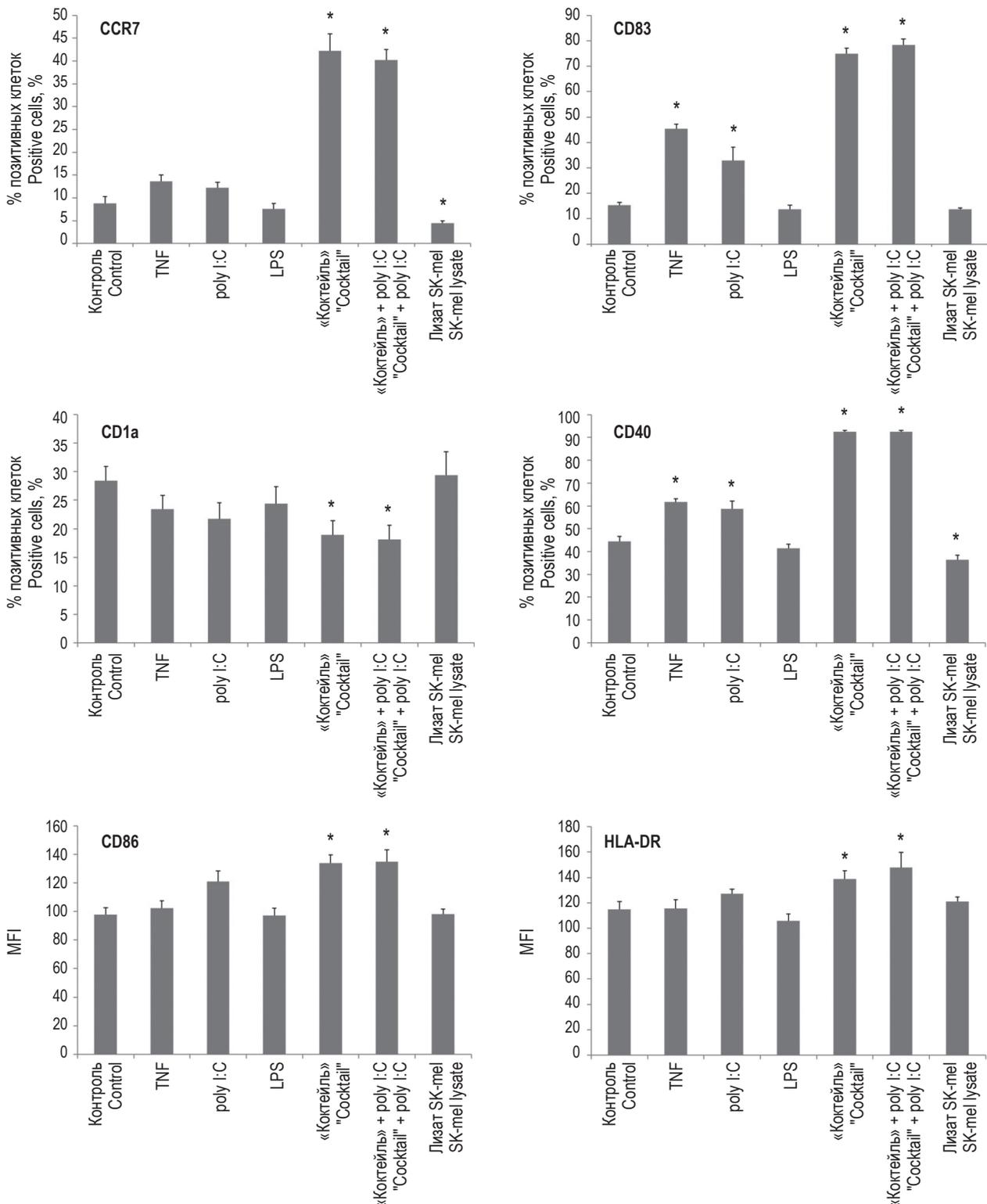


Рисунок 3. Экспрессия ДК рецепторов CCR7, CD83, CD1a, CD40, CD86, HLA-DR после стимуляции созревания
Примечание. Для CD86 и HLA-DR на гистограммах отображены значения MFI, для остальных – процент экспрессирующих рецептор клеток. Данные представлены в виде $X \pm m$, где X – среднее значение, m – стандартная ошибка среднего. Статистически достоверные отличия от контроля отмечены звездочками.

Figure 3. Expression of CCR7, CD83, CD1a, CD40, CD86, HLA-DR receptors by DCs after stimulation of maturation

Note. On CD86 and HLA-DR bar graphs the MFI was shown, on other graphs the percentage of receptor-expressing cells was demonstrated. The data were presented in the form $X \pm m$, where m was the standard error of the arithmetic average X . Statistically significant differences from control are signified by asterisks.

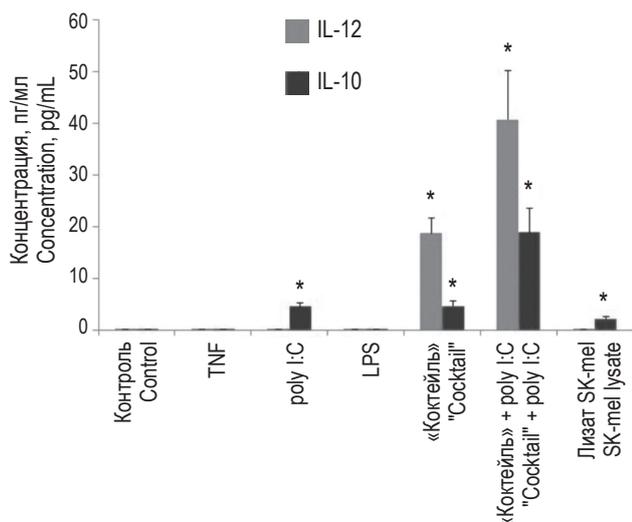


Рисунок 4. Секретия IL-12 (светлые столбцы) и IL-10 (темные столбцы) дендритными клетками

Примечание. Статистически достоверные отличия от контроля отмечены звездочками.

Figure 4. Secretion of IL-12 (light bars) and IL-10 (dark bars) by dendritic cells

Note. Statistically significant differences from control are signified by asterisks.

крашение экспрессии клетками рецептора CD14 (практически до фонового уровня) в сочетании с очень значительным повышением экспрессии CD11c.

Полученные в результате дифференцировки моноцитов незрелые ДК подвергали воздействию различных смесей для стимуляции созревания. После двух суток инкубации оценивали иммунофенотип полученных клеток, а также уровень секреции ими IL-12 и IL-10. Использование всех смесей для созревания сопровождалось характерными для зрелых клеток изменениями морфологии: увеличением числа псевдоподий и откреплением большей части клеточной популяции от пластика [10, 15], хотя, в целом, при использовании коктейля доля открепившихся была визуально выше, чем при использовании других факторов дифференцировки (рис. 1Б, В, Г).

Имунофенотип полученных ДК анализировали методом проточной цитофлуориметрии. Гейтирование ДК проводили по схеме, представленной на рисунке 2 (см. 3-ю стр. обложки). ДК идентифицировали как CD11c⁺ клетки, оставшиеся после предварительного гейтирования по параметрам прямого и бокового светорассеяния и исключения нежизнеспособных клеток и дуплетов. Выделенные в результате гейтирования клетки имели высокий уровень экспрессии характерных для ДК рецепторов CD86, CD40 и HLA-DR [5, 22], при этом доля клеток с CD14⁺ иммунофенотипом во всех случаях составила менее 1% анализируемой популяции.

Результаты оценки иммунофенотипа полученных ДК представлены на рисунке 3. Уровень экспрессии HLA-DR и CD86 оценивали в единицах флуоресценции (MFI), так как эти рецепторы присутствовали на поверхности > 90% клеток при всех способах стимуляции созревания (включая контроль). По остальным рецепторам представлена доля экспрессирующих их клеток. Наиболее высокие уровни экспрессии рецепторов, в целом, отмечены при использовании коктейля, а также коктейля в смеси с poly I:C. В то же время при использовании LPS или лизата не наблюдается достоверного увеличения этих показателей по сравнению с клетками без стимуляции.

Данные о секреции ДК IL-12 и IL-10 по результатам ИФА представлены на рисунке 4. Секреция IL-12 превышает фоновый уровень лишь при использовании цитокинового коктейля (в том числе с poly I:C). При этом наибольшая концентрация IL-10 также отмечалась в средах, где использовался коктейль.

Обсуждение

Для проведения дендритноклеточной терапии используют дендритные клетки, выделяемые из периферической крови, или получают их путем дифференцировки из моноцитов. Чаще всего применяется второй способ, так как количество конвенциональных ДК в крови относительно невелико по сравнению с содержанием в ней моноцитов [19]. Для получения ДК нами был использован классический способ дифференцировки моноцитов в незрелые ДК путем культивирования в среде с добавлением GM-CSF и IL-4. Дифференцировка моноцитов в незрелые ДК подтверждалась как характерными морфологическими изменениями клеток, так и изменением их иммунофенотипа: повышением уровня экспрессии CD86, CD40 и CD11c в сочетании с прекращением экспрессии клетками маркера моноцитов CD14.

Результативность дендритноклеточной терапии во многом зависит от иммунофенотипа ДК, а также от их секреторного профиля, формирующихся после созревания клеток. В целом, стимуляция созревания незрелых ДК сводится к 2 основным способам: (1) воздействие провоспалительных цитокинов и (2) использование лигандов для патоген-распознающих рецепторов (PRR), а также их смесей [9]. В данной работе нами была оценена стимулирующая активность TNF α и цитокинового «коктейля» из TNF α , IL-1, IL-6 с добавлением PGE2 [23]. Также были использованы лиганды PRR: poly I:C, имитирующий вирусную 2-цепочечную РНК (лиганд TLR3), LPS (лиганд TLR4) и, кроме того, лизированные клетки меланомы как источник DAMP (danger-associated

molecular patterns, «молекулярные образы, ассоциированные с опасностью»), которые также являются триггерами для созревания ДК [14].

Эффективность стимуляции созревания ДК оценивали по уровню экспрессии ими рецепторов, обеспечивающих взаимодействие с Т-клетками: антигенпрезентирующих (HLA-DR, CD1a), костимулирующих (CD86, CD83, CD40) и рецепторов, контролирующих миграцию ДК в лимфоузлы (CCR7). Созревание ДК должно сопровождаться повышением уровня экспрессии большинства из этих рецепторов. Также оценивался уровень секреции ДК цитокинов: IL-12, активирующего Т-звено иммунитета и оказывающего влияние на дифференцировку наивных CD4⁺ клеток в Th1 и IL-10, напротив, подавляющего секрецию IL-12 и ингибирующего активность Т-хелперов 1 [12].

Эффект от LPS на созревание ДК выявлен не был: достоверных различий с контролем не было выявлено ни по одному из исследованных параметров экспрессии клетками рецепторов или секреции цитокинов. Примечательно, что LPS довольно часто используется как фактор стимуляции созревания ДК [4, 9]. При этом в работе Fučíkova и соавт., 2011, также отмечено слабое влияние LPS на созревание ДК при культивировании клеток в бессывороточной среде [18]. Взаимодействие LPS с TLR4 должно активировать ряд транскрипционных факторов (в том числе NF-κB), инициирующих созревание ДК [28]. В то же время стимуляция с помощью LPS приводит к активации экспрессии генов DUSP-1 и TNFAIP3. Эти гены подавляют активность NF-κB, формируя механизм саморегулирования стимулирующего эффекта LPS [9]. Не исключено, что данный феномен объясняет отсутствие видимого эффекта от применения LPS в экспериментах.

Лизат клеток меланомы также не проявил стимулирующей активности в отношении ДК. Напротив, уровень экспрессии CD40 и CCR7 был ниже, чем в контроле, что является признаком подавления созревания клеток. Данный результат вполне ожидаем, так как опухолевые клетки могут содержать иммуносупрессивные факторы, хотя есть сведения об успешной стимуляции созревания ДК с помощью смеси нескольких линий клеток меланомы, подвергшихся апоптозу/некрозу [31].

Рецептор CD83 считается одним из значимых маркеров созревания ДК и, по-видимому, оказывает существенное влияние на антигенпрезентирующие функции за счет регуляции сортировки комплексов пептид-МНС II в эндосомах [21]. Статистически достоверное увеличение доли клеток, экспрессирующих CD83, по сравнению с

контролем, отмечено при использовании TNFα, «коктейля», poly I:C и «коктейля» + poly I:C. Наиболее высокий процент CD83⁺ клеток отмечается при использовании «коктейля» и «коктейля» + poly I:C, при использовании только TNFα или только poly I:C этот показатель был достоверно ниже (рис. 3).

Хемокиновый рецептор CCR7 играет ключевую роль в привлечении зрелых ДК в лимфоузлы [8] и поэтому может рассматриваться как один из значимых параметров, определяющих функциональную активность ДК. Доля CCR7⁺ клеток достоверно отличалась от контрольной только после стимуляции «коктейлем» и «коктейлем» + poly I:C, что, очевидно, объясняется, эффектом от набора провоспалительных цитокинов в сочетании с PGE2, стимулирующим созревание ДК и усиливающим экспрессию ими CCR7 [27]. При использовании только TNFα или poly I:C достоверных отличий от контроля не отмечалось (рис. 3).

Максимальный уровень экспрессии рецепторов CD86, CD40 и HLA-DR также отмечен при использовании «коктейля» и смеси «коктейль» + poly I:C (рис. 3).

Секреция IL-12, превышающая пороговый уровень, была выявлена лишь при использовании цитокинового коктейля, что вполне ожидаемо, так как содержащиеся в коктейле цитокины TNFα, IL-1 активируют транскрипционный фактор NF-κB, что, в свою очередь, приводит к усилению секреции IL-12 [24]. При этом использование только TNFα оказалось не достаточным для стимуляции продукции IL-12. Аналогичный результат наблюдался при использовании poly I:C, несмотря на возможность активации NF-κB и IRF3 за счет лиганд-рецепторного взаимодействия с TLR3 [33]. В то же время сочетание коктейля и poly I:C дало синергетический эффект и привело к почти двукратному увеличению количества секретируемого цитокина.

При этом схожий эффект наблюдался и в отношении толерогенного IL-10: совместная стимуляция ДК коктейлем и poly I:C сопровождалась достоверно более высоким уровнем секреции данного цитокина, чем при использовании каждого компонента по отдельности. Вероятно, в данном случае наблюдалась совместная активация синтеза IL-10, опосредованная лиганд-рецепторным взаимодействием TLR3 и воздействием PGE2 из состава коктейля [26].

Интересно отметить, что, по данным Cernadas и соавт. (2009), CD1a⁺ ДК имеют значительно более высокий уровень секреции IL-12, чем CD1a⁻ клетки [11]. При этом стимуляция созревания ДК не приводила к повышению уровня

экспрессии CD1a. Напротив, при использовании коктейля и коктейля + poly I:C доля CD1a⁺ клеток была ниже, чем при использовании других способов стимуляции и в контроле, несмотря на относительно высокий уровень секреции IL-12 (рис. 3).

В целом, наибольшую эффективность в стимуляции созревания ДК продемонстрировал коктейль, что, очевидно, обеспечивалось сочетанным действием провоспалительных цитокинов и PGE2. Данный вывод также подтверждается наиболее высоким уровнем активации Т-клеток при совместном культивировании со зрелыми ДК после стимуляции коктейлем (данные не представлены). Стимулирующий эффект от применения poly I:C был существенно ниже и, кроме того, сопровождался секрецией IL-10. В то же время добавление poly I:C к коктейлю привело к существенному росту уровня секреции ДК как IL-12, так и IL-10, но не оказало влияния на экспрессию клеточных рецепторов.

Заключение

По результатам проведенного исследования наибольшую эффективность в стимуляции созревания ДК продемонстрировал цитокиновый коктейль, а также коктейль в смеси с poly I:C. Прошедшие созревание под воздействием коктейля ДК демонстрировали максимальный уровень экспрессии рецепторов, связанных с их иммуностимулирующей функцией, а также высокую концентрацию секретируемого IL-12. Примечательно, что добавление poly I:C к коктейлю практически не оказывало влияния на иммунофенотип ДК, но приводило к кратному увеличению секреции как IL-12, являющегося одним из значимых активаторов Т-клеточного звена иммунитета, так и IL-10, ингибирующего иммунный ответ. Тем не менее использование смеси коктейля с poly I:C может рассматриваться как один из способов, повышающих эффективность стимуляции созревания ДК, культивируемых *in vitro*.

Список литературы / References

1. Балдуева И.А., Семиглазов В.Ф., Пипиа Н.П., Нехаева Т.Л., Данилова А.Б., Авдонкина Н.А., Новик А.В., Проценко С.А., Семиглазова Т.Ю., Карицкий А.П., Беляев А.М. Разработка способа иммунотерапии у больных раком молочной железы с исчерпанными возможностями стандартного лечения // Российский биотерапевтический журнал, 2018. Т. 17 (S). С. 5-6. [Baldueva I.A., Semiglazov V.F., Pipia N.P., Nehaeva T.L., Danilova A.B., Avdonkina N.A., Novik A.V., Protsenko S.A., Semiglazova T.Yu., Karitsky A.P., Belyaev A.M. Development of a method of immunotherapy in breast cancer patients with exhausted capabilities standard treatment. *Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy*, 2018, Vol. 17 (S), pp. 5-6. (In Russ.)]
2. Нехаева Т.Л. Оптимизация аутологичных дендритно-клеточных вакцин для лечения больных злокачественными новообразованиями // Сибирский онкологический журнал, 2013. Т. 3, № 57. С. 52-56. [Nehaeva T.L. Autologous dendritic cell vaccine optimization for therapy of patients with disseminated malignant neoplasms. *Sibirskiy onkologicheskii zhurnal = Siberian Journal of Oncology*, 2013, Vol. 3, no. 57, pp. 52-56. (In Russ.)]
3. Новик А.В., Проценко С.А., Анохина Е.М., Семенова А.И., Нехаева Т.Л., Телетаева Г.М., Данилова А.Б., Латипова Д.Х., Пипиа Н.П., Авдонкина Н.А., Зозуля А.Ю., Оганесян А.П., Балдуева И.А. Тридцатилетний опыт лекарственного лечения меланомы в НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова: важные уроки для будущих исследований // Эффективная фармакотерапия, 2020. Т. 16, № 18. С. 20-29. [Novik A.V., Protsenko S.A., Anokhina Ye.M., Semyonova A.I., Nekhayeva T.L., Teletayeva G.M., Danilova A.B., Latipova, D.Kh. Pipia N.P., Avdonkina N.A., Zozulya A.Yu., Oganesyanyan A.P., Baldueva I.A. Thirty years experience of melanoma therapy in N.N. Petrov National Medical Research Center of Oncology: important experience for future research. *Effektivnaya farmakoterapiya = Effective Pharmacotherapy*, 2020, Vol. 16, no. 18, pp. 20-29. (In Russ.)]
4. Arya S., Wiatrek-Moumoulidis D., Synowsky S.A., Shirran S.L., Botting C.H., Powis S.J., Stewart A.J. Quantitative proteomic changes in LPS-activated monocyte-derived dendritic cells: A SWATH-MS study. *Sci. Rep.*, 2019, Vol. 9, no. 1, 4343. doi: 10.1038/s41598-019-40773-6.
5. Bellanger A.-P., Pallandre J.-R., Borg C., Loeffert S., Gbaguidi-Haore H., Millon L. Human monocyte-derived dendritic cells exposed to microorganisms involved in hypersensitivity pneumonitis induce a Th1-polarized immune response. *Clin. Vaccine Immunol.*, 2013, Vol. 20, no. 8, pp. 1133-1142.
6. Bol K.F., Schreiber G., Gerritsen W.R., de Vries I.J.M., Figdor C.G. Dendritic cell-based immunotherapy: state of the art and beyond. *Clin. Cancer Res.*, 2016, Vol. 22, no. 8, pp. 1897-1906.
7. Bol K.F., Schreiber G., Rabold K., Wculek S.K., Schwarze J.K., Dzionek A., Teijeira A., Kandalafi L.E., Romero P., Coukos G., Neyns B., Sancho D., Melero I., de Vries I.J.M. The clinical application of cancer immunotherapy based on naturally circulating dendritic cells. *J. Immunother. Cancer*, 2019, Vol. 7, no. 1, 109. doi: 10.1186/s40425-019-0580-6.

8. Brandum E.P., Jørgensen A.S., Rosenkilde M.M., Hjortø G.M. Dendritic cells and CCR7 expression: an important factor for autoimmune diseases, chronic inflammation, and cancer. *Int J. Mol. Sci.*, 2021, Vol. 22, no. 15, 8340. doi: 10.3390/ijms22158340.
9. Castiello L., Sabatino M., Jin P., Clayberger C., Marincola F.M., Krensky A.M., Stroncek D.F. Monocyte-derived DC maturation strategies and related pathways: A transcriptional view. *Cancer Immunol. Immunother.*, 2011, Vol. 60, no 4, pp. 457-466.
10. Cechim G., Chies J.A.B. *In vitro* generation of human monocyte-derived dendritic cells methodological aspects in a comprehensive review. *An. Acad. Bras. Ciênc.*, 2019, Vol. 91, no. 4, e20190310. doi: 10.1590/0001-3765201920190310.
11. Cernadas M., Lu J., Watts G., Brenner M.B. CD1a expression defines an interleukin-12 producing population of human dendritic cells. *Clin. Exp. Immunol.*, 2009, Vol. 155, no. 3, pp. 523-533.
12. Couper K.N., Blount D.G., Riley E.M. IL-10: The master regulator of immunity to infection. *J. Immunol.*, 2008, Vol. 180, no. 9, pp. 5771-5777.
13. Datsi A., Sorg R.V. Dendritic Cell vaccination of glioblastoma: road to success or dead end. *Front. Immunol.*, 2021, Vol. 12, 770390. doi: 10.3389/fimmu.2021.770390.
14. De Winde C.M., Munday C., Acton S.E. Molecular mechanisms of dendritic cell migration in immunity and cancer. *Med. Microbiol. Immunol.*, 2020, Vol. 209, no 4, pp. 515-529.
15. Delirezh N., Majedi L., Asri Rezaei S., Ranjkeshzadeh H. Generation of mature monocyte-derived dendritic cells in the presence of heparin and monocyte conditioned medium: Phenotypic and functional comparison. *Iran. Biomed. J.*, 2011, Vol. 15, no. 3, pp. 79-84.
16. Dillman R.O., Nistor G.I., Cornforth A.N. Dendritic cell vaccines for melanoma: Past, present and future. *Melanoma Manag.*, 2016, Vol. 3, no. 4, pp. 273-289.
17. Filin I.Y., Kitaeva K.V., Rutland C.S., Rizvanov A.A., Solovyeva V.V. Recent advances in experimental dendritic cell vaccines for cancer. *Front. Oncol.*, 2021, Vol. 11, 730824. doi: 10.3389/fonc.2021.730824.
18. Fučíková J., Rožková D., Ulčová H., Budinský V., Sochorová K., Pokorná K., Bartůňková J., Špišák R. Poly I: C-activated dendritic cells that were generated in CellGro for use in cancer immunotherapy trials. *J. Transl. Med.*, 2011, Vol. 9, no. 1, 223. doi: 10.1186/1479-5876-9-223.
19. Gardner A., de Mingo Pulido Á., Ruffell B. Dendritic cells and their role in immunotherapy. *Front. Immunol.*, 2020, Vol. 11, 924. doi: 10.3389/fimmu.2020.00924.
20. Gelao L., Criscitiello C., Esposito A., Laurentiis M.D., Fumagalli L., Locatelli M.A., Minchella I., Santangelo M., Placido S.D., Goldhirsch A., Curigliano G. Dendritic cell-based vaccines: Clinical applications in breast cancer. *Immunotherapy*, 2014, Vol. 6, no. 3, pp. 349-360.
21. Grosche L., Knippertz I., König C., Royzman D., Wild A.B., Zinser E., Sticht H., Müller Y.A., Steinkasserer, A., Lechmann, M. The CD83 Molecule – An Important Immune Checkpoint. *Front. Immunol.*, 2020, Vol. 11, 721. doi: 10.3389/fimmu.2020.00721.
22. Jin P., Han T.H., Ren J., Saunders S., Wang E., Marincola F.M., Stroncek D.F. Molecular signatures of maturing dendritic cells: Implications for testing the quality of dendritic cell therapies. *J. Transl. Med.*, 2010, Vol. 8, no. 1, 4. doi: 10.1186/1479-5876-8-4.
23. Krause P., Singer E., Darley P.I., Klebensberger J., Groettrup M., Legler D.F. Prostaglandin E2 is a key factor for monocyte-derived dendritic cell maturation: Enhanced T cell stimulatory capacity despite IDO. *J. Leukoc. Biol.*, 2007, Vol. 82, no. 5, pp. 1106-1114.
24. Liu T., Zhang L., Joo D., Sun S.-C. NF- κ B signaling in inflammation. *Signal Transduct. Target. Ther.*, 2017, Vol. 2, no. 1, 17023. doi: 10.1038/sigtrans.2017.23.
25. Locy H., Melhaoui S., Maenhout S.K., Thielemans K. Dendritic cells: the tools for cancer treatment. From: dendritic cells. Ed. Chapoval S.P., InTech, 2018. 138 p.
26. Ma X., Yan W., Zheng H., Du Q., Zhang L., Ban Y., Li N., Wei F. Regulation of IL-10 and IL-12 production and function in macrophages and dendritic cells. *F1000Res.*, 2015, Vol. 4, F1000 Faculty Rev-1465. doi: 10.12688/f1000research.7010.1.
27. Muthuswamy R., Mueller-Berghaus J., Haberkorn U., Reinhart T.A., Schadendorf D., Kalinski P. PGE2 transiently enhances DC expression of CCR7 but inhibits the ability of DCs to produce CCL19 and attract naive T cells. *Blood*, 2010, Vol. 116, no. 9, pp. 1454-1459.
28. Nakahara T. Role of c-Jun N-terminal kinase on lipopolysaccharide induced maturation of human monocyte-derived dendritic cells. *Int. Immunol.*, 2004, Vol. 16, no. 12, pp. 1701-1709.
29. Sutherland S.I.M., Ju X., Horvath L.G., Clark G.J. Moving on from sipuleucel-t: new dendritic cell vaccine strategies for prostate cancer. *Front. Immunol.*, 2021, Vol. 12, 641307. doi: 10.3389/fimmu.2021.641307.

30. van Gulijk M., Dammeijer F., Aerts J.G.J.V., Vroman H. Combination strategies to optimize efficacy of dendritic cell-based immunotherapy. *Front. Immunol.*, 2018, Vol. 9, 2759. doi: 10.3389/fimmu.2018.02759.
31. von Euw E.M., Barrio M.M., Furman D., Bianchini M., Levy E. M., Yee C., Li Y., Wainstok R., Mordoh J. Monocyte-derived dendritic cells loaded with a mixture of apoptotic/necrotic melanoma cells efficiently cross-present gp100 and MART-1 antigens to specific CD8⁺ T lymphocytes. *J. Transl. Med.*, 2007, Vol. 5, no. 1, 19. doi: 10.1186/1479-5876-5-19.
32. Wimmers F., Schreibelt G., Sköld A.E., Figdor C.G., de Vries I.J.M. Paradigm shift in dendritic cell-based immunotherapy: From *in vitro* Generated Monocyte-Derived DCs to Naturally Circulating DC Subsets. *Front. Immunol.*, 2014, Vol. 5, 165. doi: 10.3389/fimmu.2014.00165.
33. Zhang S.-Y., Herman M., Ciancanelli M. J., Pérez De Diego R., Sancho-Shimizu V., Abel L., Casanova J.-L. TLR3 immunity to infection in mice and humans. *Curr. Opin. Immunol.*, 2013, Vol. 25, no. 1, pp. 19-33.

Авторы:

Фадеев Ф.А. – к.б.н., доцент, заведующий лабораторией, ГАУЗ СО «Институт медицинских клеточных технологий», г. Екатеринбург, Россия
Александрова А.Д. – младший научный сотрудник ГАУЗ СО «Институт медицинских клеточных технологий», г. Екатеринбург, Россия
Могиленских А.С. – научный сотрудник ГАУЗ СО «Институт медицинских клеточных технологий», г. Екатеринбург, Россия

Authors:

Fadeyev F.A., PhD (Biology), Associate Professor, Chief of Laboratory, Institute of Medical Cell Technologies, Ekaterinburg, Russian Federation
Aleksandrova A.D., Junior Research Associate, Institute of Medical Cell Technologies, Ekaterinburg, Russian Federation
Mogilenskikh A.S., Research Associate, Institute of Medical Cell Technologies, Ekaterinburg, Russian Federation

Поступила 26.05.2023
Отправлена на доработку 30.06.2023
Принята к печати 04.10.2023

Received 26.05.2023
Revision received 30.06.2023
Accepted 04.10.2023

ОСОБЕННОСТИ ВРОЖДЕННОГО ИММУНИТЕТА У ДЕТЕЙ С ГИПЕРТРОФИЕЙ НЕБНЫХ МИНДАЛИН

Ганковский В.А.¹, Карпова Е.П.², Ганковская Л.В.³, Авальян Я.С.², Меркушова Е.Д.³, Зинина Е.В.³

¹ ФГБНУ «Научно-исследовательский институт педиатрии», Научно-клинический Центр № 2 «Российский научный центр хирургии имени академика Б.В. Петровского», Москва, Россия

² ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

³ ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Резюме. Одной из часто встречающихся проблем в детской оториноларингологии является гипертрофия лимфоидной ткани глотки, в частности гипертрофия небных миндалин. Данная патология характеризуется увеличением размера одной или обеих небных миндалин в сочетании с различными клиническими симптомами. Принципы лечения детей с данной патологией остаются дискуссионными, так как отдаленное влияние двусторонней тонзиллотомии все еще до конца не изучено. Цель исследования — оценить уровень экспрессии генов молекул врожденного иммунитета *TLR4*, *HBD1*, *HBD2*, *IL1β* в слизистой оболочке небных миндалин у детей с гипертрофией небных миндалин до и после проведенного лечения.

Проведено исследование 78 пациентов с формированием трех независимых групп. В 1-ю группу (сравнения) включено 20 соматически здоровых детей. Во 2-ю группу вошли 28 детей с гипертрофией небных миндалин 2-й степени, которым проводилось консервативное лечение. В 3-ю группу было включено 30 детей с гипертрофией небных миндалин 3-й степени, которым по показаниям была проведена двусторонняя тонзиллотомия. Определение и оценка показателей врожденного иммунитета проводилась как до начала лечения, так и спустя один месяц после, с использованием метода ПЦР в режиме реального времени.

У детей с гипертрофией небных миндалин исходные значения экспрессии генов *TLR4* и противомикробных пептидов отличались от показателей здоровых детей. Выявлено снижение экспрессии генов противомикробных пептидов (*HBD1*, *HBD2*), осуществляющих немедленную защиту от патогенов. Значения экспрессии гена *TLR4* отличались в группах детей с различной степенью выраженности гипертрофии небных миндалин. У пациентов, которым показана двусторонняя тонзиллотомия, выявлено увеличение экспрессии гена *TLR4* и снижение экспрессии генов *HBD1* и *HBD2*, что может свидетельствовать о готовности развития воспаления в миндалинах в ответ на патогены. Спустя один месяц после хирургического лечения показатели врожденного иммунитета были сопоставимы

Адрес для переписки:

Ганковский Виктор Анатольевич
Российский научный центр хирургии
имени академика Б.В. Петровского
119333, Россия, Москва, ул. Фотиевой, 10, стр. 1
Тел.: 8 (916) 479-27-95.
E-mail: s.slon2012@yandex.ru

Address for correspondence:

Viktor A. Gankovsky
B. Petrovsky Russian Research Center of Surgery
10 Fotieva St Bldg 1
Moscow
119333 Russian Federation
Phone: +7 (916) 479-27-95.
E-mail: s.slon2012@yandex.ru

Образец цитирования:

В.А. Ганковский, Е.П. Карпова, Л.В. Ганковская, Я.С. Авальян, Е.Д. Меркушова, Е.В. Зинина «Особенности врожденного иммунитета у детей с гипертрофией небных миндалин» // Медицинская иммунология, 2024. Т. 26, № 2. С. 263–270.
doi: 10.15789/1563-0625-FOI-2650

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

For citation:

V.A. Gankovsky, E.P. Karpova, L.V. Gankovskaya, Ya.S. Avalyan, E.D. Merkusheva, E.V. Zinina “Features of innate immunity in children with hypertrophy of the palatine tonsils”, *Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2024, Vol. 26, no. 2, pp. 263–270.
doi: 10.15789/1563-0625-FOI-2650

© Gankovsky V.A. et al., 2024
The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License

DOI: 10.15789/1563-0625-FOI-2650

с показателями здоровых детей, что доказывает обоснованность проведенной двусторонней тонзиллотомии. Во 2-й группе пациентов через один месяц после консервативного лечения экспрессия гена *TLR4* оставалась сниженной, экспрессия гена β -дефенсина *HBD1* при этом возрастала и превышала показатели группы здоровых детей, уровень экспрессии гена *IL1 β* был снижен.

Выявленный дисбаланс на уровне экспрессии генов *TLR4*, *HBD1* и *HBD2* подтверждает важную роль механизмов врожденного иммунитета в патогенезе гипертрофии небных миндалин. Оценка показателей врожденного иммунитета может быть использована как дополнительный критерий в назначении проводимой терапии гипертрофии небных миндалин и оценке ее эффективности.

Ключевые слова: врожденный иммунитет, гипертрофия небных миндалин, двусторонняя тонзиллотомия, Toll-подобные рецепторы, противомикробные пептиды, *IL1*

FEATURES OF INNATE IMMUNITY IN CHILDREN WITH HYPERTROPHY OF THE PALATINE TONSILS

Gankovsky V.A.^a, Karpova E.P.^b, Gankovskaya L.V.^c, Avalyan Ya.S.^b, Merkusheva E.D.^c, Zinina E.V.^c

^a Research Institute of Pediatrics, B. Petrovsky Russian Research Center of Surgery, Moscow, Russian Federation

^b Russian Medical Academy of Continuing Professional Education, Moscow, Russian Federation

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

Abstract. Hypertrophy of pharyngeal lymphoid tissue is among the most common problems in pediatric otorhinolaryngology, in particular, hypertrophy of the palatine tonsils. This disorder is characterized by increased size of a single or both palatine tonsils combined with various clinical symptoms. The principles of treatment in children with this pathology remain debatable, since the long-term effects of bilateral tonsillotomy are still not fully understood. The aim of the study was to assess the expression levels of genes encoding the innate immunity molecules (*TLR4*, *HBD1*, *HBD2*, *IL1 β*) in the mucous membranes of palatine tonsils in children with palatine tonsillitis before and after treatment.

We conducted a study of 78 patients divided into three independent groups. The 1st group (comparison) included 20 somatically healthy children. The 2nd group included 28 children with grade 2 palatine tonsil hypertrophy who underwent local treatment. The 3rd group included 30 children with grade 3 hypertrophy of the palatine tonsils, who, by clinical indications, underwent bilateral tonsillotomy. Determination and evaluation of innate immunity indices was carried out both before starting the treatment, and one month later, using the real-time PCR method.

In children with hypertrophy of palatine tonsils, the initial values of *TLR4* gene expression and antimicrobial peptides differed from those of healthy children. A decreased expression of *HBD1* and *HBD2* genes, which provide immediate protection against pathogens, was revealed. The values of *TLR4* gene expression differed in groups of children with varying degrees of palatine tonsillar hypertrophy. In patients with bilateral tonsillotomy, an increased expression of *TLR4* gene and a decreased expression of antimicrobial peptide genes (*HBD1*, *HBD2*) were revealed, which may indicate a readiness for development of tonsillar inflammation in response to pathogens. One month after surgical treatment, the indices of innate immunity were comparable with those of healthy children thus confirming the validity of surgical treatment. In the 2nd group of patients, the *TLR4* gene expression one month after conservative treatment remained reduced, the expression of β -defensin *HBD1* gene increased and exceeded the indicators of the group of healthy children, the expression level of the *IL-1 β* gene was reduced.

The revealed imbalance between the *TLR4*, *HBD1* and *HBD2* expression levels confirms an important role of innate immunity mechanisms in pathogenesis of palatine tonsillitis. The assessment of innate immunity indices may be used as an additional criterion in administration of therapy for hypertrophy of palatine tonsils and evaluation of its efficiency.

Keywords: innate immunity, palatine tonsils, hypertrophy, tonsillotomy, bilateral, Toll-like receptors, antimicrobial peptides, *IL1*

Введение

Гипертрофия небных миндалин (ГНМ) — это физиологическое увеличение миндалин при отсутствии воспаления. Наиболее подвержены ГНМ дети в возрасте 3-7 лет. Именно на этот возраст приходится формирование иммунной системы [1, 4].

Небные миндалины являются частью кольца Вальдейера—Пирогова и служат первой линией защиты организма от патогенов, таких как бактерии и вирусы, обеспечивая тем самым мукозальный иммунитет [9].

Вопросы диагностики и лечения детей с ГНМ остаются дискуссионными [7, 14], так как отдаленное влияние двусторонней тонзиллотомии все еще до конца не изучено [10]. Некоторые исследования показали, что тонзиллотомия отрицательно влияет на иммунную систему с точки зрения формирования клеточного и гуморального иммунитета [12]. Проведенные исследования, в основном, были сосредоточены на изучении адаптивного иммунитета [13], однако невозможно его оценить без участия системы врожденного иммунитета (ВИ), которая обеспечивает первую линию защиты организма.

В последние годы стало очевидно, что эпителий слизистой оболочки ротоглотки, в том числе и небных миндалин, представляет не только физиологический барьер, через который в организм проникает большое количество патогенов, но и является полноправным участником мукозального иммунитета. Он выполняет ряд важных функций ВИ, в частности: 1) распознавание патогенов; 2) секреции противовоспалительных цитокинов, хемокинов, интерферонов, противомикробных пептидов; 3) активации адаптивного иммунитета.

Распознавание патогенов происходит за счет паттерн-распознающих рецепторов (PRR — pattern recognition receptors), к которым относятся семейства TLR, NLR, RLR и др. Взаимодействие рецепторов со своими лигандами PAMP (pathogen associated molecular patterns) приводит к увеличению экспрессии провоспалительных цитокинов, хемокинов и сборке инфламмосомного комплекса, что в свою очередь обуславливает развитие воспалительной реакции, направленной на элиминацию патогена. В течение последних лет появились работы по исследованию роли механизмов врожденного иммунитета при заболеваниях ЛОР-органов. Дефект на уровне экспрессии ПМП в глоточной миндалине показан при аллергическом рините [11]. Гиперэкспрессия TLRs в воспалительном инфильтрате выявлена при полипозном риносинусите [2]. Выраженное снижение экспрессии генов *TLR2*, *TLR4* и ПМП в слизистой оболочке носа при различных ринитах [6].

Дисбаланс распознающих рецепторов и эффекторных молекул обнаружен при гипертрофии аденоидов [11]. Ограниченное число работ требуют проведения комплексных исследований для получения данных об иммунопатогенезе ГНМ. Исследование механизмов ВИ позволит выявить новые подходы к прогнозу и разработать новые методы лечения ГНМ.

В связи с этим **целью данного исследования** является оценка экспрессии генов молекул врожденного иммунитета *TLR4*, *HBD1*, *HBD2*, *IL1β* в слизистых небных миндалин у детей с ГНМ до и после проведенного лечения.

Материалы и методы

Характеристика групп исследования

В исследование были включены 78 детей в возрасте от 3 до 7 лет.

Все пациенты находились на обследовании и лечении в ДГКБ им. З.А. Башляевой в оториноларингологическом отделении. Родителями было подписано информированное добровольное согласие на обследование и обработку данных.

В 1-ю группу (сравнения) было включено 20 соматически здоровых детей, из которых 14 мальчиков (70%) и 6 девочек (30%). Средний возраст составил $5,1 \pm 1,5$ года.

Во 2-ю группу было включено 28 детей с диагнозом ГНМ 2-й степени, из которых 20 мальчиков (71%) и 8 девочек (29%). Средний возраст составил $4,3 \pm 1,3$ года. У пациентов данной группы миндалины выступают за пределы небных дужек на $1/2$ - $2/3$ расстояния от края передней небной дужки до середины язычка. При этом некоторые родители жалуются на незначительный храп детей во сне. Пациентам данной группы не требовалось оперативного лечения. Проводилось местное лечение небных миндалин растворами антисептиков 3 раза в день в течение 7 дней [3].

В 3-ю группу было включено 30 детей с диагнозом ГНМ 3-й степени, из которых 17 мальчиков (56%) и 13 девочек (44%). Средний возраст составил $4,8 \pm 1,4$ года. У пациентов данной группы миндалины доходили до язычка и соприкасались друг с другом. При этом основные жалобы родителей на постоянный храп, который не всегда проходил при смене позы ребенка во сне. Также отмечались симптомы синдрома обструктивного апноэ сна (СОАС), дневную сонливость и снижение успеваемости ребенка. Пациентам данной группы по показаниям было проведено оперативное лечение.

Критерии включения пациентов в 1-ю группу (здоровых детей):

1) возраст от 3 до 7 лет;

2) отсутствие заболеваний ЛОР-органов, острых респираторных заболеваний;

3) имеющие отрицательный стрептатест (отсутствие БГСА);

4) наличие подписанного информированного согласия родителей или опекунов на участие в данном исследовании.

Критерии включения пациентов в 2-ю группу:

1) возраст от 3 до 7 лет;

2) наличие ГНМ 2-й степени, не требующей оперативного лечения;

3) имеющие отрицательный стрептатест (отсутствие БГСА);

4) наличие подписанного информированного согласия родителей или опекунов на участие в данном исследовании.

Критерии включения пациентов во 3-ю группу:

1) возраст от 3 до 7 лет;

2) наличие ГНМ 3-й степени, требующей оперативного лечения;

3) имеющие отрицательный стрептатест (отсутствие БГСА);

4) наличие подписанного информированного согласия родителей или опекунов на участие в данном исследовании.

Критерии исключения пациентов из исследования:

1) возраст до 3 лет, больше 7 лет;

2) отсутствие ГНМ;

3) дети с тяжелыми соматическими заболеваниями;

4) имеющие положительный стрептатест (наличие БГСА);

5) отказ от подписания информированного согласия родителей или опекунов на участие в данном исследовании.

Для исследования ВИ у пациентов с ГНМ применялся метод полимеразной цепной реакции в режиме реального времени, для определения уровня экспрессии генов *TLR4*, *HBD1*, *HBD2*, *IL1β* относительно β-актина.

Определение экспрессии генов молекул врожденного иммунитета

Получение биологического материала и оценка экспрессии генов молекул ВИ у каждого ребенка исследуемых групп (2 и 3) проводилась дважды: до начала лечения и спустя 1 месяц после проведенного лечения.

Взятие проб проводилось цитощеточкой тип D с поверхности небных миндалин.

Выделение РНК из полученных образцов проводили с использованием набора «Рибо-сорб» («ИнтерЛабСервис», Россия) согласно протоколу производителя. Затем, для получения кДНК на основе выделенной РНК проводили реакцию обратной транскрипции, используя набор фирмы «Синтол» (Россия). кДНК использовали для проведения полимеразной цепной реакции в режи-

ме реального времени (ПЦР-РВ) с применением набора реагентов «Синтол» (Россия). В качестве эндогенного контроля был использован ген «домашнего хозяйства», который представляет собой конститутивно экспрессируемый ген, кодирующий β-актин). Экспрессию генов оценивали методом измерений по DD_{Ct}, получая результаты в виде относительных единиц, показывающих во сколько раз больше или меньше экспрессия исследуемого гена в образце по отношению к гену домашнего хозяйства. Расчет результатов производился по формуле:

$$R = 2^{-\Delta C_t(\text{исследуемого гена}) - \Delta C_t(\text{гена актина})},$$

где C_t – порог насыщения реакции (cycle threshold), R – относительная экспрессия [5]. Для оценки значимости различий средних показателей экспрессии генов ВИ среди пациентов из разных групп применялся непараметрический U-критерий Манна–Уитни для независимых выборок. За уровень значимости (асимптотическая двусторонняя значимость) принималось значение $p < 0,05$. Для оценки значимости различий в уровне экспрессии генов ВИ среди пациентов из одной группы до и после проведенного лечения применялся непараметрический T-критерий Вилкоксона для зависимых выборок. За уровень значимости принималось значение $p < 0,05$.

Исследование проводилось в соответствии с Хельсинкской декларацией Всемирной медицинской ассоциации «Этические принципы проведения научных медицинских исследований с участием человека» (WMA Declaration of Helsinki – Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects, 2013).

Результаты

Основные результаты экспрессии генов врожденного иммунитета (*TLR4*, *HBD1*, *HBD2*, *IL1β*) в слизистой оболочке небных миндалин

На первом этапе нами была проведена оценка уровня экспрессии генов *TLR4* в слизистой оболочке миндалин у пациентов с ГНМ до и после проведения консервативного лечения (2-я группа), а также у детей до и после двусторонней тонзиллотомии (3-я группа). Получены неоднозначные результаты по экспрессии гена *TLR4* у детей II и III группы. В группе детей, которым была показана двусторонняя тонзиллотомия, экспрессия гена *TLR4* была выше в 3,48 раза ($p = 0,0001$) по сравнению с группой здоровых детей. В то время как у детей II группы до местного применения раствора антисептиков выявлено снижение экспрессии гена *TLR4* в 2,7 раза ($p = 0,053$) по сравнению с группой здоровых детей. После хирургического лечения уровень экспрессии генов *TLR4* у детей группы III снижался в 5,3 раза и был

сопоставим с аналогичным показателем группы сравнения ($p = 0,00046$). После местного применения раствора антисептиков у II группы уровень экспрессии *TLR4* оставался сниженным в 3,1 раза ($p = 0,00218$) (рис. 1).

Важнейшими эффекторными молекулами врожденного иммунитета являются противомикробные пептиды (ПМП) – низкомолекулярные (~ 10 kDa) катионные пептиды. HBD-1 экспрессируется конститутивно, вне зависимости от действия патогенов. В большинстве случаев экспрессия β -дефенсинов в тканях индуцируется через активацию TLRs [8].

Уровень экспрессии гена *HBD1* у пациентов с ГНМ обеих групп был достоверно ниже, чем в группе здоровых детей. Также нами было выявлено снижение экспрессии гена *HBD2* у детей с ГНМ по сравнению с показателем группы здоровых детей в 4,5 раза ($p = 0,014$).

После консервативного лечения экспрессия гена *HBD1* увеличивалась в 5 раз ($p = 0,01$) по сравнению с исходным показателем. При сравнении экспрессии гена *HBD2* у пациентов до и после проведенного консервативного лечения статистически достоверной разницы не выявлено (рис. 2).

После хирургического лечения пациентов с ГНМ уровень экспрессии *HBD1* возрастал в 8 раз ($p = 0,008$), уровень экспрессии *HBD2* возрастал в 2,1 раза ($p = 0,015$) (рис. 3).

Уровень экспрессии гена *IL1 β* во II и III группах достоверно не отличался от показателей здоровых детей. После локального применения раствора антисептиков выявлено снижение экспрессии *IL1 β* в 2,3 раза по сравнению с исходным показателем ($p = 0,005$). Достоверного изменения экспрессии гена *IL1 β* после двусторонней тонзиллотомии не выявлено (рис. 4).

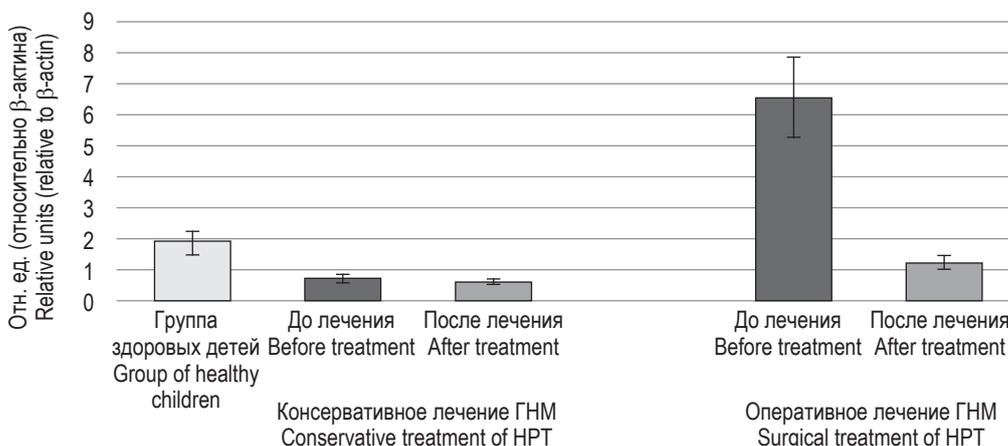


Рисунок 1. Экспрессия гена *TLR4* в группе здоровых детей и у пациентов с гипертрофией небных миндалин до и после проведенного лечения

Figure 1. *TLR4* gene expression in a group of healthy children and in patients with hypertrophy of the palatine tonsils before and after treatment

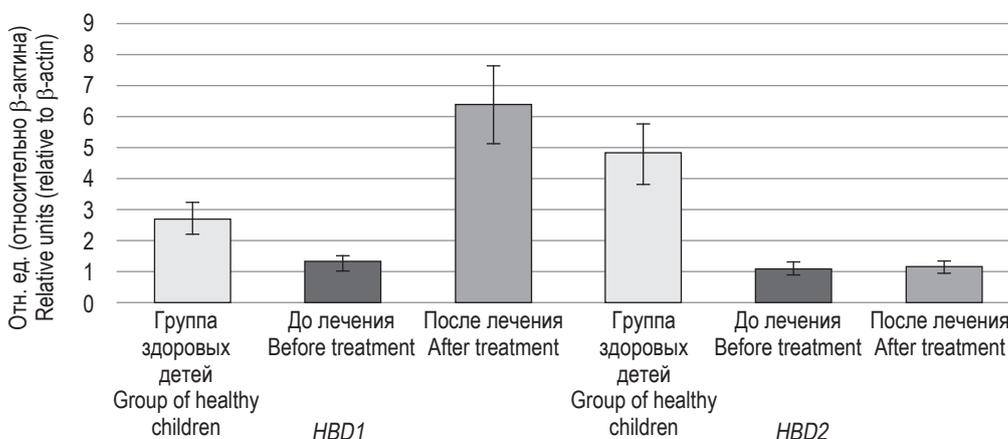


Рисунок 2. Экспрессия генов *HBD1* и *HBD2* у пациентов с гипертрофией небных миндалин до и после проведенного консервативного лечения

Figure 2. Expression of *HBD1* and *HBD2* genes in patients with hypertrophy of the palatine tonsils before and after conservative treatment

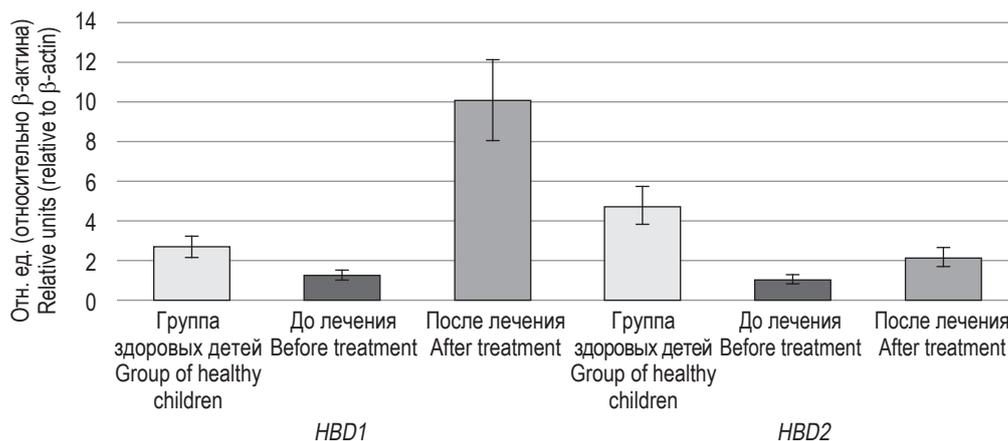


Рисунок 3. Экспрессия генов *HBD1* и *HBD2* у пациентов с гипертрофией небных миндалин до и после проведенного оперативного лечения

Figure 3. Expression of *HBD1* and *HBD2* genes in patients with palatine tonsil hypertrophy before and after surgical treatment

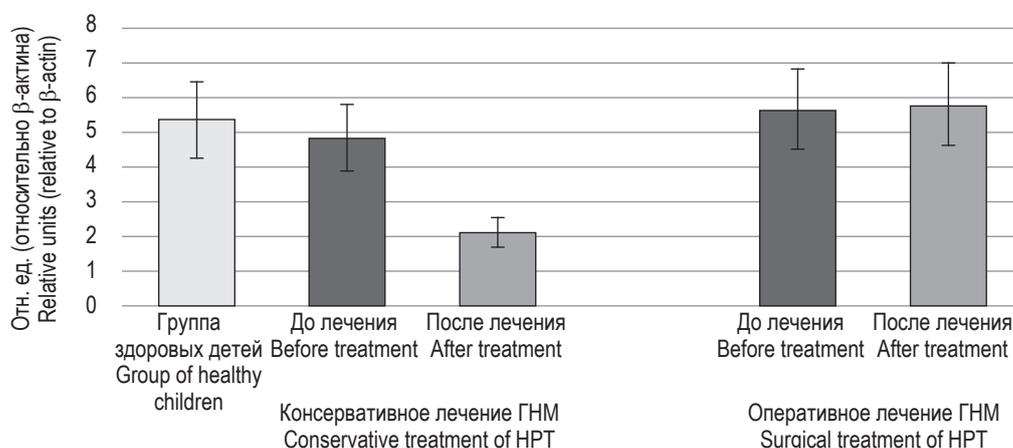


Рисунок 4. Экспрессия гена *IL1β* в группе здоровых детей и у пациентов с гипертрофией небных миндалин до и после проведенного лечения

Figure 4. *IL1β* gene expression in the group of healthy children and in patients with hypertrophy of the palatine tonsils before and after treatment

Обсуждение

В настоящее время известно, что эпителий слизистой оболочки небных миндалин представляет иммунологический барьер, выполняющий различные функции врожденного иммунитета, такие как: распознавание патогенов с помощью PRR (TLRs и др.), секреции противомикробных пептидов и провоспалительных цитокинов, активации адаптивного иммунитета, включая пролиферацию дифференцировку специфических клонов лимфоцитов в лимфоэпителиальных структурах кольца Вальдейера–Пирогова.

ГНМ достаточно часто встречается в детской популяции, зачастую сочетается с гипертрофией аденоидов. ГНМ характеризуется проблемами носового дыхания во сне, такими как: навязчивый храп, задержки дыхания во сне (СОАС), также может отмечаться снижение успеваемо-

сти и даже затруднение в проглатывании твердой пищи. При наличии жалоб, соответствующей клинической картины, детям с ГНМ требуется хирургическое лечение [4]. Однако до сих пор вопрос о необходимости проведения тонзиллотомии остается дискуссионным, поскольку не до конца изучено влияние оперативного лечения на показатели ВИ слизистой оболочки небных миндалин.

Нами был применен комплексный подход оценки врожденного иммунитета на уровне слизистой оболочки небных миндалин, включающий определение уровня экспрессии генов распознающего рецептора *TLR4*, противомикробных пептидов (*HBD1*, *HBD2*) и *IL1β*. Эти показатели оценивались до и после проведенного лечения.

Исходные показатели врожденного иммунитета у детей с ГНМ отличались от показателей

здоровых детей. Так, в эпителии слизистой оболочки небных миндалин детей с ГНМ значительно меньше экспрессировались гены противомикробных пептидов (*HBD1* и *HBD2*). Уровень экспрессии гена *TLR4* отличался в группах детей с ГНМ с разной степенью выраженности гипертрофии. У детей III группы, которым была показана двусторонняя тонзиллотомия, исходный уровень экспрессии гена *TLR4* был выше в 3,48 раза по сравнению с группой здоровых детей. У детей II группы этот показатель был ниже, чем в группе здоровых детей. У пациентов III группы увеличение экспрессии гена *TLR4* и снижение экспрессии генов ПМП может свидетельствовать о готовности развития воспаления в миндалинах в ответ на патогены. Снижение экспрессии гена *TLR4* наблюдалось в группе пациентов с меньшей степенью ГНМ и отсутствии СОАС, что позволило применить консервативный метод лечения. Экспрессия гена провоспалительного цитокина *IL1β* у детей III группы незначительно превышала этот показатель у здоровых детей ($p > 0,05$), что свидетельствует об отсутствии воспаления в слизистой миндалин на момент исследования.

После хирургического лечения экспрессия гена *TLR4* снижалась и приближалась к уровню показателя группы здоровых детей. В этой группе наблюдалось значительное увеличение экспрессии генов *HBD1* и *HBD2*, что свидетельствует о повышении противомикробной защиты слизистой оболочки. Таким образом, обоснованность проведения хирургического лечения подтверж-

дена коррекцией показателей ВИ спустя месяц после операции.

После консервативного лечения экспрессия гена *TLR4* оставалась сниженной. Экспрессия генов β-дефензина *HBD1* при этом возрастала и превышала показатели группы здоровых детей, уровень экспрессии гена *IL1β* был снижен.

Заключение

Таким образом у детей с ГНМ (в обеих группах) выявлен дисбаланс механизмов врожденного иммунитета на уровне слизистой оболочки небных миндалин, проявляющийся в изменении уровня экспрессии гена *TLR4* и снижении экспрессии генов β-дефензинов (*HBD1* и *HBD2*). Это подтверждает важную роль механизмов врожденного иммунитета в патогенезе гипертрофии небных миндалин. Оценка показателей ВИ может быть использована как дополнительный критерий в назначении проводимой терапии ГНМ и оценки ее эффективности.

Вклад авторов

Написание текста статьи, анализ полученных данных — Ганковский В.А.; обоснование клинического дизайна, составление карты обследования пациентов, анализ полученных клинических данных — Карпова Е.П.; концепция и дизайн иммунологического исследования, руководство написанием статьи — Ганковская Л.В.; сбор и обработка биологического материала — Авальян Я.С.; постановка ПЦР — Меркушова Е.Д.; статистическая обработка данных — Зинина Е.В.

Список литературы / References

1. Богомильский М.Р., Чистякова В.Р., Детская оториноларингология: учебник. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2014. С. 372-399. [Bogomilsky M.R., Chistyakova V.R., Pediatric otorhinolaryngology. Textbook]. Moscow: GEOTAR-Media, 2014, pp. 372-399.
2. Егорова В.И., Савелевич Е.Л. Место врожденного иммунитета в развитии хронического риносинусита и перспективы тактики консервативного лечения // Альманах клинической медицины, 2016. Т. 44, № 7. С. 850-856. [Egorova V.I., Savelevich E.L. The place of innate immunity in the development of chronic rhinosinusitis and the prospects of conservative treatment tactics. *Almanakh klinicheskoy meditsiny = Almanac of Clinical Medicine*, 2016, Vol. 44, no. 7, pp. 850-856. (In Russ.)]
3. Карпова Е.П., Ганковская Л.В., Возгомент О.В., Авальян Я.С., Куликова И.Ю., Меркушева Е.Д., Хасанова Е.М. Гипертрофия небных миндалин — возможные подходы в лечении // Вестник оториноларингологии, 2020. Т. 85, № 3. С. 57-63. [Karpova E.P., Gankovskaya L.V., Vozgoment O.V., Avalyan Ya.S., Kulikova I.Yu., Merkusheva E.D., Khasanova E.M. Hypertrophy of palatine tonsils — possible treatment approaches. *Vestnik otorinolaringologii = Bulletin of Otorhinolaryngology*, 2020, Vol. 85, no. 3, pp. 57-63. (In Russ.)]
4. Клинические рекомендации «Гипертрофия аденоидов. Гипертрофия небных миндалин» Министерства здравоохранения Российской Федерации. 2021. С. 8-35. [Clinical recommendations "Adenoid hypertrophy. Hypertrophy of the palatine tonsils" Ministry of Health of the Russian Federation, 2021, pp. 8-35. (In Russ.)]
5. Ребриков Д.В. ПЦР «в реальном времени». М.: Бином. Лаборатория знаний, 2009. 223 с. [Rebrikov D.V. "Real-time" PCR]. Moscow: Binom. Laboratoriya znaniy, 2009. 223 p.
6. Сизякина Л.П., Андреева И.И., Семенова Н.И., Харитоновна М.В. Роль врожденного иммунитета в формировании различных вариантов течения сезонного аллергического ринита // Медицинский вестник Юга России, 2022. Т. 13, № 1. С. 117-123. [Sizyakina L.P., Andreeva I.I., Semenova N.I., Kharitonova M.V. The role of innate immunity in the formation of various variants of the course of seasonal allergic rhinitis. *Meditsinskiy vestnik Yuga Rossii = Medical Bulletin of the South of Russia*, 2022, Vol. 13, no. 1, pp. 117-123. (In Russ.)]

7. Baugh R.F., Archer S.M., Mitchell R.B., Rosenfeld R.M., Amin R., Burns J.J., Darrow D.H., Giordano T., Litman R.S., Li K.K., Mannix M.E., Schwartz R.H., Setzen G., Wald E.R., Wall E., Sandberg G., Patel M.M.; American Academy of Otolaryngology-Head and Neck Surgery Foundation. Clinical practice guideline: tonsillectomy in children. *Otolaryngol. Head Neck Surg.*, 2011, Vol. 144, pp. S1-S30.
8. Borman H. Antibacterial peptides: basic facts emerging concepts. *J. Intern. Med.*, 2003, Vol. 254, pp. 197-215.
9. Brandtzaeg P. Immune functions of nasopharyngeal lymphoid tissue. *Adv. Otorhinolaryngol.*, 2011, Vol. 72, pp. 20-24.
10. Brandtzaeg P. Immunology of tonsils and adenoids: everything the ENT surgeon needs to know. *Int. J. Pediatr. Otorhinolaryngol.*, 2003, Vol. 67, Suppl. 1, pp. S69-S76.
11. Gankovskaya L.V., Bykova V.P., Namasova-Baranova L.S., Karaulov A.V., Rahmanova I.V., Gankovskii V.A., Merkusheva C.D., Svitich O.A. Innate immunity gene expression by epithelial cells of upper respiratory tract in children with adenoid hypertrophy. *Auris Nasus Larynx*, 2018, Vol. 45, no. 4, pp. 753-759.
12. Kaygusuz I., Godekmerdan A., Karlidag T., Keles E., Yalcin S., Aral I., Yildiz M. Early stage impacts of tonsillectomy on immune functions of children. *Int. J. Pediatr. Otorhinolaryngol.*, 2003, Vol. 67, pp. 1311-1315.
13. Meyer J.E., Beier U.H., Gorogh T., Schreiber S., Beck C., Maune S., Defensin and chemokine expression patterns in the palatine tonsil: a model of their local interaction. *Eur. Arch. Otorhinolaryngol.*, 2006, Vol. 263, no. 4, pp. 319-326.
14. Parker N.P., Walner D.L. Trends in the indications for pediatric tonsillectomy or adenotonsillectomy. *Int. J. Pediatr. Otorhinolaryngol.*, 2011, Vol. 75, pp. 282-285.

Авторы:

Ганковский В.А. — к.м.н., ведущий научный сотрудник, врач-оториноларинголог, ФГБНУ «Научно-исследовательский институт педиатрии», Научно-клинический Центр № 2 «Российский научный центр хирургии имени академика Б.В. Петровского», Москва, Россия

Карпова Е.П. — д.м.н., профессор, заведующая кафедрой детской оториноларингологии педиатрического факультета ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Ганковская Л.В. — д.м.н., профессор, заведующая кафедрой иммунологии медико-биологического факультета ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Авальян Я.С. — аспирант кафедры детской оториноларингологии ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Меркушова Е.Д. — к.м.н., старший преподаватель кафедры иммунологии медико-биологического факультета ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Зинина Е.В. — студент медико-биологического факультета ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Authors:

Gankovsky V.A., PhD (Medicine), Leading Research Associate, ORL Physician, Research Institute of Pediatrics, B. Petrovsky Russian Research Center of Surgery, Moscow, Russian Federation

Karpova E.P., PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Department of Pediatric Otorhinolaryngology, Russian Medical Academy of Continuing Professional Education, Moscow, Russian Federation

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

Avalyan Ya.S., Postgraduate Student, Department of Pediatric Otorhinolaryngology, Russian Medical Academy of Continuing Professional Education, Moscow, Russian Federation

Merkusheva E.D., PhD (Medicine), Senior Lecturer, Department of Immunology, Medico-Biological Faculty, N. Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russian Federation

Zinina E.V., Student, Medico-Biological Faculty, N. Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russian Federation

Поступила 03.02.2023

Отправлена на доработку 09.02.2023

Принята к печати 20.02.2023

Received 03.02.2023

Revision received 09.02.2023

Accepted 20.02.2023

ДИНАМИКА ПРОФИЛЯ ВРОЖДЕННОГО ИММУННОГО ОТВЕТА У ПАЦИЕНТОВ С ИШЕМИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНЬЮ СЕРДЦА В РАЗЛИЧНЫЕ СРОКИ ПОСЛЕ СТЕНТИРОВАНИЯ КОРОНАРНЫХ АРТЕРИЙ

Шлык И.Ф.¹, Евсегнеева И.В.², Беседина Д.Ю.¹, Макаrchук И.В.¹

¹ ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Ростов-на-Дону, Россия

² ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Министерства здравоохранения РФ (Сеченовский университет), Москва, Россия

Резюме. Атеросклероз сопровождается повреждением сосудистого эндотелия артерий, где развивается воспалительный ответ и формируется атеросклеротическая бляшка. И важным компонентом здесь выступает врожденный иммунитет, являющийся ключевым и самым ранним неспецифическим механизмом.

Цель исследования — комплексная оценка клеточного звена врожденного иммунитета и сопоставление полученных результатов в различные сроки после коронарного стентирования.

В исследовании приняли участие 50 пациентов с коронарным атеросклерозом (группа 1), которым показано выполнение стентирования коронарных артерий, и 20 добровольцев (группа 2), у которых нет признаков ишемической болезни сердца (ИБС). Исследование показателей иммунитета проводили до операции, через 4-5, 9-10 и 28-30 суток, что составило ранний послеоперационный период, а также через 6 и 12 месяцев после стентирования, т. е. в позднем послеоперационном периоде. Фенотипирование моноцитов и лимфоцитов периферической крови проводили методом проточной цитофлюориметрии с использованием моноклональных антител производства Beckman Coulter (США). Внутриклеточное содержание Гранзима В проводили на проточном лазерном цитофлюориметре FC500. Метаболическую активность нейтрофилов оценивали в НСТ-тесте. Альфа-дефензин (Nucult Biotech, США) определяли в плазме крови методом ИФА. Статистический анализ результатов исследования проводили с применением программы Statistica 12.0 (StatSoft, США). Статистическая значимость считалась достоверной при $p \leq 0,05$.

У пациентов с коронарным атеросклерозом повышается количество натуральных киллеров и их активность, моноцитов. Отмечается угнетение процессов презентации антигенов, дисбаланс в микробицидной активности нейтрофилов с преобладанием секреции антимикробных пептидов. В раннем периоде значимые изменения коснулись лишь снижения содержания внутриклеточного гранзима В

Адрес для переписки:

Шлык Ирина Федоровна
ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ
344022, Россия, г. Ростов-на-Дону,
пер. Нахичеванский, 29.
Тел.: 8 (928) 179-39-87.
E-mail: sushkinaif@mail.ru

Address for correspondence:

Irina F. Shlyk
Rostov State Medical University
29 Nakhichevan Lane
Rostov-on-Don
344022 Russian Federation
Phone: +7 (928) 179-39-87.
E-mail: sushkinaif@mail.ru

Образец цитирования:

И.Ф. Шлык, И.В. Евсегнеева, Д.Ю. Беседина, И.В. Макаrchук «Динамика профиля врожденного иммунного ответа у пациентов с ишемической болезнью сердца в различные сроки после стентирования коронарных артерий» // Медицинская иммунология, 2024. Т. 26, № 2. С. 271-280.
doi: 10.15789/1563-0625-DOT-2660

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

For citation:

I.F. Shlyk, I.V. Evsegneeva, D.Yu. Besedina, I.V. Makarchuk "Dynamics of the innate immune response profile in patients with coronary heart disease at different terms after coronary artery stenting", *Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2024, Vol. 26, no. 2, pp. 271-280.
doi: 10.15789/1563-0625-DOT-2660

© Shlyk I.F. et al., 2024
The article can be used under the Creative Commons Attribution 4.0 License
DOI: 10.15789/1563-0625-DOT-2660

на 4-5-е сутки, экспрессии TLR4 и HLA-DR — на 4-5-е и 9-10-е сутки. В позднем послеоперационном периоде, у пациентов с ИБС наблюдается значимое снижение содержания лимфоцитов: CD3⁺CD16⁺, CD16⁺Gr⁺, моноцитов: CD14⁺CD282⁺, CD14⁺CD284⁺, CD14⁺CD289⁺, активности НСТ-теста и содержания α -дефензина, а количество моноцитов, экспрессирующих HLA-DR, увеличивается.

У пациентов с ишемической болезнью сердца наблюдаются изменения в клеточном звене врожденного иммунитета, свидетельствующие о персистирующем воспалении. Динамика выявленных изменений в результате проведенного стентирования отражает лабильность оцениваемых показателей в большей степени в позднем послеоперационном периоде, что может служить основой прогнозирования исхода коронарного стентирования.

Ключевые слова: врожденный иммунитет, коронарный атеросклероз, стентирование коронарных артерий, Toll-подобные рецепторы, гранзим В, НСТ-тест

DYNAMICS OF THE INNATE IMMUNE RESPONSE PROFILE IN PATIENTS WITH CORONARY HEART DISEASE AT DIFFERENT TERMS AFTER CORONARY ARTERY STENTING

Shlyk I.F.^a, Evsegneeva I.V.^b, Besedina D.Yu.^a, Makarchuk I.V.^a

^a Rostov State Medical University, Rostov-on-Don, Russian Federation

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

Abstract. Atherosclerosis is accompanied by damage to the vascular endothelium of arteries followed by development of inflammatory response and formation of atherosclerotic plaques. Innate immunity is an important component of this response being the earliest non-specific key mechanism. Our objective was to perform a comprehensive assessment of the cellular link of innate immunity, and to compare the results obtained at various terms after coronary stenting.

The study involved 50 patients with coronary atherosclerosis (Group 1), who had clinical indications for stenting of coronary arteries, and 20 volunteers (Group 2), who have no signs of coronary artery disease. The study of immune parameters was carried out before surgery, at 4-5, 9-10 and 28-30 days after operation (during early postoperative period), as well as 6 and 12 months after stenting, i.e. over the late post-surgical period. Phenotyping of peripheral blood monocytes and lymphocytes was performed by flow cytometry using monoclonal antibodies (Beckman Coulter, USA). Intracellular content of Granzyme B was carried out with an FC500 flow laser cytofluorimeter. Metabolic activity of neutrophils was assessed by the NBT test. Alpha defensin was determined in blood plasma by ELISA technique (Hycult Biotech, USA). Statistical analysis was performed using the Statistica 12.0 program (StatSoft, USA). Statistical significance was considered significant at $p \leq 0.05$.

The numbers of natural killer cells and their activity, as well as those of monocytes, were increased in patients with coronary atherosclerosis. We have also shown a suppression of antigen presentation processes, an imbalance in microbicidal activity of neutrophils, with predominant secretion of antimicrobial peptides. Over the early post-surgical period, significant changes included only decreased content of intracellular Granzyme B on days 4-5, and expression of TLR4 and HLA-DR on days 4-5 and 9-10. During the late period, the patients with coronary artery disease exhibited a significant decrease in the content of some lymphocyte subsets: CD3⁺CD16⁺, CD16⁺Gr⁺ as well as amounts of monocytes: CD14⁺CD282⁺, CD14⁺CD284⁺, CD14⁺CD289⁺, along with NBT-test activity and α -defensin contents, and increased numbers of HLA-DR-expressing monocytes.

There are changes in cellular component of innate immunity, indicating persistent inflammation in patients with coronary heart disease. The dynamics of revealed changes following coronary artery stenting may reflect a lability of assessed indicators mostly over the late postoperative period, thus serving a basis for predicting the outcome of coronary stenting.

Keywords: innate immunity, coronary atherosclerosis, coronary artery stenting, Toll-like receptors, granzyme B, NBT test

Введение

Ишемическая болезнь сердца (ИБС), зачастую являясь проявлением коронарного атеросклероза, выступает ведущей причиной смертности среди болезней сердечно-сосудистой системы, которые в общей структуре смертности занимают более 46% [17]. И, несмотря на внедрение высокотехнологичной медицинской помощи в лечении ИБС, таких как стентирование и шунтирование коронарных артерий, этот показатель стабильно остается на высоком уровне [2]. Известно, что атеросклероз – это мультифакторное заболевание, сопровождающееся повреждением сосудистого эндотелия артерий эластического и мышечно-эластического типов разного калибра с развитием воспалительного иммунного ответа и формированием атеросклеротической бляшки [18]. Предполагается, что атеросклероз может развиваться вследствие дислипидемии, где повреждающим агентом выступают липопротеиды низкой плотности, а также наличия других факторов риска, таких как артериальная гипертензия, ожирение, сахарный диабет, вредные привычки и др. Однако объединяющим звеном здесь является повреждение эндотелия и инициация воспалительного ответа [18]. Врожденный иммунный ответ является ключевым и самым ранним неспецифическим механизмом в защите организма человека от экзогенных и эндогенных патогенов. Согласно современным представлениям, в роли эндогенных патогенов при атеросклерозе выступают окисленные липопротеиды низкой плотности, которые распознаются клетками врожденного иммунитета. В процессе распознавания происходит активация транскрипционного фактора NF-κB, который повышает экспрессию генов различных классов цитокинов, посредством чего происходит запуск специфического адаптивного иммунитета [19]. В настоящее время в литературных источниках приводятся единичные данные, которые затрудняют комплексную оценку различных компонентов врожденного иммунитета, особенно клеточного, у пациентов с коронарным атеросклерозом до проведения коронарного стентирования (КС) и после. В связи с этим **целью настоящего исследования** является комплексная оценка клеточного звена врожденного иммунного ответа и сопоставление полученных результатов в различные сроки после проведения коронарного стентирования.

Материалы и методы

Данное исследование проведено в ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет» Минздрава России в 2018-2019

году. В исследование были включены пациенты кардиохирургического отделения, лабораторная диагностика выполнялась в НИИ Иммунологии и аллергологии ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет» Минздрава России. Протокол исследования был одобрен локальным независимым этическим комитетом. В исследовании приняли участие 50 пациентов с коронарным атеросклерозом (группа 1), которым показано выполнение стентирования коронарных артерий (КС) согласно клиническим рекомендациям по ведению стабильной ишемической болезни сердца на основании данных прямой коронароангиографии. С целью оценки состояния врожденного иммунного ответа, нами обследованы 20 добровольцев (группа 2), у которых нет клинических и инструментальных признаков ИБС. Обе группы составили пациенты мужского пола, сопоставимые по возрасту ($58,01 \pm 1,5$ и $55,9 \pm 1,1$ соответственно, $p = 0,22$). Критерием исключения для группы ИБС было наличие как активных инфекционных процессов, так и в анамнезе. Не допускались к участию в исследовании лица, имеющие сахарный диабет, ревматологические и болезни соединительной ткани, онкопатологию, пациенты, имеющие вредные привычки. Исследование показателей иммунитета проводили до операции через 4-5, 9-10 и 28-30 суток, что составило ранний послеоперационный период, а также через 6 и 12 месяцев после стентирования, т. е. в позднем послеоперационном периоде. Фенотипирование моноцитов CD14⁺CD282⁺ (TLR2), CD14⁺CD284⁺ (TLR4), CD14⁺CD289⁺ (TLR9), CD14⁺HLA-DR⁺ и лимфоцитов CD3⁺CD16⁺ и CD16⁺Gr⁺ периферической крови, проводили методом проточной цитофлюориметрии с использованием моноклональных антител производства Beckman Coulter (США). Внутриклеточное содержание Гранзима В проводили на проточном лазерном цитофлюориметре FC500. Кислородзависимую метаболическую активность нейтрофилов оценивали в НСТ-тесте. Альфа-дефензин (Nucult Biotech, США) определяли в плазме крови методом ИФА. Для проведения статистического анализа использовали базовую версию компьютерной программы Statistica 12.0 (StatSoft, США). Результаты исследования представляли выборочным средним (M) вариационного ряда и стандартной ошибкой средней величины (m). Соответствие распределения вариантов изучаемых показателей нормальному закону проверяли по критерию Шапиро–Уилка. Для проверки статистической гипотезы о различии средних использовали критерий Манна–Уитни для независимых величин и критерий Вилкоксона в случае зависимых вели-

чин. Заданный параметр доверительной вероятности составил 0,05.

Результаты

Анализ полученных данных по субпопуляционному составу врожденного иммунитета у пациентов группы 1 в сопоставлении с группой здоровых обнаружил не только повышенное содержание CD3⁺CD16⁺ лимфоцитов, но и значимое усиление их цитотоксической активности по внутриклеточному содержанию Гранзима В

(CD16⁺Gr⁺). Особое внимание нацелено на повышение на моноцитах CD282⁺ и CD284⁺, увеличение в несколько раз внутриклеточной экспрессии CD289⁺, которые участвуют в распознавании различных видов патогенов, в том числе ассоциированных с повреждением собственных тканей (DAMPs). Показатель относительного содержания моноцитов – HLA-DR⁺, презентирующих антигены, был значительно ниже, чем в группе здоровых респондентов. Неоднозначные данные получены и в оценке НСТ-теста, где в группе пациентов с ИБС отражено повышение спонтан-

ТАБЛИЦА 1. СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ПОКАЗАТЕЛЕЙ ВРОЖДЕННОГО ИММУННОГО ОТВЕТА И ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ НЕЙТРОФИЛОВ У ПАЦИЕНТОВ С ИБС И ЗДОРОВЫХ ЛИЦ, M±m

TABLE 1. COMPARATIVE CHARACTERISTICS OF INNATE IMMUNE RESPONSE AND FUNCTIONAL ACTIVITY OF NEUTROPHILS IN PATIENTS WITH CORONARY ARTERY DISEASE AND HEALTHY INDIVIDUALS, M±m

Показатель Indicator	Группа 1 I group	Группа 2 II group	p
CD3 ⁺ CD16 ⁺ , %	18,6±1,4	13,2±08,0	0,007
CD16 ⁺ , 10 ⁹ /л CD16 ⁺ , 10 ⁹ /L	0,32±0,04	0,23±0,02	0,01
CD16 ⁺ Gr ⁺ , %	13,9±1,3	6,80±0,85	0,04
CD16 ⁺ Gr ⁺ , 10 ⁹ /л CD16 ⁺ Gr ⁺ , 10 ⁹ /L	0,16±0,03	0,09±0,02	0,05
CD14 ⁺ CD282 ⁺ , %	77,8±1,6	60,10±1,68	0,0001
CD14 ⁺ CD282 ⁺ , 10 ⁹ /л CD14 ⁺ CD282 ⁺ , 10 ⁹ /L	0,39±0,04	0,38±0,03	0,78
CD14 ⁺ CD284 ⁺ , %	34,0±2,2	18,3±0,6	0,02
CD14 ⁺ CD284 ⁺ , 10 ⁹ /л CD14 ⁺ CD284 ⁺ , 10 ⁹ /L	0,11±0,02	0,12±0,01	0,06
CD14 ⁺ CD289 ⁺ , %	79,90±2,27	8,60±0,75	0,0001
CD14 ⁺ CD289 ⁺ , 10 ⁹ /л CD14 ⁺ CD289 ⁺ , 10 ⁹ /L	0,36±0,04	0,14±0,02	0,0001
CD14 ⁺ HLA-DR ⁺ , %	65,2±1,5	86,80±0,32	0,0001
CD14 ⁺ HLA-DR ⁺ , 10 ⁹ /л CD14 ⁺ HLA-DR ⁺ , 10 ⁹ /L	0,31±0,02	0,69±0,01	0,05
НСТ сп., у. е. NBT sp., c. u.	96,80±2,24	89,2±2,1	0,01
НСТ ст., у. е. NBT st., c. u.	158,00±3,59	188,0±2,3	0,001
Кст. НСТ Kst. NBT	1,73±0,02	2,09±0,02	0,02
α-дефензин, пг/мл α-defensin, pg/mL	2527,0±145,0	198,6±13,1	0,00001

Примечание. Уровень статистической значимости принимался при значении p ≤ 0,05.

Note. The level of statistical significance was taken at p ≤ 0.05.

ной нейтрофильной активности при снижении стимулированной и меньшие значения коэффициента стимуляции. Стоит отметить, что плазменный уровень α -дефензина на порядок превышает контрольные значения (табл. 1).

Таким образом, у пациентов с ишемической болезнью сердца наблюдается повышение количества натуральных киллеров и их функцио-

нальной активности, моноцитов участвующих в распознавании патогенов, угнетение процессов презентации антигенов, дисбаланс в микробицидной активности нейтрофилов с преобладанием секреции антимикробных пептидов.

После проведения коронарного стентирования в динамике наблюдения существенного изменения количества НК-клеток не выявлено,

ТАБЛИЦА 2. ДИНАМИКА ПОКАЗАТЕЛЕЙ ВРОЖДЕННОГО ИММУННОГО ОТВЕТА И ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ НЕЙТРОФИЛОВ У ПАЦИЕНТОВ С ИБС В РАННЕМ ПОСЛЕОПЕРАЦИОННОМ ПЕРИОДЕ, $M \pm m$

TABLE 2. DYNAMICS OF INNATE IMMUNE RESPONSE AND FUNCTIONAL ACTIVITY OF NEUTROPHILS IN PATIENTS WITH CORONARY ARTERY DISEASE IN THE EARLY POSTOPERATIVE PERIOD, $M \pm m$

Показатель Indicator	Исходные данные Initial data	4-5-е сутки 4 th -5 th days	9-10-е сутки 9 th -10 th days	28-30-е сутки 28 th -30 th days	p
CD3 ⁺ CD16 ⁺ , %	18,6±1,4	16,6±1,0	19,9±1,8	21,2±1,6	1 – 0,3; 2 – 0,6; 3 – 0,2
CD16 ⁺ , 10 ⁹ /л CD16 ⁺ , 10 ⁹ /L	0,32±0,04	0,28±0,03	0,40±0,06	0,39±0,04	1 – 0,4; 2 – 0,3; 3 – 0,2
CD16 ⁺ Gr ⁺ , %	13,9±1,3	6,0±0,9	13,2±1,7	13,8±1,5	1 – 0,001; 2 – 0,7; 3 – 0,9
CD16 ⁺ Gr ⁺ , 10 ⁹ /л CD16 ⁺ Gr ⁺ , 10 ⁹ /L	0,19±0,03	0,95±0,13	0,20±0,03	0,25±0,03	1 – 0,5; 2 – 0,4; 3 – 0,06
CD14 ⁺ CD282 ⁺ , %	77,8±1,6	78,6±1,7	82,3±1,2	78,0±1,3	1 – 0,7; 2 – 0,1; 3 – 0,9
CD14 ⁺ CD282 ⁺ , 10 ⁹ /л CD14 ⁺ CD282 ⁺ , 10 ⁹ /L	0,39±0,04	0,40±0,04	0,43±0,06	0,35±0,04	1 – 0,8; 2 – 0,5; 3 – 0,4
CD14 ⁺ CD284 ⁺ , %	34,0±2,2	22,0±4,5	20,5±2,9	27,6±2,9	1 – 0,01; 2 – 0,02; 3 – 0,09
CD14 ⁺ CD284 ⁺ , 10 ⁹ /л CD14 ⁺ CD284 ⁺ , 10 ⁹ /L	0,11±0,02	0,10±0,04	0,09±0,05	0,13±0,12	1 – 0,8; 2 – 0,5; 3 – 0,9
CD14 ⁺ CD289 ⁺ , %	79,90±2,27	75,30±3,32	75,30±2,03	84,10±2,14	1 – 0,2; 2 – 0,2; 3 – 0,2
CD14 ⁺ CD289 ⁺ , 10 ⁹ /л CD14 ⁺ CD289 ⁺ , 10 ⁹ /L	0,36±0,04	0,27±0,05	0,40±0,05	0,29±0,03	1 – 0,1; 2 – 0,6; 3 – 0,2
CD14+HLA DR ⁺ , %	65,2±1,5	54,8±1,8	55,2±1,4	59,0±1,4	1 – 0,01; 2 – 0,03; 3 – 0,4
CD14+HLA-DR ⁺ , 10 ⁹ /л CD14+HLA-DR ⁺ , 10 ⁹ /L	0,31±0,02	0,20±0,05	0,30±0,02	0,30±0,01	1 – 0,08; 2 – 0,09; 3 – 0,1
НСТ сп., у. е. NBT sp., c. u.	96,80±2,24	97,20±1,83	103,00±3,58	98,10±2,54	1 – 0,7; 2 – 0,1; 3 – 0,5
НСТ ст., у. е. NBT st., c. u.	158,00±3,59	165,00±4,51	167,00±3,24	162,00±3,61	1 – 0,2; 2 – 0,2; 3 – 0,5
Кст. НСТ Kst. NBT	1,73±0,02	1,69±0,02	1,62±0,03	1,66±0,02	1 – 0,2; 2 – 0,4; 3 – 0,9
α -дефензин, пг/мл α -defensin, pg/mL	2527,0±145,0	3427,0±371,0	2751,0±491,0	1806,0±187,0	1 – 0,08; 2 – 0,7; 3 – 0,07

Примечание. Уровень статистической значимости принимался при значении $p \leq 0,05$. 1 – сравнение показателя до операции и через 4-5 суток; 2 – сравнение показателя до операции и через 9-10 суток; 3 – сравнение показателя до операции и через 28-30 суток.

Note. The level of statistical significance was taken at $p \leq 0.05$. 1, comparison of the indicator before the operation and after 4-5 days; 2, comparison of the indicator before the operation and after 9-10 days; 3, comparison of the indicator before the operation and after 28-30 days.

ТАБЛИЦА 3. ДИНАМИКА ПОКАЗАТЕЛЕЙ ВРОЖДЕННОГО ИММУННОГО ОТВЕТА И ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ НЕЙТРОФИЛОВ У ПАЦИЕНТОВ С ИБС В ПОЗДНЕМ ПОСЛЕОПЕРАЦИОННОМ ПЕРИОДЕ, M±m

TABLE 3. DYNAMICS OF INNATE IMMUNE RESPONSE AND FUNCTIONAL ACTIVITY OF NEUTROPHILS IN PATIENTS WITH CORONARY ARTERY DISEASE IN THE LATE POSTOPERATIVE PERIOD, M±m

Показатель Indicator	Исходные данные Initial data	Через 6 месяцев In 6 months	Через 12 месяцев In 12 months	p
CD3 ⁺ CD16 ⁺ , %	18,6±1,4	17,8±1,4	15,6±0,9	1 – 0,1; 2 – 0,05
CD16 ⁺ , 10 ⁹ /л CD16 ⁺ , 10 ⁹ /L	0,32±0,04	0,31±0,04	0,32±0,08	1 – 0,5; 2 – 0,5
CD16 ⁺ Gr ⁺ , %	13,9±1,3	10,8±0,8	8,3±0,7	1 – 0,4; 2 – 0,04
CD16 ⁺ Gr ⁺ , 10 ⁹ /л CD16 ⁺ Gr ⁺ , 10 ⁹ /L	0,16±0,03	0,30±0,01	0,20±0,04	1 – 0,1; 2 – 0,4
CD14 ⁺ CD282 ⁺ , %	77,8±1,6	72,0±1,3	67,5±1,5	1 – 0,05; 2 – 0,001
CD14 ⁺ CD282 ⁺ , 10 ⁹ /л CD14 ⁺ CD282 ⁺ , 10 ⁹ /L	0,39±0,04	0,40±0,03	0,30±0,02	1 – 0,04; 2 – 0,3
CD14 ⁺ CD284 ⁺ , %	34,0±2,2	18,8±1,8	18,2±1,5	1 – 0,02; 2 – 0,04
CD14 ⁺ CD284 ⁺ , 10 ⁹ /л CD14 ⁺ CD284 ⁺ , 10 ⁹ /L	0,11±0,02	0,10±0,02	0,20±0,04	1 – 0,3; 2 – 0,09
CD14 ⁺ CD289 ⁺ , %	79,90±2,27	43,5±1,4	39,8±2,1	1 – 0,05; 2 – 0,04
CD14 ⁺ CD289 ⁺ , 10 ⁹ /л CD14 ⁺ CD289 ⁺ , 10 ⁹ /L	0,36±0,04	0,30±0,04	0,20±0,03	1 – 0,9; 2 – 0,4
CD14 ⁺ HLA-DR ⁺ , %	65,2±1,5	75,8±2,4	80,1±1,8	1 – 0,009; 2 – 0,002
CD14 ⁺ HLA-DR ⁺ , 10 ⁹ /л CD14 ⁺ HLA-DR ⁺ , 10 ⁹ /L	0,31±0,02	0,50±0,02	0,60±0,01	1 – 0,01; 2 – 0,003
НСТ сп., у. е. NBT sp., c. u.	96,80±2,24	95,2±2,2	90,6±2,4	1 – 0,4; 2 – 0,03
НСТ ст., у. е. NBT st., c. u.	158,00±3,59	160,8±3,4	149,9±3,8	1 – 0,9; 2 – 0,04
Кст. НСТ Kst. NBT	1,73±0,02	1,60±0,01	1,60±0,02	1 – 0,1; 2 – 0,4
α-дефензин, пг/мл α-defensin, pg/mL	2527,0±145,0	1433,0±138,8	1571,0±178,0	1 – 0,002; 2 – 0,05

Примечание. Уровень статистической значимости принимался при значении $p \leq 0,05$. 1 – сравнение показателя до операции и через 6 мес.; 2 – сравнение показателя до операции и через 1 год.

Note. The level of statistical significance was taken at $p \leq 0.05$. 1, comparison of the indicator before surgery and after 6 months; 2, comparison of the indicator before the operation and after 1 year.

однако обращает внимание значимое транзитное снижение содержания внутриклеточного Гранзима В на 4-5-е сутки после вмешательства. Отсутствовала статистически значимая динамика в экспрессии TLR2 и TLR9, в то время как содержание моноцитов, несущих на своей мембране CD284⁺ и HLA-DR⁺, значительно снижалось, начиная с 4-5-х суток, и, сохраняя данную тенденцию, на 28-30-е сутки не отличалось от исходных данных. Микробицидная активность нейтрофилов

значимо, в динамике наблюдения, не отличалась. В содержании плазменного α-дефензина хоть и намечалась тенденция к повышению, но не достигала уровня значимости с возвратом к исходным значениям к 9-10-м суткам (табл. 2).

Таким образом, в раннем послеоперационном периоде значимые изменения субпопуляционного состава и функциональной активности клеток врожденного иммунитета коснулись лишь значимого снижения содержания внутриклеточного

Гранзима В на 4-5-е сутки, экспрессии TLR4 и HLA-DR – на 4-5-е и 9-10-е сутки.

У пациентов с ИБС в позднем послеоперационном периоде через 1 год после КС отмечается значимое снижение содержания CD3⁺CD16⁺ лимфоцитов и их цитолитической активности. Более того, отмечено постоянство в содержании CD16⁺ лимфоцитов и их цитотоксической активности, а также значимой динамикой экспрессии Toll-подобных рецепторов. Относительно оценки паттерн-распознающих рецепторов, отмечено достоверное снижение моноцитов экспрессирующих на своей мембране и внутриклеточно CD282⁺, CD284⁺, CD289⁺ начиная с 6 месяцев наблюдения. Противоположная картина наблюдается в экспрессии HLA-DR, где количество моноцитов с данным рецептором повышалось как через полгода, так и через 12 месяцев. В нейтрофильном звене через год после стентирования выявлено подавление кислородзависимой способности нейтрофилов, отражающееся в уменьшении значений НСТ сп. и НСТ ст. теста. Обращает внимание, супрессия антимикробной активности за счет значительного уменьшения продукции α-дефензина через полгода и 12 месяцев после КС (табл. 3).

На основании динамики показателей в позднем послеоперационном периоде, можно заключить, что у пациентов, перенесших КС, наблюдается значимое снижение содержания лимфоцитов: CD3⁺CD16⁺, CD16⁺Gr⁺, моноцитов: CD14⁺CD282⁺, CD14⁺CD284⁺, CD14⁺CD289⁺, активности НСТ-теста и содержания α-дефензина в плазме крови. В динамике количества моноцитов экспрессирующих HLA-DR, отмечается их увеличение.

Обсуждение

В нашей работе, говоря об атерогенной этиологии ИБС, не вызывает сомнений дисрегуляция врожденного иммунного ответа. При исследовании CD16⁺ лимфоцитов выявлено повышение их цитолитической функции, оцененной по Гранзиме В. В ранее проведенных исследованиях, где отмечается повышение циркулирующих CD16⁺ лимфоцитов и их гранзимз-ависимой цитотоксической активности у пациентов со стабильной стенокардией [1, 5] выявлено их снижение у пациентов с инфарктом миокарда, что предположительно связано с привлечением CD3⁺CD16⁺ в зону нестабильной атеросклеротической бляшки [6, 13]. При взаимодействии с NKG2-D (интегральный мембранный белок), который в большом количестве экспрессируется макрофагами, инициируется активация CD16⁺ лимфоцитов у пациентов с атеросклерозом, при их взаимо-

действии с окисленными ЛПНП, что позволяет реализовать цитолитический потенциал по перфорин-гранзимному типу как в кровотоке, так и непосредственно в атеросклеротической бляшке [22].

Увеличение количественного показателя моноцитов периферической крови, экспрессирующих PRR (паттернраспознающие рецепторы), является свидетельством изменений на этапе первичного распознавания образов системой, за счет повышения межклеточного контакта через CD14⁺CD282⁺, CD14⁺CD284⁺, CD14⁺CD289⁺. При гипоксии происходит высвобождение протеина, родственного белку теплового шока 70 (HSC70), который выступает в роли патогена, ассоциированного с опасностью, и усиливает передачу сигналов через Toll-подобные рецепторы. В результате данного взаимодействия, усиливается выработка провоспалительных цитокинов, запускающих воспалительный процесс [4]. Известно, что повышение CD14⁺CD289⁺ связано с активацией сосудистого и тромбоцитарного звеньев гемостаза, где, как и CD14⁺CD282⁺, так и CD14⁺CD284⁺ являются функционально активными рецепторами тромбоцитов [4, 14]. Однако в настоящий момент появляются данные о взаимосвязи этого процесса с повышенным уровнем окисленных ЛПНП [14].

При анализе нейтрофильного звена, нами выявлена дискоординация секреторной способности нейтрофилов. Эта субпопуляция клеток, выстраивающая первичную защиту, активно участвует на всех этапах атерогенеза. Первоначально, на этапе формирования бляшек, они мигрируют в зону поражения. Целенаправленное привлечение нейтрофилов осуществляется за счет высвобождения биологически активных веществ – хемокинов, которые могут образовываться при нарушении функции эндотелия [20]. Нейтрофилы индуцируют перекисное окисление липидов, в результате которого АФК окисляют ЛПНП, активируя в дальнейшем фагоцитарный компонент иммунитета. Результаты, полученные в ходе данного исследования, констатируют возрастание степени активации O₂-зависимой антимикробной активности нейтрофилов, при уменьшении функциональных возможностей этой активности и согласуется с результатами ранее проведенных исследований [20]. По отношению к уровню α-дефензина в плазме крови, в разы повышенного по сравнению с группой контроля, можно высказать предположение, основанное на некоторых результатах исследователей, что это связано с длительностью существования атеросклероза [8].

Стентирование артерий коронарного русла является миниинвазивной процедурой, и основная роль отводится локальному воспалению, которое может развиваться в результате имплантации стента, на образующие его компоненты, в том числе и антипролиферативный субстрат [3, 10]. Когда происходит расширение (раздувание) баллона, возможно нанесение баротравмы интимальной стенке сосуда, где можно ожидать в последствие неоинтимальную гиперплазию, а также геморрагии в стенку артерии и атеросклеротическую бляшку, острое эндотелиальное повреждение и манифестацию воспаления в зоне установки коронарного стента [15].

В связи с этим не менее интересным является изменение содержания CD16⁺ лимфоцитов и их цитотоксической активности, показывающая одномоментное снижение субпопуляции натуральных киллеров и содержания в них гранзима В через 12 месяцев после КС. Транзиторное снижение внутриклеточного гранзима В на 9-10-е сутки, возможно, связано с иммуносупрессивным влиянием цитостатика. Снижение CD16⁺ лимфоцитов и их функции в позднем периоде, возможно, могут быть ассоциированы с перемещением данных клеток в место имплантации коронарного стента, при наблюдаемом уменьшении в общем кровотоке [21]. По данным проведенной работы, содержание моноцитов с рецепторами CD282⁺, CD289⁺ на своей мембране и внутриклеточно оставались на достаточно высоком уровне в течение первого месяца после КС. Данный факт предположительно связан с окисленными ЛПНП и экзогенными (полимер коронарного стента) молекулами, что и приводит к активации экспрессии рецепторов первичного распознавания антигенов. Временное снижение TLR4 на 4-5-е и 9-10-е сутки и значимым уменьшением моноцитов, экспрессирующих TLR2, TLR4 и TLR9 в поздние сроки, возможно, связано с липидкоррекцией, подавляющей различные функции моноцитов [7]. Обращает

внимание еще одна функция моноцитов, обусловленная рецептором HLA-DR, которая была снижена исходно, а также в раннем и позднем периоде по КС. По данным литературы, этот факт обусловлен эффектом постоперационной иммуносупрессии [11]. При проведении КС в месте установки стента идентифицируются комплексы из нейтрофилов и тромбоцитов и, как оказывается, являются стимуляторами высвобождения α -дефензина из азурофильных гранул нейтрофилов. Для α -дефензина выявлены агонистические свойства, по отношению к тромбоцитам, заключающиеся в индукции связывания фибриногена и тромбоспондина 1, дегрануляции секреторных гранул и апоптозе тромбоцитов [12]. Нами установлено, что у пациентов с ИБС исходно определен высокий уровень α -дефензина не только до КС, но и в раннем послеоперационном периоде, что, возможно, отражает более значимое нейтрофильное воспаление в ответ на КС. Через полгода и год наблюдается отчетливая динамика в снижении α -дефензина, что, возможно, является результатом назначения двойной антитромбоцитарной терапии, т. к. α -дефензин является индуктором АДФ-ассоциированной агрегации тромбоцитов и является маркером угнетения нейтрофильного воспаления [9].

Заключение

Таким образом, у пациентов с ишемической болезнью сердца наблюдаются изменения в популяционном составе клеточного иммунитета, свидетельствующие о персистирующем воспалении. Динамика выявленных изменений в результате проведенного стентирования отражает лабильность оцениваемых показателей в большей степени в позднем послеоперационном периоде, что может лечь в основу прогнозирования исхода коронарного стентирования.

Список литературы / References

1. Гольдерова А.С., Николаева И.Н., Романова А.Н., Козлов В.А. Фенотипическая характеристика лимфоцитов периферической крови при коронарном и мультифокальном атеросклерозе // Бюллетень СО РАМН, 2011. Т. 31, № 3. С. 27-31. [Golderova, A.S., Nikolaeva I.N., Romanova A.N., Kozlov V.A. Phenotypic characteristics of peripheral blood lymphocytes in coronary and multifocal atherosclerosis. *Byulleten SO RAMN = Bulletin of the SB RAMS*, 2011, Vol. 31, no. 3, pp. 27-31. (In Russ.)]
2. Здравоохранение в России. Под ред. Смелова П.А., Никитиной С.Ю., Агеевой Л.И., Александрова Г.А., Голубева Н.А., Кириллова Г.Н., Огрызко Е.В., Оськов Ю.И., Нам П.Д., Харькова Т.Л., Чумарина В.Ж. М.: Росстат, 2021. 171 с. [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://rosstat.gov.ru/storage/mediabank/>

Zdravoohran-2021.pdf. [Smelova P.A., Nikitina S.Ju., Ageeva L.I., Aleksandrova G.A., Golubeva N.A., Kirillova G.N., Ogryzko E.V., Oskov Yu.I., Nam P.D., Kharkova T.L., Chumarina V.Zh. Healthcare in Russia]. Moscow: Rosstat, 2021. 171 p. [Electronic resource]. Access mode: <https://rosstat.gov.ru/storage/mediabank/Zdravoohran-2021.pdf>.

3. Сизякина Л.П., Шлык И.Ф., Сидоров Р.В., Шлык С.В. Характеристика клеточного звена врожденного иммунитета у пациентов, перенесших коронарное стентирование // Иммунология, 2018. Т. 39, № 1. С. 16-19. [Sizaykina L.P., Shlyk I.F., Sidorov R.V., Shlyk S.V. Characteristics of the cellular link of innate immunity in patients undergoing coronary stenting. *Immunologiya = Immunologiya*, 2018, Vol. 39, no. 1, pp. 16-19.

4. Andonegui G., Kerfoot S.M., McNagny K., Ebbert K.V., Patel K.D., Kubes P. Platelets express functional Toll-like receptor-4. *Blood*, 2005, Vol. 106, no. 7, pp. 2417-2423.

5. Backteman K., Andersson C., Dahlin G., Ernerudh J., Jonasson L. Lymphocyte subpopulations in lymph nodes and peripheral blood: a comparison between patients with stable angina and acute coronary syndrome. *PLoS One*, 2012, Vol. 7, no. 3, e32691. doi: 10.1371/journal.pone.0032691.

6. Backteman K., Ernerudh J., Jonasson L. Natural killer (NK) cell deficit in coronary artery disease: no aberrations in phenotype but sustained reduction of NK cells is associated with low-grade inflammation. *Clin. Exp. Immunol.*, 2014, Vol. 175, no. 1, pp. 104-112.

7. Bahrami A., Parsamanesh N., Atkin S.L., Banach M., Sahebkar A. Effect of statins on toll-like receptors: a new insight to pleiotropic effects. *Pharmacol. Res.*, 2018, no. 135, pp. 230-238.

8. Barnathan E.S., Raghuna P.N., Tomaszewski J.E., Ganz T., Cines D.B., Higazi A. al-R. Immunohistochemical localization of defensin in human coronary vessels. *Am. J. Pathol.*, 1997, no. 150, pp. 1009-1020.

9. Bonello L., Pansieri M., Mancini J., Bonello R., Maillard L., Barnay P., Rossi P., Ait-Mokhtar O., Jouve B., Collet F., Peyre J.P., Wittenberg O., de Labriolle A., Camilleri E., Cheneau E., Cabassome E., Dignat-George F., Camoin-Jau L., Paganelli F. High on-treatment platelet reactivity after prasugrel loading dose and cardiovascular events after percutaneous coronary intervention in acute coronary syndromes. *J. Am. Coll. Cardiol.*, 2011, no. 58, pp. 467-473.

10. Chaabane C., Otsuka E., Virmani R., Bochaton-Piallat M.-L. Biological responses in stented arteries. *Cardiovasc. Res.*, 2013, Vol. 99, no. 2, pp. 353-363.

11. DeSart K., O'Malley K., Schmit B., Lopez M.-C., Moldawer L., Baker H., Berceci S., Nelson P. Systemic inflammation as a predictor of clinical outcomes after lower extremity angioplasty/stenting. *J. Vasc. Surg.*, 2016, Vol. 64, no. 3, pp. 766-778.

12. Horn M., Bertling A., Brodde M.F., Müller A., Roth J., van Aken H., Jurk K., Heilmann C., Peters G., Kehrel B.E. Human neutrophil alpha-defensins induced formation of fibrinogen and thrombospondin-1 amyloid-like structures and activate platelets via glycoprotein IIb/IIIa. *J. Thromb. Haemost.*, 2012, no. 10, pp. 647-661.

13. Jabir N.R., Firoz C.K., Ahmed F., Kamal M.A., Hindawi S., Damanhoury G.A., Almehdar H.A., Tabrez S. Reduction in CD16/CD56 and CD16/CD3/CD56 natural killer cells in coronary artery disease. *Immunol. Invest.*, 2017, Vol. 46, no. 5, pp. 526-535.

14. Knuefermann P., Schwederski M., Velten M., Krings P., Ehrentraut H., Rüdiger M., Boehm O., Fink K., Dreiner U., Grohé C., Hoefl A., Baumgarten G., Koch A., Zacharowski K., Meyer R. Bacterial DNA induces myocardial inflammation and reduces cardiomyocyte contractility: role of toll-like receptor 9. *Cardiovasc. Res.*, 2008, Vol. 78, no. 1, pp. 26-35.

15. Lavin B., Gómez M., Pello O.M., Castejon B., Piedras M.J., Saura M., Zaragoza C. Nitric oxide prevents aortic neointimal hyperplasia by controlling macrophage polarization. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 2014, Vol. 34, no. 8, pp. 1739-1746.

16. Libby P., Buring J.E., Badimon L., Hansson G.K., Deanfield J., Bittencourt M.S., Tokgözoğlu L., Lewis E.F. Atherosclerosis. *Nat. Rev. Dis. Primers*, 2019, Vol. 5, no. 56, pp. 1-18.

17. Marzilli M., Merz C., Boden W.E., Bonow R.O., Capozza P.G., Chilian W.M., DeMaria A.N., Guarini G., Huqi A., Morrone D., Patel M.R., Weintraub W.S. Obstructive coronary atherosclerosis and ischemic heart disease: an elusive link. *Ration. Pharmacother. Cardiol.*, 2012, Vol. 8, no. 5, pp. 721-726.

18. Miteva K., Madonna R., de Caterina R., van Linthout S. Innate and adaptive immunity in atherosclerosis. *Vascul. Pharmacol.*, 2018, Vol. 107, no. 108, pp. 67-77.

19. Parsamanesh N., Moossavi M., Bahrami A., Fereidouni M., Barreto G., Sahebkar A. NLRP3 inflammasome as a treatment target in atherosclerosis: A focus on statin therapy. *Int. Immunopharmacol.*, 2019, no. 73, pp. 146-155

20. Pende A., Artom N., Bertolotto M., Montecucco F., Dallegri F. Role of neutrophils in atherogenesis: an update. *Eur. J. Clin. Invest.*, 2016, Vol. 46, no. 3, no. 252-263.

21. Selathurai A., Deswaerte V., Kanellakis P., Tipping P., Toh B.-H., Bobik A., Kyaw T. Natural killer (NK) cells augment atherosclerosis by cytotoxic-dependent mechanisms. *Cardiovasc. Res.*, 2014, Vol. 102, no. 1, pp. 128-137.

22. Xia M., Guerra N., Sukhova G.K., Yang K., Miller C.K., Shi G.-P., Raulet D.H., Xiong N. Immune activation resulting from NKG2D/ligand interaction promotes atherosclerosis. *Circulation.*, 2011, Vol. 124, no. 25, pp. 2933-2943.

Авторы:

Шлык И.Ф. — д.м.н., доцент, профессор кафедры клинической иммунологии и аллергологии ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Ростов-на-Дону, Россия

Евсегнеева И.В. — д.м.н., профессор кафедры клинической иммунологии и аллергологии ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Министерства здравоохранения РФ (Сеченовский университет), Москва, Россия

Беседина Д.Ю. — ординатор кафедры терапии ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Ростов-на-Дону, Россия

Макарчук И.В. — студентка 6-го курса лечебно-профилактического факультета ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Ростов-на-Дону, Россия

Authors:

Shlyk I.F., PhD, MD (Medicine), Associate Professor, Professor, Department of Clinical Immunology and Allergology, Rostov State Medical University, Rostov-on-Don, Russian Federation

Evsegneeva I.V., PhD, MD (Medicine), Professor, Department of Clinical Immunology and Allergology, I. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russian Federation

Besedina D. Yu., Resident, Department of Therapy, Rostov State Medical University, Rostov-on-Don, Russian Federation

Makarchuk I.V., 6th year Student, Faculty of Preventive Medicine, Rostov State Medical University, Rostov-on-Don, Russian Federation

Поступила 23.02.2023
Принята к печати 13.03.2023

Received 23.02.2023
Accepted 13.03.2023

ИММУНОГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ДОНОРОВ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ СТЕЛОВЫХ КЛЕТОК, ЯВЛЯЮЩИХСЯ ПРЕДСТАВИТЕЛЯМИ НАИБОЛЕЕ МНОГОЧИСЛЕННЫХ ЭТНИЧЕСКИХ ГРУПП РОССИИ

Кузьмич Е.В.¹, Павлова И.Е.¹, Беляева Е.В.¹, Бубнова Л.Н.^{1, 2}

¹ ФГБУ «Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии Федерального медико-биологического агентства», Санкт-Петербург, Россия

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

Резюме. Формирование критериев подбора оптимального донора на основе анализа результатов алло-ТГСК, использование методов высокоразрешающего HLA-типирования для обследования донора и реципиента способствовали снижению частоты развития иммунологических осложнений, прежде всего острой реакции «трансплантат против хозяина» тяжелой степени. Однако вследствие выраженного аллельного полиморфизма генов главного комплекса гистосовместимости для ряда пациентов поиск оптимального донора оказывается неэффективным. Для повышения шансов подбора донора пациентам с редкими HLA-генотипами регистры доноров гемопоэтических стволовых клеток привлекают в свой состав представителей разных национальностей. Увеличение числа доноров из различных этнических групп способствует большему иммуногенетическому разнообразию донорской когорты. В настоящее время в регистре доноров гемопоэтических стволовых клеток ФГБУ РосНИИГТ ФМБА России представители 49 национальностей, большинство из которых, согласно самоопределению, относят себя к русским. Третьей по численности этнической группой регистра являются татары. Цель настоящего исследования – сравнительный анализ иммуногенетических характеристик потенциальных доноров гемопоэтических стволовых клеток регистра, самоопределившихся как русские и татары. В результате исследования значимые различия частот групп HLA-аллелей в сравниваемых группах не установлены, отмечена тенденция к большей частоте группы *HLA-B*27* у обследованных представителей татарской национальности. Однако в распределении HLA-гаплотипов у русских и татар установлены значимые различия. Наиболее распространенным HLA-гаплотипом у татар являлся *A*02-B*44-DRB1*07*, значительно реже встречающийся у русских (4,61% против

Адрес для переписки:

Кузьмич Елена Витальевна
ФГБУ «Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии Федерального медико-биологического агентства»
191024, Россия, Санкт-Петербург,
ул. 2-я Советская, 16.
Тел.: 8 (921) 912-52-07.
E-mail: yelenakuzmich@gmail.com

Address for correspondence:

Elena V. Kuzmich
Russian Research Institute of Hematology
and Transfusiology
16 2nd Sovetskaya St
St. Petersburg
191024 Russian Federation
Phone: +7 (921) 912-52-07.
E-mail: yelenakuzmich@gmail.com

Образец цитирования:

Е.В. Кузьмич, И.Е. Павлова, Е.В. Беляева, Л.Н. Бубнова «Имуногенетическая характеристика доноров гемопоэтических стволовых клеток, являющихся представителями наиболее многочисленных этнических групп России» // Медицинская иммунология, 2024. Т. 26, № 2. С. 281-290. doi: 10.15789/1563-0625-ICO-2657
© Кузьмич Е.В. и соавт., 2024
Эта статья распространяется по лицензии Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

E.V. Kuzmich, I.E. Pavlova, E.V. Belyaeva, L.N. Bubnova “Immunogenetic characteristics of hematopoietic stem cell donors representing the most numerous ethnic groups in Russia”, *Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2024, Vol. 26, no. 2, pp. 281-290. doi: 10.15789/1563-0625-ICO-2657
© Kuzmich E.V. et al., 2024
The article can be used under the Creative Commons Attribution 4.0 License
DOI: 10.15789/1563-0625-ICO-2657

0,55%, $p = 0,002$). HLA-гаплотип $A^*03-B^*13-DRB1^*07$, принадлежащий к числу десяти наиболее распространенных у татар, достоверно реже определялся у русских (1,62% против 0,08%, $p = 0,026$). HLA-гаплотип $A^*03-B^*08-DRB1^*03$ также значительно чаще встречался у татар по сравнению с русскими (1,42% против 0,06%, $p = 0,026$). HLA-гаплотипы $A^*02-B^*18-DRB1^*11$, $A^*02-B^*15-DRB1^*04$, $A^*02-B^*15-DRB1^*13$, представленные у русских с частотой более 1%, не были определены у обследованных татар. HLA-гаплотипы $A^*31-B^*58-DRB1^*04$, $A^*24-B^*44-DRB1^*01$, представленные у татар с частотой более 1%, не были выявлены у русских. Результаты выполненного исследования свидетельствуют о целесообразности привлечения в состав регистра большего числа представителей этнической группы татар, что повысит иммуногенетическое разнообразие донорского пула и, как следствие, увеличит шансы на подбор совместимого неродственного донора для пациентов с HLA-гаплотипами, которые в настоящее время не представлены достаточно широко в нашем регистре.

Ключевые слова: гемопоэтические стволовые клетки, потенциальный донор, регистр доноров, русские, татары, HLA-гаплотипы, HLA-гены

IMMUNOGENETIC CHARACTERISTICS OF HEMATOPOIETIC STEM CELL DONORS REPRESENTING THE MOST NUMEROUS ETHNIC GROUPS IN RUSSIA

Kuzmich E.V.^a, Pavlova I.E.^a, Belyaeva E.V.^a, Bubnova L.N.^{a, b}

^a Russian Research Institute of Haematology and Transfusiology, St. Petersburg, Russian Federation

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

Abstract. Development of criteria for the optimal donor selection based on the analysis of the allo-HSCT results, high-resolution HLA typing for the donor and recipient resulted in decreased incidence of immunological complications, primarily an acute «graft-versus-host reaction». However, due to the pronounced allelic polymorphism of the main histocompatibility complex (MHC) genes, the search for an optimal donor is ineffective in a number of patients. To increase the chances of selecting a donor for patients with rare HLA genotypes, the hematopoietic stem cell donor registries recruit the persons of various nationalities. An increased number of donors from different ethnic groups provide a broader immunogenetic diversity of the donor cohort. Currently, the registry of hematopoietic stem cell donors at the Russian Research Institute of Hematology and Transfusiology includes representatives of 49 nationalities, most of which, are considered themselves Russians. The third largest ethnic group in the registry comprises Tatars. The purpose of this study is a comparative analysis of immunogenetic characteristics of potential hematopoietic stem cells donors in the registry, who have self-identified as Russians and Tatars. As a result of the study, we have not found significant differences in frequencies of HLA allelic groups in the compared cohorts, a trend for higher frequency of the *HLA-B*27* group was noted in Tatars. However, significant differences have been revealed for the distribution of HLA haplotypes in Russians and Tatars. The most common HLA haplotype among Tatars was $A^*02-B^*44-DRB1^*07$, being much less common in Russians (4.61% vs 0.55%, $p = 0.002$). HLA haplotype $A^*03-B^*13-DRB1^*07$, belonging to the ten most common among Tatars, was significantly less frequently detected in Russians (1.62% vs 0.08%, $p = 0.026$). HLA haplotype $A^*03-B^*08-DRB1^*03$ was also significantly more common in Tatars compared to Russians (1.42% vs 0.06%, $p = 0.026$). HLA haplotypes $A^*02-B^*18-DRB1^*11$, $A^*02-B^*15-DRB1^*04$, $A^*02-B^*15-DRB1^*13$, presented in Russians at a frequency of $> 1\%$, were not determined among the tested Tatars. HLA haplotypes $A^*31-B^*58-DRB1^*04$, $A^*24-B^*44-DRB1^*01$, presented in Tatars at a frequency of $> 1\%$, were not detectable in Russians. The results of our study indicate a need for recruiting more representatives of the Tatar ethnicity to the registry, thus increasing immunogenetic diversity of the donor pool and resulting into increased chances of compatible unrelated donor selection for the patients with HLA haplotypes, which are now underrepresented in our registry.

Keywords: hematopoietic stem cells, potential donor, donors register, Russians, Tatars, HLA haplotypes, HLA genes

Введение

Риск развития иммунологических осложнений, прежде всего острой реакции «трансплантат против хозяина» тяжелой степени, остается основным барьером для проведения аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (алло-ТГСК) [9]. Формирование критериев подбора оптимального донора на основе анализа исходов алло-ТГСК, использование методов высокоразрешающего HLA-типирования для обследования донора и реципиента способствовали снижению частоты развития осложнений [12]. Тем не менее вследствие выраженного аллельного полиморфизма генов главного комплекса гистосовместимости, для ряда пациентов, которым необходимо проведение алло-ТГСК, поиск оптимального донора ГСК оказывается неэффективным. Для повышения шансов подбора донора пациентам с нераспространенными HLA-генотипами регистры доноров гемопоэтических стволовых клеток привлекают в свой состав представителей различных этнических групп, что способствует расширению иммуногенетического разнообразия донорского пула. Это особенно важно для Российской Федерации, являющейся многонациональным государством, объединяющим около 147 миллионов жителей более чем 180 национальностей [2].

В настоящее время в состав регистра доноров гемопоэтических стволовых клеток ФГБУ РосНИИГТ ФМБА России привлечены представители 49 национальностей, большинство из которых, согласно самоопределению, относят себя к русским. Татары являются третьей по численности этнической группой регистра.

Татары — крупный тюркоязычный этнос, второй по численности народ Российской Федерации после русских (5,3 млн человек, 3,87% населения страны) [2]. Основными этнотерриториальными группами российских татар являются волго-уральская, астраханская и сибирская. Исторически более 80% российских татар населяют Волго-Уральский регион [1]. В Санкт-Петербурге татары являются четвертой по численности этнической группой (около 31 тыс. человек, 0,73% населения города) [4].

Целью нашего исследования являлся сравнительный анализ иммуногенетических характеристик потенциальных доноров гемопоэтических стволовых клеток регистра ФГБУ РосНИИГТ ФМБА России, самоопределившихся как русские и татары.

Материалы и методы

Группа потенциальных доноров ГСК, самоопределившихся как русские, включала 1000 чело-

век в возрасте от 20 до 57 лет (медиана — 34 года). Количество доноров женского пола — 503 человека (50,3%), мужского пола — 497 человек (49,7%). Регион проживания — г. Санкт-Петербург.

Группа доноров, самоидентифицировавшихся как татары, насчитывала 106 человек в возрасте от 21 года до 59 лет (медиана — 33 года). Количество индивидуумов мужского пола — 57 человек (53,8%), женского пола — 49 человек (46,2%). Регион проживания: г. Санкт-Петербург — 60 человек, Республика Башкортостан — 35 человек, г. Самара — 5 человек, г. Нижний Новгород — 3 человека, г. Первоуральск — 1 человек, г. Томск — 1 человек, г. Улан-Удэ — 1 человек.

Образцы периферической крови и согласие потенциальных доноров на проведение иммуногенетического обследования (HLA-типирование) были получены на этапе вступления в регистр.

Первичное иммуногенетическое обследование потенциальных доноров выполнено с помощью методов полимеразной цепной реакции с использованием сиквенс-специфичных праймеров (наборы производства Protrans, Германия) и полимеразной цепной реакции с использованием сиквенс-специфичных олигонуклеотидных проб (наборы производства BAG Health Care, Германия).

Статистическая обработка данных: частоты групп HLA-аллелей и HLA-гаплотипов установлены методом максимального правдоподобия с применением алгоритма максимизации ожидания с помощью программы Arlequin 3.5 [7]. Для оценки различий частот групп HLA-аллелей и HLA-гаплотипов использованы непараметрические статистические методы, программное обеспечение Epi Info 7.2 [8]. Статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$.

Результаты

Сравнительный анализ частот групп аллелей HLA-генов

В процессе исследования у доноров, самоопределившихся как русские, выявлены 18 групп аллелей гена *HLA-A* из 21-й, открытой к настоящему времени. У доноров, самоидентифицировавшихся как татары, определены 15 групп аллелей этого гена. Группы *A*36*, *A*66* и *A*69*, установленные у русских, не были выявлены у татар. С наибольшей частотой как у русских, так и у татар определялись группы *A*02*, *A*03*, *A*01*, *A*24* (табл. 1).

У обследованных русских установлено 27, у татар — 25 групп аллелей гена *HLA-B* из 36 известных. Группы *B*45*, *B*47*, *B*53*, выявленные у русских, не были определены у татар. Напротив,

ТАБЛИЦА 1. ЧАСТОТЫ ГРУПП АЛЛЕЛЕЙ ГЕНА *HLA-A* У РУССКИХ И ТАТАР, ЯВЛЯЮЩИХСЯ ПОТЕНЦИАЛЬНЫМИ ДОНОРАМИ ГСК РЕГИСТРА ФГБУ РОСНИИГТ ФМБА РОССИИ

TABLE 1. FREQUENCIES OF *HLA-A* ALLELE GROUPS IN RUSSIANS AND TATARS WHO ARE THE POTENTIAL HSC DONORS OF THE REGISTER OF RUSSIAN RESEARCH INSTITUTE OF HAEMATOLOGY AND TRANSFUSIOLOGY

Группа аллелей Allele groups	Русские Russians		Татары Tatars		p
	Частота Frequency	SD**	Частота Frequency	SD**	
01	0,1155	0,0069	0,1085	0,0208	1,00
02	0,3170	0,0105	0,2736	0,0336	0,38
03	0,1615	0,0074	0,1462	0,0254	0,68
11	0,0610	0,0052	0,0613	0,0160	1,00
23	0,0200	0,0031	0,0377	0,0105	0,28
24	0,1060	0,0077	0,1132	0,0225	0,87
25	0,0430	0,0043	0,0283	0,0102	0,61
26	0,0390	0,0048	0,0613	0,0180	0,43
29	0,0090	0,0021	0,0047	0,0042	1,00
30	0,0185	0,0030	0,0377	0,0148	0,28
31	0,0220	0,0035	0,0377	0,0122	0,30
32	0,0235	0,0033	0,0283	0,0119	0,74
33	0,0165	0,0030	0,0142	0,0073	0,70
36	0,0005	0,0005	0,0000	0,0000	–
66	0,0060	0,0016	0,0000	0,0000	–
68	0,0395	0,0046	0,0425	0,0113	0,61
69	0,0005	0,0005	0,0000	0,0000	–
74	0,0010	0,0007	0,0047	0,0043	1,00

Примечание. ** – стандартное отклонение (SD).

Note. **, standard deviation (SD).

группа *B*73* установлена у татар, но не выявлена у обследованных русских. Наиболее распространенными группами у русских являлись *B*07*, *B*35*, *B*44*; у татар – *B*44*, *B*35*, *B*27* (табл. 2).

У русских и татар определены все известные к настоящему времени группы аллелей гена *HLA-DRB1*. Наиболее распространенной группой у русских являлись *DRB1*15*, у татар – *DRB1*07*. Также с высокой частотой, как у русских, так и у татар определялись группы *DRB1*01*, *DRB1*11*, *DRB1*13* (табл. 3).

Распределение *HLA*-генов, установленное в результате обследования доноров, самоопределившихся как русские, было проверено на соответствие закону Харди–Вайнберга. Данные, представленные в таблице 4, подтверждают однородность значений эмпирически обнаружен-

ной и ожидаемой гетерозиготности ($p > 0,05$), что подтверждает соответствие указанному закону.

У доноров, самоидентифицировавшихся как татары, распределение генов *HLA-A*, *HLA-B* соответствовало закону Харди–Вайнберга, $p > 0,05$ (табл. 5). В случае гена *HLA-DRB1* достоверность различий эмпирически обнаруженной и ожидаемой гетерозиготности (p) составила 0,05, что может объясняться присутствием представителей разных этнотерриториальных групп татар среди обследованных доноров.

Сравнительный анализ частот *HLA*-гаплотипов

У доноров, самоидентифицировавшихся как русские, установлен 601 *HLA-A-B-DRB1* гаплотип. *HLA*-гаплотипы, определявшиеся с частотой более 1%, представлены в таблице 6.

Как показывают данные, представленные в таблице 6, частота первых четырех *HLA*-гаплотипов превышала 2% (диапазон от 2,45% до

ТАБЛИЦА 2. ЧАСТОТЫ ГРУПП АЛЛЕЛЕЙ ГЕНА *HLA-B* У РУССКИХ И ТАТАР, ЯВЛЯЮЩИХСЯ ПОТЕНЦИАЛЬНЫМИ ДОНОРАМИ ГСК РЕГИСТРА ФГБУ РОСНИИГТ ФМБА РОССИИ

TABLE 2. FREQUENCIES OF *HLA-B* ALLELE GROUPS IN RUSSIANS AND TATARS WHO ARE THE POTENTIAL HSC DONORS OF THE REGISTER OF RUSSIAN RESEARCH INSTITUTE OF HAEMATOLOGY AND TRANSFUSIOLOGY

Группа аллелей Allele groups	Русские Russians		Татары Tatars		p
	Частота Frequency	SD	Частота Frequency	SD	
07	0,1245	0,0076	0,0755	0,0158	0,16
08	0,0600	0,0051	0,0566	0,0168	1,00
13	0,0640	0,0053	0,0755	0,0168	0,68
14	0,0210	0,0031	0,0142	0,0070	1,00
15	0,0700	0,0062	0,0236	0,0097	0,15
18	0,0770	0,0061	0,0425	0,0146	0,33
27	0,0490	0,0051	0,0943	0,0189	0,06
35	0,1235	0,0064	0,1274	0,0215	0,75
37	0,0130	0,0025	0,0094	0,0065	1,00
38	0,0365	0,0043	0,0425	0,0126	0,59
39	0,0200	0,0035	0,0094	0,0063	0,71
40	0,0515	0,0046	0,0613	0,0173	0,81
41	0,0220	0,0032	0,0189	0,0104	1,00
44	0,1050	0,0063	0,1321	0,0216	0,40
45	0,0015	0,0009	0,0000	0,0000	–
47	0,0020	0,0010	0,0000	0,0000	–
48	0,0050	0,0016	0,0189	0,0097	0,14
49	0,0150	0,0025	0,0094	0,0065	1,00
50	0,0120	0,0025	0,0283	0,0116	0,17
51	0,0545	0,0049	0,0566	0,0176	0,83
52	0,0170	0,0031	0,0236	0,0090	0,43
53	0,0010	0,0007	0,0000	0,0000	–
54	0,0005	0,0005	0,0047	0,0051	1,00
55	0,0085	0,0019	0,0047	0,0047	1,00
56	0,0120	0,0027	0,0189	0,0095	0,63
57	0,0280	0,0037	0,0283	0,0118	1,00
58	0,0060	0,0017	0,0189	0,0080	0,17
73	0,0000	0,0000	0,0047	0,0039	–

3,92%). Восемь последующих *HLA*-гаплотипов определялись с частотой от 1,01% до 1,89%.

У обследованных татар определены 138 *HLA-A-B-DRB1* гаплотипов. В таблице 7 представлены *HLA*-гаплотипы, определявшиеся с частотой более 1%.

Как демонстрируют данные, представленные в таблице 7, частота первых четырех *HLA*-гаплотипов превышала 2% (диапазон от 2,36% до 4,61%). Двенадцать последующих *HLA*-гаплотипов определялись с частотой от 1,42% до 1,89%.

ТАБЛИЦА 3. ЧАСТОТЫ ГРУПП АЛЛЕЛЕЙ ГЕНА *HLA-DRB1* У РУССКИХ И ТАТАР, ЯВЛЯЮЩИХСЯ ПОТЕНЦИАЛЬНЫМИ ДОНОРАМИ ГСК РЕГИСТРА ФГБУ РОСНИИГТ ФМБА РОССИИ

TABLE 3. FREQUENCIES OF *HLA-DRB1* ALLELE GROUPS IN RUSSIANS AND TATARS WHO ARE THE POTENTIAL HSC DONORS OF THE REGISTER OF RUSSIAN RESEARCH INSTITUTE OF HAEMATOLOGY AND TRANSFUSIOLOGY

Группа аллелей Allele groups	Русские Russians		Татары Tatars		p
	Частота Frequency	SD	Частота Frequency	SD	
01	0,1320	0,0081	0,1415	0,0220	0,76
03	0,0700	0,0062	0,0660	0,0155	1,00
04	0,1060	0,0069	0,0943	0,0220	0,87
07	0,1380	0,0077	0,1981	0,0257	0,11
08	0,0345	0,0044	0,0377	0,0147	0,78
09	0,0100	0,0020	0,0236	0,0106	0,12
10	0,0075	0,0020	0,0047	0,0049	1,00
11	0,1320	0,0067	0,1038	0,0197	0,54
12	0,0245	0,0035	0,0330	0,0116	0,75
13	0,1315	0,0080	0,1179	0,0219	0,65
14	0,0200	0,0034	0,0283	0,0120	0,48
15	0,1515	0,0065	0,1132	0,0226	0,32
16	0,0425	0,0045	0,0377	0,0139	1,00

ТАБЛИЦА 4. ОЦЕНКА СООТВЕТСТВИЯ РАСПРЕДЕЛЕНИЯ *HLA*-ГЕНОВ ЗАКОНУ ХАРДИ–ВАЙНБЕРГА У ДОНОРОВ, САМООПРЕДЕЛИВШИХСЯ КАК РУССКИЕ

TABLE 4. ASSESSMENT OF COMPLIANCE OF *HLA* GENES DISTRIBUTION WITH THE HARDY–WEINBERG LAW IN DONORS WHO HAVE SELF-IDENTIFIED AS RUSSIANS

HLA-ген HLA gene	Количество образцов Number of samples	Обнаруженная гетерозиготность Detected heterozygosity	Ожидаемая гетерозиготность Expected heterozygosity	p
HLA-A	1000	0,8440	0,8385	0,51
HLA-B	1000	0,9200	0,9275	0,89
HLA-DRB1	1000	0,8760	0,8860	0,86

ТАБЛИЦА 5. ОЦЕНКА СООТВЕТСТВИЯ РАСПРЕДЕЛЕНИЯ *HLA*-ГЕНОВ ЗАКОНУ ХАРДИ–ВАЙНБЕРГА У ДОНОРОВ, САМООПРЕДЕЛИВШИХСЯ КАК ТАТАРЫ

TABLE 5. ASSESSMENT OF COMPLIANCE OF *HLA* GENES DISTRIBUTION WITH THE HARDY–WEINBERG LAW IN DONORS WHO HAVE SELF-IDENTIFIED AS TATARS

HLA-ген HLA gene	Количество образцов Number of samples	Обнаруженная гетерозиготность Detected heterozygosity	Ожидаемая гетерозиготность Expected heterozygosity	p
HLA-A	106	0,7830	0,8678	0,10
HLA-B	106	0,9151	0,9320	0,28
HLA-DRB1	106	0,9057	0,8889	0,05

ТАБЛИЦА 6. ЧАСТОТА HLA-A-B-DRB1-ГАПЛОТИПОВ У РУССКИХ, ЯВЛЯЮЩИХСЯ ПОТЕНЦИАЛЬНЫМИ ДОНОРАМИ ГСК РЕГИСТРА ФГБУ РОСНИИГТ ФМБА РОССИИ

TABLE 6. FREQUENCY OF HLA-A-B-DRB1 HAPLOTYPES IN RUSSIANS WHO ARE THE POTENTIAL HSC DONORS OF THE REGISTER OF RUSSIAN RESEARCH INSTITUTE OF HAEMATOLOGY AND TRANSFUSIOLOGY

№ No.	HLA-гаплотип HLA haplotypes	Частота Frequency	SD
1	A*01-B*08-DRB1*03	0,0392	0,0045
2	A*03-B*07-DRB1*15	0,0349	0,0042
3	A*02-B*13-DRB1*07	0,0283	0,0045
4	A*03-B*35-DRB1*01	0,0245	0,0039
5	A*02-B*07-DRB1*15	0,0188	0,0037
6	A*02-B*27-DRB1*01	0,0147	0,0030
7	A*02-B*18-DRB1*11	0,0146	0,0029
8	A*25-B*18-DRB1*15	0,0140	0,0030
9	A*02-B*15-DRB1*04	0,0125	0,0028
10	A*02-B*15-DRB1*13	0,0117	0,0035
11	A*01-B*57-DRB1*07	0,0111	0,0023
12	A*02-B*51-DRB1*11	0,0101	0,0025

ТАБЛИЦА 7. ЧАСТОТА HLA-A-B-DRB1-ГАПЛОТИПОВ У ТАТАР, ЯВЛЯЮЩИХСЯ ПОТЕНЦИАЛЬНЫМИ ДОНОРАМИ ГСК РЕГИСТРА ФГБУ РОСНИИГТ ФМБА РОССИИ

TABLE 7. FREQUENCY OF HLA-A-B-DRB1 HAPLOTYPES IN TATARS, WHO ARE THE POTENTIAL HSC DONORS OF THE REGISTER OF RUSSIAN RESEARCH INSTITUTE OF HAEMATOLOGY AND TRANSFUSIOLOGY

№ No.	HLA-гаплотип HLA haplotype	Частота Frequency	SD
1	A*02-B*44-DRB1*07	0,0461	0,0161
2	A*03-B*35-DRB1*01	0,0425	0,0144
3	A*01-B*08-DRB1*03	0,0236	0,0115
4	A*30-B*13-DRB1*07	0,0236	0,0108
5	A*02-B*27-DRB1*01	0,0189	0,0104
6	A*02-B*38-DRB1*13	0,0189	0,0103
7	A*25-B*18-DRB1*15	0,0189	0,0093
8	A*03-B*07-DRB1*15	0,0168	0,0105
9	A*03-B*13-DRB1*07	0,0162	0,0100
10	A*02-B*51-DRB1*11	0,0142	0,0103
11	A*24-B*35-DRB1*11	0,0142	0,0096
12	A*24-B*44-DRB1*01	0,0142	0,0091
13	A*31-B*58-DRB1*04	0,0142	0,0089
14	A*02-B*40-DRB1*04	0,0142	0,0088
15	A*03-B*08-DRB1*03	0,0142	0,0083
16	A*01-B*57-DRB1*07	0,0142	0,0076

Обсуждение

Согласно результатам нашего исследования, количество групп аллелей генов *HLA-A* и *HLA-B*, определенных у русских, несколько превышало их число у татар (18 против 15, 27 против 25 соответственно). У обследованных татар не были выявлены группы *A*36*, *A*66*, *A*69*, *B*45*, *B*47*, *B*53*, установленные у русских. Группа *B*73*, выявленная у татар, не встречалась у обследованных русских. Опубликованные данные свидетельствуют о том, что *B*73* является достаточно редкой группой аллелей у русских [10]. Следует отметить, что меньшее количество групп аллелей генов *HLA-A* и *HLA-B*, выявленное у татар, может быть обусловлено более низкой численностью группы по сравнению с русскими. С наибольшей частотой у русских и татар определялись одинаковые группы аллелей гена *HLA-A*: *A*02*, *A*03*, *A*01*, *A*24*. Наиболее распространенными группами аллелей гена *HLA-B* у русских являлись *B*07*, *B*35*, *B*44*; у татар — *B*44*, *B*35*, *B*27*. У доноров обеих этнических групп определены все известные группы аллелей гена *HLA-DRB1*. Наиболее распространенная аллельная группа у русских — *DRB1*15*, у татар — *DRB1*07*. Также с высокой частотой у представителей обеих этнических групп определялись *DRB1*01*, *DRB1*11*, *DRB1*13*.

Статистически достоверные различия частот групп HLA-аллелей у обследованных русских и татар не установлены. Наблюдалась тенденция к большей распространенности группы *B*27* у татар по сравнению с русскими (9,43% против 4,90%, $p = 0,06$). Так как в составе обследованной нами группы татар преобладали жители Санкт-Петербурга (60 человек, 56,6%) и Башкортостана (35 человек, 33,0%), было интересным оценить частоту *B*27* у представителей этих регионов. Частота *B*27* у татар, проживающих в Санкт-Петербурге, составила 7,5%, в Республике Башкортостан — 12,9%. Татары Башкортостана являлись жителями двух городов — Салават и Ишимбай, носителями *B*27* являлись жители Салавата. Результаты, полученные другими исследователями, свидетельствуют о вариабельности частоты группы *B*27* у татар, проживающих в различных регионах Российской Федерации: в Республике Татарстан — от 5,3% [11] до 7,0% [3], в Кировской области — 3,0% [3], на Южном Урале — 4,8% [10]. Следует отметить немногочисленность большинства обследованных групп, что может быть одной из причин наблюдающихся отличий.

В результате сравнительного анализа распределения HLA-гаплотипов в группах русских и татар

выявлены более значимые отличия. В частности, показано, что у обследованных татар наиболее распространен гаплотип *A*02-B*44-DRB1*07*, тогда как у русских наблюдалась значительно более низкая частота этого гаплотипа (4,61% против 0,55%, $p = 0,002$). Интересно, что у татар, проживающих в Санкт-Петербурге, гаплотип *A*02-B*44-DRB1*07* был представлен с меньшей частотой (3,33%), а максимально распространенным являлся гаплотип *A*03-B*35-DRB1*01* (5,00%). Показано, что у татар Челябинской области гаплотип *A*03-B*35-DRB1*01* также является максимально распространенным (4,40%), а гаплотип *A*02-B*44-DRB1*07* (2,60%) был вторым по частоте [5].

В группе обследованных нами русских наиболее высокочастотным был общеевропейский гаплотип *A*01-B*08-DRB1*03* (частота — 3,92%), у татар этот гаплотип являлся третьим по частоте (2,36%). Согласно опубликованным данным, гаплотип *A*01-B*08-C*07-DRB1*03* является наиболее частым у татар, проживающих в Республике Татарстан (частота — 2,11%), а у татар Челябинской области гаплотип *A*01-B*08-DRB1*03* встречается реже (частота — 1,50%) [5, 10].

HLA-гаплотип *A*03-B*13-DRB1*07* занимал 4-е место по ранжиру у обследованных нами татар (частота — 1,62%). Подобная встречаемость (1,4%) этого гаплотипа установлена у татар Южного Урала, в то время как у доноров-татар регистра ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России этот гаплотип встречался с большей частотой (2,85%) и был самым распространенным [6, 10]. У обследованных нами русских гаплотип *A*03-B*13-DRB1*07* определялся достоверно реже по сравнению с группой татар (0,08% против 1,62%, $p = 0,03$).

Гаплотип *A*03-B*08-DRB1*03* также достоверно чаще встречался у татар по сравнению с русскими (1,42% против 0,06%, $p = 0,03$). Согласно данным популяционных исследований, этот гаплотип с близкой частотой определяется у нагайбаков Южного Урала и иракских курдов [10].

Достаточно распространенные (более 1%) у обследованных нами татар, HLA-гаплотипы *A*31-B*58-DRB1*04* и *A*24-B*44-DRB1*01*, не были выявлены у обследованных русских. HLA-гаплотипы *A*02-B*18-DRB1*11*, *A*02-B*15-DRB1*04*, *A*02-B*15-DRB1*13*, встречающиеся у русских с частотой более 1%, не были определены у обследованных татар.

HLA-гаплотипы *A*03-B*07-DRB1*15*, *A*03-B*35-DRB1*01*, *A*02-B*27-DRB1*01*, *A*25-B*18-DRB1*15*, *A*01-B*57-DRB1*07*, *A*02-B*51-DRB1*11* опре-

делялись с частотой более 1,0% как у русских, так и у татар.

Заключение

Таким образом, анализ иммуногенетических характеристик потенциальных доноров гемопоэтических стволовых клеток регистра ФГБУ РосНИИГТ ФМБА России, самоопределившихся как русские и татары, позволил установить HLA-гаплотипы, характерные для каждой из обследованных групп. Полученные результаты сви-

детельствуют о целесообразности привлечения в состав регистра большего числа представителей этнической группы татар, что повысит иммуногенетическое разнообразие донорского пула. Увеличение числа доноров с разнообразными, характерными для татар HLA-гаплотипами позволит повысить шансы на подбор совместимого донора для пациентов этой этнической группы, являющейся одной из наиболее распространенных как среди населения Российской Федерации, так и в Санкт-Петербурге.

Список литературы / References

1. Бушуев А.С. Современная этнодемография татар // Этнографическое обозрение, 2019. № 5. С. 133-150. [Bushuev A.S. Contemporary Ethnodemographic Developments among the Tatars. *Etnograficheskoe obozrenie = Ethnographic Review*, 2019, no. 5, pp. 133-150. (In Russ.)]
2. Всероссийская перепись населения 2010 года; Т. 4. Национальный состав и владение языками, гражданство, пункт 4 [Электронный ресурс]. Режим доступа: https://gks.ru/free_doc/new_site/perepis2010/croc/perepis_itogi1612.htm. (Дата обращения 13.12.2022). [All-Russian population census 2010, Vol. 4. Ethnic composition and language skills, citizenship, point 4 [Electronic resource]. Access mode: https://gks.ru/free_doc/new_site/perepis2010/croc/perepis_itogi1612.htm. (Date of application December 13, 2022)].
3. Ключников Д.Ю., Вавилов М.Н., Макаренко О.А., Логинова М.А., Трусова Л.М., Волчков С.Е., Суслова Т.А., Тюмина О.В., Гайфуллина Р.Ф. Различия в профилях аллелей HLA-A, -B, -DRB1 у татар России // Вестник гематологии, 2021. Т. XVII, № 3. С. 49-50. [Klyuchnikov D.Yu., Vavilov M.N., Makarenko O.A., Loginova M.A., Trusova L.M., Volchikov S.E., Suslova T.A., Tyumina O.V., Gajfullina R.F. Differences in the profiles of HLA-A, -B, -DRB1 alleles among Russian Tatars. *Vestnik gematologii = Bulletin of Hematology*, 2021, Vol. XVII, no. 3, pp. 49-50. (In Russ.)]
4. Национальный состав и владение языками, гражданство населения Санкт-Петербурга. Статистический сборник. СПб.: Петростат, 2013. 188 с. [National composition and language proficiency, citizenship of the population of St. Petersburg. Statistical collection]. St. Petersburg: Petrostat, 2013, 188 p.
5. Суслова Т.А., Бурмистрова А.Л., Хромова Е.Б., Вавилов М.Н., Беляева С.В., Чернова М.С., Горелова А.К. Частоты генов HLA-A, B, DR в популяции татар Челябинской области в сравнении с другими этносами региона // Вестник Челябинского государственного университета, 2013. № 7 (298). С. 14-17. [Suslova T.A., Burmistrova A.L., Khromova E.B., Vavilov M.N., Belyaeva S.V., Chernova M.S., Gorelova A.K. Frequencies of HLA-A, B, DR genes in the Tatar population of the Chelyabinsk region in comparison with other ethnic groups of the region. *Vestnik Chelyabinskogo gosudarstvennogo universiteta = Bulletin of the Chelyabinsk State University*, 2013, no. 7 (298), pp. 14-17.
6. Чернышов Д.С., Кузьминова Е.П., Абдрахимова А.Р., Чапова Р.С., Хамаганова Е.Г. Иммуногенетический профиль доноров гемопоэтических стволовых клеток регистра ФГБУ «НМИЦ Гематологии» Минздрава России, самоопределившихся как татары // Вестник гематологии, 2018. Т. XIV, № 2. С. 53-54. [Chernyshov D.S., Kuzminova E.P., Abdrahimova A.R., Chapova R.S., Hamaganova E.G. Immunogenetic profile of hematopoietic stem cell donors from the registry of the Federal State Budgetary Institution "National Medical Research Center of Hematology" of the Ministry of Health of Russia, who self-identified as Tatars. *Vestnik gematologii = Bulletin of Hematology*, 2018, Vol. XIV, no. 2, pp. 53-54. (In Russ.)]
7. Arlequin: An Integrated Software for Population Genetics Data Analysis [cmpg.unibe.ch]. Arlequin ver. 3.5.2.2 [released on 02.08.2015; date of access January 2023]. Available at: <http://cmpg.unibe.ch/software/arlequin35/>.
8. Epi Info™ for Windows. Epi Info ver. 7.2. [Date of access January 2023]. Available at: <https://www.cdc.gov/epiinfo/pc.html>.
9. Gooptu M., Koreth J. Translational and clinical advances in acute graft-versus-host disease. *Haematologica*, 2020, Vol. 105, no. 11, pp. 2550-2560.
10. HLA haplotype freq search [allelefrequencies.net]. Allele Frequency Net Database [Date of access January 2023]. Available at: <http://www.allelefrequencies.net/hla6003a.asp>.

11. Loginova M., Paramonov I. HLA class I and class II and haplotypes in Tatars, living in the Republic of Tatarstan, Russia. *Tissue Antigens*, 2014, Vol. 84, no. 1, 136. doi.org/10.1111/tan.12371/
12. Tiercy J.M. Unrelated hematopoietic stem cell donor matching probability and search algorithm. *Bone Marrow Res.*, 2012, Vol. 2012, 695018. doi:10.1155/2012/695018.

Авторы:

Кузьмич Е.В. — к.б.н., старший научный сотрудник НИЛ иммунологии ФГБУ «Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии Федерального медико-биологического агентства», Санкт-Петербург, Россия

Павлова И.Е. — д.м.н., главный научный сотрудник НИЛ иммунологии ФГБУ «Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии Федерального медико-биологического агентства», Санкт-Петербург, Россия

Беляева Е.В. — к.м.н., старший научный сотрудник НИЛ иммунологии ФГБУ «Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии Федерального медико-биологического агентства», Санкт-Петербург, Россия

Бубнова Л.Н. — д.м.н., профессор, заслуженный деятель науки РФ, руководитель Центра иммунологического типирования тканей клиники ФГБУ «Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии Федерального медико-биологического агентства»; профессор кафедры иммунологии ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Authors:

Kuzmich E.V., PhD (Biology), Senior Research Associate, Laboratory of Immunology, Russian Research Institute of Haematology and Transfusiology, St. Petersburg, Russian Federation

Pavlova I.E., PhD, MD (Medicine), Chief Research Associate, Laboratory of Immunology, Russian Research Institute of Haematology and Transfusiology, St. Petersburg, Russian Federation

Belyaeva E.V., PhD (Medicine), Senior Research Associate, Laboratory of Immunology, Russian Research Institute of Haematology and Transfusiology, St. Petersburg, Russian Federation

Bubnova L.N., PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Center of Tissues Typing, Russian Research Institute of Haematology and Transfusiology; Professor, Department of Immunology, First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Поступила 09.02.2023
Принята к печати 20.02.2023

Received 09.02.2023
Accepted 20.02.2023

МУЛЬТИЛОКУСНЫЕ HLA-ГАПЛОТИПЫ (A-B-C-DRB1-DRB3/DRB4/DRB5-DQA1-DQB1-DPA1-DPB1) В СЕМЬЯХ БОЛЬНЫХ С НАЗНАЧЕНИЕМ К ТРАНСПЛАНТАЦИИ АЛЛОГЕННЫХ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК

Хамаганова Е.Г., Хижинский С.П., Абдрахимова А.Р., Кузьминова Е.П., Леонов Е.А., Покровская О.С., Кузьмина Л.А., Паровичникова Е.Н.

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Резюме. HLA-гаплотип – совокупность *HLA*-генов, лежащих на одной хромосоме. Высокополиморфные HLA-гены демонстрируют выраженное неравновесное сцепление между собой, что приводит к формированию мультилокусных HLA-гаплотипов. Оценка разнообразия HLA-гаплотипов в популяции важна при трансплантации аллогенных гемопоэтических стволовых клеток. Золотым стандартом для изучения HLA-гаплотипов являются семейные исследования. HLA-гаплотипы, полученные на основе наблюдений за сегрегацией *HLA*-аллелей в пределах семьи, реально существуют в человеческой популяции. Цель работы – установление частот *HLA-A-B-C-DRB1-DRB3/DRB4/DRB5-DQA1-DQB1-DPA1-DPB1*-гаплотипов в семьях больных с назначением к HLA-типированию для проведения трансплантации аллогенных гемопоэтических стволовых клеток. Исследование включало 109 семей больных с заболеваниями системы крови, в которых больным и членам их семей было назначено HLA-типирование для поиска донора аллогенных гемопоэтических стволовых клеток. Больные и члены семей были типированы методом NGS в лаборатории тканевого типирования ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России по 11 *HLA*-генам – *A, B, C, DRB1, DRB3, DRB4, DRB5, DQA1, DQB1, DPA1* и *DPB1* методом секвенирования следующего поколения с помощью AllType FastPlex NGS Amplification Kits (One Lambda, США). Полученные последовательности анализировались при помощи компьютерной программы TypeStream Visual Software (TSV) и базы данных IPD-IMGT/HLA 3.44. В исследованных семьях было установлено 360 копий HLA-гаплотипов. Частоты HLA-гаплотипов определялись прямым подсчетом. Наиболее распространенным 7-локусным гаплотипом являлся *A*01:01-B*08:01-C*07:01-DRB1*03:01-DRB3*01:01-DQA1*05:01-DQB1*02:01/163N*, наиболее распространенным 9-локусным гаплотипом – *A*03:01-B*07:02-07:02-DRB1*15:01-DRB5*01:01-DQA1*01:02-DQB1*06:02-DPA1*01:03-DPB1*04:01P*. Эти HLA-гаплотипы в варианте *A-B-C-DRB1-DQB1* являются первым и вторым по распространенности HLA-гаплотипами в большинстве российских регистров

Адрес для переписки:

Хамаганова Екатерина Георгиевна
ФГБУ Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Министерства здравоохранения РФ
125167, Россия, Москва, Новый Зыковский проезд, 4.
Тел.: 8 (916) 216-53-93.
Тел./факс: 8 (495) 613-24-76.
E-mail: ekhamag@mail.ru

Address for correspondence:

Ekaterina G. Khamaganova
National Medical Research Center for Hematology
4 Novy Zykovsky Passage
Moscow
125167 Russian Federation
Phone: +7 (916) 216-53-93.
Phone/fax: +7 (495) 613-24-76.
E-mail: ekhamag@mail.ru

Образец цитирования:

Е.Г. Хамаганова, С.П. Хижинский, А.Р. Абдрахимова, Е.П. Кузьминова, Е.А. Леонов, О.С. Покровская, Л.А. Кузьмина, Е.Н. Паровичникова «Мультилокусные HLA-гаплотипы (A-B-C-DRB1-DRB3/DRB4/DRB5-DQA1-DQB1-DPA1-DPB1) в семьях больных с назначением к трансплантации аллогенных гемопоэтических стволовых клеток» // Медицинская иммунология, 2024. Т. 26, № 2. С. 291-302.
doi: 10.15789/1563-0625-MNH-2651

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

For citation:

E.G. Khamaganova, S.P. Khizhinskiy, A.R. Abdrakhimova, E.P. Kuzminova, E.A. Leonov, O.S. Pokrovskaya, L.A. Kuzmina, E.N. Parovichnikova “Multilocus HLA haplotypes (A-B-C-DRB1-DRB3/DRB4/DRB5-DQA1-DQB1-DPA1-DPB1) in families of patients scheduled for allogeneic hematopoietic stem cell transplantation”, *Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2024, Vol. 26, no. 2, pp. 291-302.
doi: 10.15789/1563-0625-MNH-2651

© Khamaganova E.G. et al., 2024
The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License
DOI: 10.15789/1563-0625-MNH-2651

доноров костного мозга. Несмотря на некоторые отличия, распределение HLA-гаплотипов в семьях больных и в российских регистрах обладает схожестью, поэтому вероятность найти совместимого донора для больных с распространенными HLA-гаплотипами в российских регистрах достаточно велика. Из-за горячей точки рекомбинации большинство 7-локусных гаплотипов соединяются в 9-локусных гаплотипах с различными аллелями генов локуса HLA-DP, однако проведенное исследование выявило существование сильного неравновесного сцепления между *HLA*-аллелями *DRB1*03:01* и *DPB1*01:01P* ($D' = 0,579$), *DRB1*07:01* и *DPB1*17:01* ($D' = 0,808$), *DRB1*09:01* и *DPB1*04:02P* ($D' = 0,502$). Полученные знания о реальных 7- и 9-локусных HLA-гаплотипах, существующих в семьях больных с назначением к трансплантации аллогенных гемопоэтических стволовых клеток, могут быть использованы в клинической практике в качестве референсных для анализа результатов HLA-типирования и предсказания ожидаемых HLA-гаплотипов. Показано, что, несмотря на существование горячей точки рекомбинации между локусом HLA-DP и остальным комплексом *HLA*-генов, наблюдается сильное неравновесное сцепление между некоторыми аллелями генов *DRB1* и *DPB1*.

Ключевые слова: HLA-гаплотип, семьи, неравновесное сцепление, HLA-DPB1, трансплантация, секвенирование следующего поколения

MULTILOCUS HLA HAPLOTYPES (A-B-C-DRB1-DRB3/DRB4/DRB5-DQA1-DQB1-DPA1-DPB1) IN FAMILIES OF PATIENTS SCHEDULED FOR ALLOGENEIC HEMATOPOIETIC STEM CELL TRANSPLANTATION

Khamaganova E.G., Khizhinskiy S.P., Abdrakhimova A.R.,
Kuzminova E.P., Leonov E.A., Pokrovskaya O.S., Kuzmina L.A.,
Parovichnikova E.N.

National Medical Research Center for Hematology, Moscow, Russian Federation

Abstract. HLA haplotype is a block of *HLA* genes located on the same chromosome. Highly polymorphic *HLA* genes display strong linkage disequilibrium, which results in conserved multilocus HLA haplotypes. Assessment of HLA haplotypic diversity of a specific population is important, particularly for allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. Family pedigrees remain the gold standard for studying HLA haplotype segregation. HLA haplotypes, obtained by observations of the segregation of *HLA* alleles within the family, really exist in the human population. The aim of this work has been to establish the frequencies of HLA haplotypes *A-B-C-DRB1-DRB3/DRB4/DRB5-DQA1-DQB1-DPA1-DPB1* in families of patients with assignment to HLA-typing for allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. The study included 109 families of patients, in which patients and their potential relative donors of allogeneic hematopoietic stem cell were subjected to HLA-typing. Patients and members of their families were typed by the NGS method in the Laboratory of Tissue Typing at the National Medical Research Center for Hematology for 11 HLA genes – *A, B, C, DRB1, DRB3, DRB4, DRB5, DQA1, DQB1, DPA1* and *DPB1*. The genotyping was performed by the NGS method using the AllType NGS 11 Loci Amplification Kits (One Lambda, USA) on the MiSeq sequencing platform (Illumina, USA). The sequences were analyzed using the TypeStream Visual Software (TSV) (One Lambda, USA) and the IPD-IMGT/HLA database 3.44. 360 copies of HLA-haplotypes were found in the studied families. The frequencies of HLA haplotypes were determined by direct counting. The most common 7-locus haplotype was *A*01:01-B*08:01-C*07:01-DRB1*03:01-(DRB3*01:01-DQA1*05:01)-DQB1*02:01/163N*, the most common 9-locus haplotype was *A*03:01-B*07:02-C*07:02-DRB1*15:01-DRB5*01:01-DQA1*01:02-DQB1*06:02-DPA1*01:03-DPB1*04:01P*. These HLA haplotypes (in brief, *A-B-C-DRB1-DQB1*) are the first and second most common HLA haplotypes in most Russian registries of bone marrow donors. Despite several differences, the distribution of HLA haplotypes in families of the patients and in donor registries is similar, and the probability of finding a compatible donor for patients with common HLA-haplotypes in Russian registries is quite high. Most of 7-locus haplotypes are associated with different alleles of the HLA-DP locus in the 9-locus haplotypes, due to presence of a recombination hot spot. The study revealed strong linkage disequilibrium between the HLA alleles *DRB1*03:01* and *DPB1*01:01P* ($D' = 0.579$), *DRB1*07:01*, and *DPB1*17:01* ($D' = 0.808$), *DRB1*09:01* and *DPB1*04:02P* ($D' = 0.502$). The information obtained about real 7- and 9-locus HLA-haplotypes in families may be used in clinical practice as a reference

for analyzing the results of HLA-typing and predicting the expected HLA-haplotypes. It has been shown that, despite recombination hot spot between the HLA-DP locus and the rest of the HLA complex, there is strong linkage disequilibrium between some alleles of the *DRB1* and *DPB1* genes.

Keywords: HLA haplotype, families, linkage disequilibrium, HLA-DPB1, transplantation, next-generation sequencing

Введение

HLA-гаплотип — совокупность *HLA*-генов, лежащих на одной хромосоме. Высокополиморфные *HLA*-гены демонстрируют выраженное неравновесное сцепление (linkage disequilibrium), что приводит к формированию мультилокусных гаплотипов [28, 29]. Неравновесное сцепление между аллелями различных генов сохраняется через поколения [20]. Гены *B* ~ *C* и *DRB1* ~ *DQB1* находятся в тесной ассоциации [6], другие имеют более слабую связь (*A* с другими *HLA*-генами) или ее отсутствие (*DPB1* и остальной *HLA*-комплекс) из-за более отдаленного местоположения и/или горячих точек рекомбинации [8, 16]. Частоты *HLA*-аллелей и *HLA*-гаплотипов стабильны в конкретной этнической группе, но различаются между расами и этносами [30, 35]. Оценка разнообразия *HLA*-гаплотипов в популяции особенно важна при трансплантации аллогенных гемопоэтических стволовых клеток (алло-ТГСК). Клинические специалисты используют сведения о *HLA*-гаплотипах в качестве справочных для проверки результатов *HLA*-типирования и предсказания ожидаемых *HLA*-гаплотипов [31].

Семейные исследования являются золотым стандартом для изучения *HLA*-гаплотипов. *HLA*-гаплотипы, полученные на основе наблюдений за сегрегацией *HLA*-аллелей в семье, реально существуют в человеческой популяции. Такие *HLA*-гаплотипы являются наблюдаемыми гаплотипами [5]. У неродственных лиц (доноров регистра) *HLA*-гаплотипы могут быть оценены с использованием алгоритма максимизации ожиданий (EM-алгоритма) [11, 17, 19, 25, 26]. Частоты *HLA*-гаплотипов следуют распределению с длинным хвостом из редких гаплотипов во всех изученных популяциях [27], что приводит к трудностям в точном прогнозировании низкочастотных гаплотипов с помощью ЭМ-алгоритма, и переоценке частоты высокочастотных гаплотипов [9, 11, 22].

Секвенирование следующего поколения (next generation sequencing — NGS), сделало возможным полное (или почти полное) типирование всех 11 классических полиморфных *HLA*-генов — *A*, *B*, *C*, *DRB1*, *DRB3*, *DRB4*, *DRB5*, *DQA1*, *DQB1*, *DPA1* и *DPB1* с высоким разрешением. Точные частоты гаплотипов *HLA*-генов, типированных с высоким разрешением, необходимы для прогнозирования совпадения больных и доноров гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) и облегчают идентификацию доноров, соответствующих больному с показаниями к алло-ТГСК как по *HLA*-аллелям, так и *HLA*-гаплотипам [9, 12]. Со-

впадение больного и донора по *HLA*-гаплотипам коррелирует со значительным улучшением клинических исходов [24].

Цель работы — установление частот *HLA-A-B-C-DRB1-DRB3/DRB4/DRB5-DQA1-DQB1-DPA1-DPB1*-гаплотипов в семьях больных с назначением к *HLA*-типированию для проведения трансплантации аллогенных гемопоэтических стволовых клеток.

Материалы и методы

Исследование включало 109 семей больных с заболеваниями системы крови, в которых больным и членам их семей было назначено *HLA*-типирование для поиска донора алло-ГСК. Все больные и члены семей были типированы методом NGS в лаборатории тканевого типирования ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России в 2021-2022 гг. по 11 *HLA*-генам — *A*, *B*, *C*, *DRB1*, *DRB3*, *DRB4*, *DRB5*, *DQA1*, *DQB1*, *DPA1* и *DPB1*.

ДНК выделяли с помощью наборов QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen, ФРГ) и автоматизированной системы выделения ДНК QIAcube (Qiagen, ФРГ) в соответствии с рекомендациями производителя. *HLA*-типирование проводили методом NGS. Библиотеки готовили с помощью набора AllType FastPlex NGS Amplification Kits (One Lambda, США), как описано ранее [4]. На этапе таргетного обогащения с помощью полимеразной цепной реакцией (ПЦР) были полностью амплифицированы гены класса I (*HLA-A*, *HLA-B*, *HLA-C*) и гены *DQA1* и *DPA1* класса II (от 5'UTR до 3'UTR), а также ключевые области других генов класса II, а именно *DRB1/3/4/5*, *DQB1* и *DPB1* (от экзона 2 до 3'UTR). Готовые библиотеки пулировали для секвенирования. С использованием набора реагентов для секвенирования MiSeq Reagent Kit v2 (300 циклов) (Illumina, Сингапур) проводили секвенирование на платформе MiSeq (Illumina, США). Полученные последовательности анализировали при помощи компьютерной программы TypeStream Visual Software (TSV) (One Lambda, США) и базы данных IPD-IMGT/HLA 3.44. Варианты *HLA*-генов класса I (*A*, *B*, *C*) были установлены в большинстве случаев на уровне отдельного аллеля (4 полей) [21], генов класса II (*DRB1*, *DRB3*, *DRB4*, *DRB5*, *DQA1*, *DQB1*, *DPA1*) с разрешением от 2-го поля (аллели с одинаковой аминокислотной последовательностью) до 4-го поля (аллели с одинаковой нуклеотидной последовательностью) и варианты гена *DPB1* были установлены или на уровне 2-го поля, или Р-группы (аллели с одинаковой аминокислотной

последовательностью пептидсвязывающего сайта) [21].

Наследование HLA-гаплотипов в семьях больных представлено на рисунке 1.

Семьи были разделены на несколько групп в зависимости от числа членов в семье больного и установленных в семье HLA-гаплотипов (табл. 1). В группах 1a и 1b четыре HLA-гаплотипа (a, b,

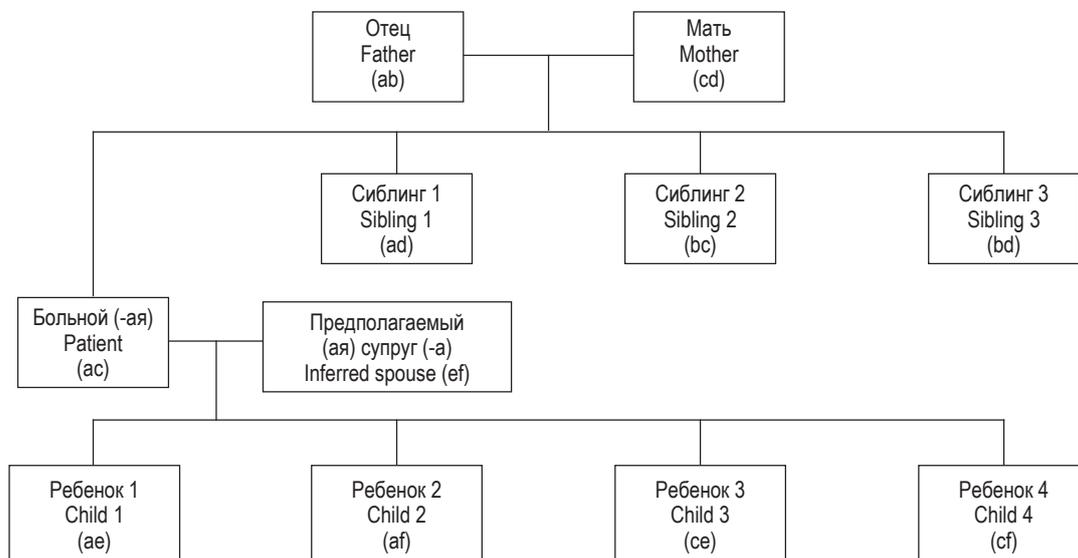


Рисунок 1. Наследование HLA-гаплотипов в семьях больных с назначением к HLA-типированию

Примечание. a, b, c, d, e, f – HLA-гаплотипы.

Figure 1. Inheritance of HLA-haplotypes in families of patients with assignment to HLA-typing

Note. a, b, c, d, e, f – HLA haplotypes.

ТАБЛИЦА 1. ХАРАКТЕРИСТИКИ СЕМЕЙ БОЛЬНЫХ, ВКЛЮЧЕННЫЕ В ИССЛЕДОВАНИЕ

TABLE 1. CHARACTERISTICS OF PATIENTS FAMILIES INCLUDED IN THE STUDY

Группы Groups	Члены семьи больного Patient family members	Число HLA-гаплотипов в семье Number of HLA haplotypes in the family	Число семей Number of families	Число членов семей Number of family members	Число наблюдаемых HLA-гаплотипов Number of observed HLA haplotypes
1a	Оба родителя + сиблинг Both parents + sibling	4 (a, b, c, d)	8	25	32
1b	Один родитель и сиблинги Single parent and siblings	4 (a, b, c, d)	6	19	24
2a	Сиблинги без родителей Siblings without parents	4 (a, b, c, d)	12	42	48
2b	Дети Children	4 (a, c, e, f)	2	7	8
3a	Один родитель + сиблинг Single parent + sibling	3 (a, b, c или a, c, d)	20	43	60
3b	Сиблинги без родителей Siblings without parents	3 (a, c, d)	44	102	132
3c	Дети Children	3 (a, c, e)	12	26	36
4	Сиблинги и дети Siblings and children	4 (a, c, d и e)	5	17	20
Итого Total			109	281	360

с, d) были идентифицированы или при непосредственном HLA-типировании обоих родителей и больного, или при одном родителе и выведении HLA-гаплотипов второго родителя по сиблингам (родным братьям/сестрам больного). Во 2-й группе были выведены четыре HLA-гаплотипа на основе гаплотипов больного и сиблингов больного (2a) или гаплотипов больного и детей (2b). В группе 3 были выведены по три HLA-гаплотипа. В группе 4 HLA-гаплотипы были выведены на основе гаплотипов больного, сиблингов и детей больного. Из исследования исключались семьи, в которых не было возможности провести разделение на гаплотипы по всем включенным в исследование HLA-генам.

Частоты HLA-гаплотипов определяли прямым подсчетом. Для подсчета HLA-гаплотипов варианты всех HLA-генов были приведены к уровню 2-го поля (ген *DPB1* в некоторых случаях был определен на уровне Р-группы). Программа Arlequin 3.5 [10] была использована для определения стандартизованного значения неравновесного сцепления генов (D') на основе классического коэффициента, измеряющего отклонение частоты наблюдаемого гаплотипа от случайного сочетания аллелей разных локусов (D).

Результаты

В исследованных 109 семьях больных с назначением к алло-ТГСК установлено 360 копий HLA-гаплотипов. HLA-гаплотипы включали 9 или 8 генов, так как наличие одного из генов *DRB3/4/5* исключает присутствие двух других, также гены *DRB3/4/5* не входят в HLA-гаплотипы, в которых имеются гены *DRB1*01*, *DRB1*08*, *DRB1*10* [31].

Было выявлено 292 различных HLA-гаплотипа *A-B-C-DRB1-DRB3/4/5/-DQA1-DQB1*. Между локусом DP и остальным комплексом HLA-генов имеется горячая точка рекомбинации [13, 15], что ведет к отсутствию между ними выраженного неравновесного сцепления, поэтому в таблице 2 представлены 7 (или 6)-локусные HLA-гаплотипы *A-B-C-DRB1-DRB3/4/5/-DQA1-DQB1*, которые были определены 3 и более раз и их сочетания с аллелями *DPA1-DPB1* – 9(8)-локусные HLA-гаплотипы.

Наиболее распространенным 7-локусным HLA-гаплотипом являлся *A*01:01-B*08:01-C*07:01-DRB1*03:01-DRB3*01:01-DQA1*05:01-DQB1*02:01/163N*, который был определен 10 раз (2,8%). Этот гаплотип встречался с пятью различными сочетаниями *DPA1-DPB1* аллелей, из которых наиболее частыми были гаплотипы – *DPA1*01:03-DPB1*04:01P* и *DPA1*02:01-DPB1*01:01P* (определены по три раза каждый, 0,8%). Следующими по распространенности среди 7-локусных HLA-гаплотипов являлись *HLA-A*02:01-B*13:02-C*06:02-DRB1*07:01-DRB4*01:03-DQA1*02:01-DQB1*02:02/156* и

*HLA-A*03:01-B*07:02-C*07:02-DRB1*15:01-DRB5*01:01-DQA1*01:02-DQB1*06:02*, которые были определены по шесть раз (1,7%). Из них самым распространенным 9-локусным гаплотипом был *HLA-A*03:01-B*07:02-C*07:02-DRB1*15:01-DRB5*01:01-DQA1*01:02-DQB1*06:02-DPA1*01:03-DPB1*04:01P*, который был определен 5 раз (1,4%). Этот HLA-гаплотип был самым распространенным среди всех выявленных 9-локусных гаплотипов.

Четвертыми/пятыми по распространенности 7-локусными HLA-гаплотипами были *A*02:01-B*07:02-C*07:02-DRB1*15:01-DRB5*01:01-DQA1*01:02-DQB1*06:02* и *A*24:02-B*13:02-C*06:02-DRB1*07:01-DRB4*01:03-DQA1*02:01-DQB1*02:02/156*, каждый из которых был установлен по 5 раз (1,4%). Оба HLA-гаплотипа определялись с четырьмя различными сочетаниями *DPA1-DPB1* аллелей. Далее следовали HLA-гаплотипы *A*01:01-B*52:01-C*12:02-DRB1*15:02P-DRB5*01:02-DQA1*01:03-DQB1*06:01*, *A*03:01-B*35:01-C*04:01-DRB1*01:01-DQA1*01:01-DQB1*05:01/263* и *A*25:01-B*18:01-C*12:03-DRB1*15:01-DRB5*01:01-DQA1*01:02-DQB1*06:02*, которые были определены по 4 раза (1,1%). В отличие от всех других HLA-гаплотипов *A*03:01-B*35:01-C*04:01-DRB1*01:01-DQA1*01:01-DQB1*05:01/263* в нашем исследовании встречался только в сочетании с *DPA1*01:03-DPB1*04:01P*, и этот HLA-гаплотип был вторым по распространенности среди *HLA-A-B-C-DRB1-DRB3/DRB4/DRB5-DQA1-DQB1-DPA1-DPB1*-гаплотипов.

Еще восемь 7-локусных гаплотипов были установлены по три раза с частотой 0,8%, каждый из них сочетался с 2-3 различными *DPA1-DPB1*-гаплотипами. Семнадцать 7-локусных гаплотипов были установлены по два раза. 259 HLA-гаплотипов были определены только по одному разу.

Итак, наиболее распространенный HLA-гаплотип, который включает все возможные 9 HLA-генов из 11 классических полиморфных, – *A*03:01-B*07:02-C*07:02-DRB1*15:01-DRB5*01:01-DQA1*01:02-DQB1*06:02-DPA1*01:03-DPB1*04:01P* (1,4%). Второй по распространенности HLA-гаплотип – *A*03:01-B*35:01-C*04:01-DRB1*01:01-DQA1*01:01-DQB1*05:01/263-DPA1*01:03-DPB1*04:01P* (1,1%). Следующие 9-локусные HLA-гаплотипы – *A*01:01-B*08:01-C*07:01-DRB1*03:01-DRB3*01:01-DQA1*05:01-DQB1*02:01/163N-DPA1*01:03-DPB1*04:01P* и *A*01:01-B*08:01-C*07:01-DRB1*03:01-DRB3*01:01-DQA1*05:01-DQB1*02:01/163N-DPA1*02:01-DPB1*01:01P* (по 0,8%).

Несмотря на горячую точку рекомбинации между локусами DP и DQ [8, 15, 16], данные о существовании неравновесного сцепления между локусом DP и остальным комплексом HLA-генов

ТАБЛИЦА 2. ЧАСТОТЫ HLA-ГАПЛОТИПОВ, УСТАНОВЛЕННЫХ ПО ТРИ РАЗА И БОЛЕЕ

TABLE 2. FREQUENCIES OF HLA HAPLOTYPES DEFINED THREE TIMES OR MORE

Частота 7(6)-локусных HLA-гаплотипов Frequency of 7(6)-locus HLA haplotypes n (%)	HLA-гаплотипы A-B-C-DRB1- DRB3/4/5-DQA1-DQB1 HLA haplotypes A-B-C-DRB1- DRB3/4/5-DQA1-DQB1	DPA1-DPB1 аллели DPA1-DPB1 alleles	Частота 9(8)-локусных HLA-гаплотипов Frequency of 9(8)-locus HLA haplotypes n (%)
10 (2,8)	A*01:01-B*08:01-C*07:01- DRB1*03:01-DRB3*01:01-DQA- 1*05:01-DQB1*02:01/ 163N	DPA1*01:03-DPB1*04:01P DPA1*02:01-DPB1*01:01P DPA1*01:03-DPB1*04:02P DPA1*01:03-DPB1*01:01P DPA1*01:03-DPB1*02:01	3 (0,8) 3 (0,8) 2 (0,6) 1 (0,3) 1 (0,3)
6 (1,7)	A*02:01-B*13:02-C*06:02- DRB1*07:01-DRB4*01:03-DQA- 1*02:01-DQB1*02:02/156	DPA1*02:01-DPB1*17:01 DPA1*01:03-DPB1*04:01P DPA1*01:03-DPB1*04:02P DPA1*01:03-DPB1*23:01P DPA1*02:01-DPB1*14:01P	2 (0,6) 1 (0,3) 1 (0,3) 1 (0,3) 1 (0,3)
6 (1,7)	A*03:01-B*07:02-C*07:02- DRB1*15:01-DRB5*01:01-DQA- 1*01:02-DQB1*06:02	DPA1*01:03-DPB1*04:01P DPA1*02:01-DPB1*14:01P	5 (1,4) 1 (0,3)
5 (1,4)	A*02:01-B*07:02-C*07:02- DRB1*15:01-DRB5*01:01-DQA- 1*01:02-DQB1*06:02	DPA1*01:03-DPB1*04:01P DPA1*01:03-DPB1*03:01P DPA1*01:03-DPB1*04:02P DPA1*02:01-DPB1*13:01P	2 (0,6) 1 (0,3) 1 (0,3) 1 (0,3)
5 (1,4)	A*24:02-B*13:02-C*06:02- DRB1*07:01-DRB4*01:03-DQA- 1*02:01-DQB1*02:02/156	DPA1*01:03-DPB1*04:02P DPA1*01:03-DPB1*23:01P DPA1*02:01-DPB1*02:01 DPA1*02:01-DPB1*11:01	2 (0,6) 1 (0,3) 1 (0,3) 1 (0,3)
4 (1,1)	A*01:01-B*52:01-C*12:02- DRB1*15:02P-DRB5*01:02-DQA- 1*01:03-DQB1*06:01	DPA1*01:03-DPB1*04:01P DPA1*01:03-DPB1*04:02P DPA1*02:01-DPB1*13:01P DPA1*02:07-DPB1*04:01P	1 (0,3) 1 (0,3) 1 (0,3) 1 (0,3)
4 (1,1)	A*03:01-B*35:01-C*04:01- DRB1*01:01-DQA1*01:01- DQB1*05:01/263	DPA1*01:03-DPB1*04:01P	4 (1,1)
4 (1,1)	A*25:01-B*18:01-C*12:03- DRB1*15:01-DRB5*01:01-DQA- 1*01:02-DQB1*06:02	DPA1*01:03-DPB1*01:01P DPA1*01:03-DPB1*02:01 DPA1*01:03-DPB1*03:01P DPA1*01:03-DPB1*23:01P	1 (0,3) 1 (0,3) 1 (0,3) 1 (0,3)
3 (0,8)	A*01:01-B*57:01-C*06:02- DRB1*07:01-DRB4*01:03N-DQA- 1*02:01-DQB1*03:03	DPA1*01:03-DPB1*04:01P DPA1*02:01-DPB1*09:01P	2 (0,6) 1 (0,3)
3 (0,8)	A*02:01-B*38:01-C*12:03- DRB1*13:01-DRB3*01:01-DQA- 1*01:03-DQB1*06:03	DPA1*01:03-DPB1*03:01P DPA1*01:03-DPB1*04:01P DPA1*01:03-DPB1*13:01P	1 (0,3) 1 (0,3) 1 (0,3)
3 (0,8)	A*02:01-B*57:01-C*06:02- DRB1*07:01-DRB4*01:03N-DQA- 1*02:01-DQB1*03:03	DPA1*01:03 -DPB1*02:01 DPA1*01:03-DPB1*03:01P DPA1*01:03-DPB1*04:01P	1 (0,3) 1 (0,3) 1 (0,3)
3 (0,8)	A*03:01-B*07:02-C*07:02- DRB1*11:01-DRB3*02:02-DQA- 1*05:05-DQB1*03:01/ 276N	DPA1*01:03-DPB1*06:01P DPA1*01:03-DPB1*02:01	2 (0,6) 1 (0,3)

Таблица 2 (окончание)
Table 2 (continued)

Частота 7(6)-локусных HLA-гаплотипов Frequency of 7(6)-locus HLA haplotypes n (%)	HLA-гаплотипы A-B-C-DRB1- DRB3/4/5-DQA1-DQB1 HLA haplotypes A-B-C-DRB1- DRB3/4/5-DQA1-DQB1	DPA1-DPB1 аллели DPA1-DPB1 alleles	Частота 9(8)-локусных HLA-гаплотипов Frequency of 9(8)-locus HLA haplotypes n (%)
3 (0,8)	A*24:02-B*07:02-C*07:02- DRB1*15:01-DRB5*01:01-DQA- 1*01:02-DQB1*06:02	DPA1*01:03-DPB1*03:01P DPA1*01:03-DPB1*04:01P DPA1*02:01-DPB1*13:01P	1 (0,3) 1 (0,3) 1 (0,3)
3 (0,8)	A*24:02-B*35:02-C*04:01- DRB1*11:04-DRB3*02:02-DQA- 1*05:05-DQB1*03:01/276N	DPA1*01:03-DPB1*04:01P DPA1*01:03-DPB1*02:01	2 (0,6) 1 (0,3)
3 (0,8)	A*25:01-B*18:01-C*12:03- DRB1*04:01-DRB4*01:03-DQA- 1*03:01-DQB1*03:02	DPA1*01:03-DPB1*02:01 DPA1*01:03-DPB1*04:01P	2 (0,6) 1 (0,3)
3 (0,8)	A*25:01-B*18:01-C*12:03- DRB1*13:01-DRB3*01:01-DQA- 1*01:03-DQB1*06:03	DPA1*01:03-DPB1*04:01P DPA1*02:01-DPB1*01:01P	2 (0,6) 1 (0,3)

довольно противоречивы. Выраженное сцепление между отдельными *DPB1* и *DRB1*-аллелями отмечено для некоторых популяций [13, 18]. В связи с этим нами было проведено изучение неравновесного сцепления (D') между геном *DPB1* и наиболее полиморфным *HLA*-геном класса II *DRB1*. В таблице 3 представлены частоты и D' для первых 16 по распространенности *HLA*-гаплотипов *DRB1-DPB1*.

Для большинства *HLA*-гаплотипов *DRB1-DPB1* в таблице 3 значения D' были близки к 0, что указывает на отсутствие между ними неравновесного сцепления. Четыре гаплотипа характеризовались отрицательными значениями D' , т. е. эти аллели в этих гаплотипах встречались реже, чем должны были быть при случайном сочетании, «отталкивались» друг от друга. Сильное сцепление аллелей ($D' > 0,5$) имел только один гаплотип *DRB1*03:01-DPB1*01:01P* ($D' = 0,579$). Из непредставленных в таблице 3 гаплотипов выраженным неравновесным сцеплением между аллелями характеризовались еще два гаплотипа. Это *DRB1*07:01-DPB1*17:01* ($D' = 0,808$). Аллель *DPB1*17:01* был определен 6 раз, из которых пять раз в гаплотипе с *DRB1*07:01*. Второй гаплотип – *DRB1*09:01-DPB1*04:02P* ($D' = 0,502$). Аллель *DRB1*09:01* был определен 7 раз, из которых четыре раза в гаплотипе с *DPB1*04:02P*.

Так как по расположению на хромосоме наиболее близко к локусу *DP* расположен ген *DQB1* [31], был исследовано неравновесное сцепление (D') между аллелями этих генов, но анализ показал его отсутствие (для всех сочетаний аллелей *DQB1* и *DPB1* $D' < 0,3$).

NGS позволяет проводить полногеномное секвенирование *HLA*-аллелей класса I и типировать их на уровне отдельного аллеля, учитывая синонимичные замены в экзонах (уровень 3-го поля) и некодирующих областях (уровень 4-го поля). В таблице 4 представлены частоты *HLA*-гаплотипов, определенных 3 раза и более, с аллельным уровнем разрешения для генов класса I и максимально возможным для генов класса II. Наиболее распространенным 7-локусным *HLA*-гаплотипом являлся *A*03:01:01:01-B*07:02:01:01-C*07:02:01:03-DRB1*15:01:01:03/07/11-DRB5*01:01:01:01-DQA1*01:02:01:01-DQB1*06:02*, определенный четыре раза, в трех из которых данный гаплотип встречался с аллелями *DPA1*01:03:01-DPB1*04:01P*. Все остальные 9-локусные гаплотипы были установлены только по одному разу.

Обсуждение

Проведенное исследование установило реальные 7- и 9-локусные *HLA*-гаплотипы в семьях больных с заболеваниями системы крови, в которых больным и членам их семей было назначено *HLA*-типирование для поиска донора алло-ГСК. Публикации, посвященные наследованию *HLA*-гаплотипов в семьях, в доступной литературе в России отсутствуют. Однако именно *HLA*-гаплотипы, установленные в семейных исследованиях, действительно существуют в человеческой популяции и могут быть использованы в клинической практике в качестве референсных для анализа результатов *HLA*-типирования и предсказания ожидаемых *HLA*-гаплотипов. Знания о реальных *HLA*-гаплотипах стали особенно

ТАБЛИЦА 3. НЕРАВНОВЕСНОЕ СЦЕПЛЕНИЕ В HLA-ГАПЛОТИПАХ DRB1-DPB1

TABLE 3. LINKAGE DISEQUILIBRIUM IN HLA HAPLOTYPES DRB1-DPB1

	HLA-гаплотипы HLA haplotypes	Частота гаплотипов Frequency of haplotypes n (%)	D'
1	DRB1*15:01-DPB1*04:01P	19 (5,3)	0,034
2	DRB1*01:01-DPB1*04:01P	16 (4,4)	0,108
3	DRB1*07:01-DPB1*04:01P	16 (4,4)	-0,194
4	DRB1*11:01-DPB1*04:01P	15 (4,2)	0,135
5	DRB1*03:01-DPB1*04:01P	12 (3,3)	-0,083
6	DRB1*13:01-DPB1*04:01P	11 (3,1)	-0,035
7	DRB1*04:01-DPB1*04:01P	9 (2,5)	0,382
8	DRB1*16:01-DPB1*04:01P	9 (2,5)	0,135
9	DRB1*03:01-DPB1*01:01P	8 (2,2)	0,579
10	DRB1*01:01-DPB1*04:02P	7 (1,9)	0,085
11	DRB1*07:01-DPB1*03:01P	6 (1,7)	0,031
12	DRB1*07:01-DPB1*04:02P	6 (1,7)	-0,081
13	DRB1*11:04-DPB1*04:01P	6 (1,7)	0,011
14	DRB1*11:04-DPB1*04:02P	6 (1,7)	0,336
15	DRB1*15:01-DPB1*03:01P	6 (1,7)	0,044
16	DRB1*15:02P-DPB1*04:01P	6 (1,7)	0,213

ТАБЛИЦА 4. ЧАСТОТЫ HLA-ГАПЛОТИПОВ (АЛЛЕЛЬНОЕ РАЗРЕШЕНИЕ ДЛЯ HLA-ГЕНОВ КЛАССА 1), ОПРЕДЕЛЕННЫХ 3 РАЗА И БОЛЕЕ

TABLE 4. HLA HAPLOTYPE FREQUENCIES (ALLELIC RESOLUTION FOR HLA CLASS 1 GENES) DEFINED 3 TIMES OR MORE

Частота 7(6)-локусных HLA-гаплотипов Frequency of 7(6)-locus HLA haplotypes n (%)	HLA-гаплотипы A-B-C-DRB1-DRB3/4/5- DQA1-DQB1 HLA haplotypes A-B-C-DRB1-DRB3/4/5- DQA1-DQB1	DPA1-DPB1 аллели DPA1-DPB1 alleles	Частота 9(8)-локусных HLA-гаплотипов Frequency of 9(8)-locus HLA haplotypes n (%)
4 (1,1)	A*03:01:01:01-B*07:02:01:01-C*07:02:01:03- DRB1*15:01:01:03/07/11-DRB5*01:01:01:01- DQA1*01:02:01:01-DQB1*06:02	DPA1*01:03:01-DP- B1*04:01P DPA1*02:01:01:02-DP- B1*14:01P	3 (0,8) 1 (0,3)
3 (0,8)	A*01:01:01:01-B*08:01:01:01- C*07:01:01:01/16-DRB1*03:01:0- DRB3*01:01:02:01/06-DQA1*05:01:01:02- DQB1*02:01:01:01/02:163N	DPA1*01:03:01-DP- B1*01:01P DPA1*01:03:01- DPB1*02:01:02D- PA1*01:03:01-DP- B1*04:01P	1 (0,3) 1 (0,3) 1 (0,3)
3 (0,8)	A*02:01:01:01-B*13:02:01:01-C*06:02:01:01- DRB1*07:01:01:01-DRB4*01:03:01- DQA1*02:01:01:01/03 DQB1*02:02/156	DPA1*01:03:01-DP- B1*23:01P DPA1*02:01:01:02-DP- B1*14:01P DPA1*02:01:01:03- DPB1*17:01:01	1 (0,3) 1 (0,3) 1 (0,3)

актуальными в последнее время, когда наблюдается постоянный рост числа трансплантаций аллогенных гемопоэтических стволовых клеток, в первую очередь – HLA-гаплоидентичных трансплантаций [23].

В последние годы в России достаточно подробно изучалось распределение HLA-гаплотипов в регистрах доноров костного мозга/гемопоэтических стволовых клеток [1, 2, 3, 4]. При этом у доноров регистров HLA-гаплотипы оценивались при помощи EM-алгоритма, однако известно, что при его использовании наблюдается завышение частоты высокочастотных HLA-гаплотипов и занижение частоты низкочастотных [22]. HLA-гаплотипы, установленные в нашем исследовании, и HLA-гаплотипы, ранее определенные для доноров из регистров неродственных доноров алло-ГСК, обладают как значительной схожестью в распределении и частоте, так и некоторыми отличиями. Так, в укороченном 5-локусном варианте (A-B-C)-DRB1-DQB1 гаплотипы A*01:01-B*08:01-C*07:01-DRB1*03:01-(DRB3*01:01-DQA1*05:01)-DQB1*02:01/163N, и A*03:01-B*07:02-C*07:02-DRB1*15:01-(DRB5*01:01-DQA1*01:02)-DQB1*06:02 являются первым и вторым по распространенности HLA-гаплотипами в большинстве российских регистров. Частоты этих гаплотипов для доноров регистров колеблются от 3% до 4% для первого и от 2,3% до 3% для второго [1, 2, 3, 4]. В семьях больных с показателями к алло-ГСК их частоты несколько ниже, что объясняется несколькими причинами: применением EM-алгоритма для подсчета частот HLA-гаплотипов у доноров регистров, разным числом типированных HLA-генов и разным уровнем разрешения, а также тем, что в ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России лечатся больные с различным этническим происхождением из всех Федеральных округов России, а в регистрах доноров в основном преобладают русские. HLA-гаплотип A*03:01-B*35:01-C*04:01-DRB1*01:01-DQA1*01:01-DQB1*05:01/263 в семьях больных занимал только 6-7-е место с частотой 1,1% и определялся только с генами DPA1*01:03-DPB1*04:01P, при этом в нашем исследовании не отмечено сильного неравновесного сцепления между DRB1*01:01 и DPB1*04:01P. Этот HLA-гаплотип (без DPA1-DPB1) является первым по распространенности у финнов с частотой 8,3% [18] и выявляется у них в основном с аллелем DPB1*04:02. У доноров регистров с преобладанием русских A*03:01-B*35:01-C*04:01-DRB1*01:01-(DQA1*01:01)-DQB1*05:01/263 обычно занимает третье место по распространенности с частотой 2,4 % [1, 3, 4], являясь первым по распространенности среди доноров регистра ФГБУН КНИИГиПК ФМБА России с частотой 3,2% [2].

Следовательно, в приведенных публикациях по распределению HLA-гаплотипов в россий-

ских регистрах достаточно объективно отражается реальное распределение HLA-гаплотипов в нашей популяции, и для больных с распространенными HLA-гаплотипами вероятность найти совместимого донора в российских регистрах достаточно велика.

Наше исследование является первой в России работой, в которой изучены мультилокусные HLA-гаплотипы A-B-C-DRB1-DRB3/4/5/-DQA1-DQB1-DPA1-DPB1 на основании типирования 11 HLA-генов. Хотя минимальные требования при подборе неродственного донора для алло-ГСК предписывают HLA-типировать донора и реципиента по четырем HLA-генам -A, -B, -C, -DRB1 [9], определение гена DPB1, в дополнении к генам A, -B, -C, -DRB1 с использованием методов, основанных на секвенировании, настоятельно рекомендуется для всех источников доноров в США [32, 34]. Также рекомендуется проводить типирование HLA-генов DRB3/4/5, -DQA1, -DQB1 и -DPA1 (характеризуются более низкой экспрессией) на уровне высокого разрешения для выбора донора наибольшего соответствия и минимизации риска развития донор-специфических анти-HLA антител [34].

Неравновесное сцепление между локусом HLA-DP и другими HLA-генами в большинстве популяций выражено слабо ($D' \sim 0,3$) [7]. Как показало наше исследование, из-за горячей точки рекомбинации большинство 7-локусных гаплотипов соединяются в 9-локусных гаплотипах с различными аллелями генов локуса HLA-DP. Однако мы также выявили существование достаточно сильного неравновесного сцепления между некоторыми аллелями генов DRB1 и DPB1. Неравновесное сцепление между определенными аллелями DPB1 и другими HLA-генами наблюдается в некоторых популяциях, например у финнов, популяция которых была относительно изолирована и проходила несколько раз через «бутылочное горло» [18]. Для нескольких европейских популяций [13, 18], как и для исследованных нами семей больных, было отмечено достаточно сильное неравновесное сцепление аллелей DRB1*03:01-DPB1*01:01P, входящих в HLA-гаплотип A*01:01-B*08:01-C*07:01-DRB1*03:01-DRB3*01:01-DQA1*05:01-DQB1*02:01/163N-DPA1*02:01-DPB1*01:01P. Также мы установили сильное неравновесное сцепление между аллелями DRB1*07:01-DPB1*17:01 и DRB1*09:01-DPB1*04:02P. HLA-гаплотип DRB1*07:01-DPB1*17:01 распространен среди китайцев [14] и монголов [33], DRB1*09:01-DPB1*04:02P встречается у монголов [33], однако сведений о неравновесном сцеплении аллелей в данных гаплотипах в этих популяциях нет.

Существование нескольких HLA-гаплотипов с сильным неравновесным сцеплением между аллелями HLA-DPB1 и HLA-DRB1 повышает вероятность нахождения полностью совместимого

неродственного донора для больного-носителя таких гаплотипов даже в тех случаях, когда типирование гена *HLA-DPB1* не проводится. Однако такие HLA-гаплотипы весьма немногочисленны, большая часть HLA-гаплотипов характеризуется слабым сцеплением с локусом HLA-*HLA-DP*. Наблюдение о выраженном неравновесном сцеплении между некоторыми аллелями *HLA-DPB1* и *HLA-DRB1*, конечно, требует подтверждения на более многочисленной когорте исследований.

Итак, установлены реальные 7- и 9-локусные HLA-гаплотипы, существующие в семьях больных с назначением к HLA-типированию для проведения трансплантации аллогенных гемопоэтических стволовых клеток, которые могут быть использованы в клинической практике в качестве референсных для анализа результатов HLA-типирования и предсказания ожидаемых HLA-гаплотипов.

Показано, что, несмотря на существование горячей точки рекомбинации между локусом HLA-*DP* и остальным комплексом HLA-генов, наблюдается сильное неравновесное сцепление между некоторыми аллелями генов *HLA-DPB1* и *HLA-DRB1*.

Заключение

Итак, установлены реальные 7- и 9-локусные HLA-гаплотипы, существующие в семьях больных с назначением к HLA-типированию для проведения трансплантации аллогенных гемопоэтических стволовых клеток, которые могут быть использованы в клинической практике в качестве референсных для анализа результатов HLA-типирования и предсказания ожидаемых HLA-гаплотипов.

Показано, что, несмотря на существование горячей точки рекомбинации между локусом HLA-*DP* и остальным комплексом HLA-генов, наблюдается сильное неравновесное сцепление между некоторыми аллелями генов *HLA-DPB1* и *HLA-DRB1*.

Благодарности

Авторы выражают благодарность всем сотрудникам ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России, занимающихся трансплантацией аллогенных гемопоэтических стволовых клеток у больных с заболеваниями системы крови, без которых это исследование было бы неосуществимо.

Список литературы / References

1. Бубнова Л.Н., Кузьмич Е.В., Павлова И.Е., Беляева Е.В., Терентьева М.А. Сравнительный анализ иммуногенетических характеристик потенциальных доноров гемопоэтических стволовых клеток регистров двух российских мегаполисов // Медицинская иммунология, 2022. Т. 24, № 5. С. 1047-1056. [Bubnova L.N., Kuzmich E.V., Pavlova I.E., Belyaeva E.V., Terentyeva M.A. Comparative analysis of immunogenetic characteristics of potential hematopoietic stem cell donors from the registries of two Russian megapolises. *Meditsinskaya Immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2022, Vol. 24, no. 5, pp. 1047-1056. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-CAO-2539.
2. Логинова М.А., Парамонов И.В. Стратегия формирования регистра потенциальных доноров гемопоэтических стволовых клеток // Российский журнал детской гематологии и онкологии, 2020. Т. 7, № 4. С. 35-42. [Loginova M.A., Paramonov I.V. Development strategy of the registry of donors of hematopoietic stem cells. *Rossiyskiy zhurnal detskoy gematologii i onkologii = Russian Journal of Pediatric Hematology and Oncology*, 2020, Vol. 7, no. 4, pp. 35-42. (In Russ.)]
3. Хамаганова Е.Г., Абдрахимова А.Р., Леонов Е.А., Хижинский С.П., Гапонова Т.В., Савченко В.Г. Секвенирование следующего поколения в HLA-типировании больных с показаниями к трансплантации аллогенных гемопоэтических стволовых клеток и их доноров // Гематология и трансфузиология, 2021. Т. 66, № 2. С. 206-217. [Khamaganova E.G., Abdrakhimova A.R., Leonov E.A., Khizhinskiy S.P., Gaponova T.V., Savchenko V.G. Next generation sequencing HLA-typing of recipients and donors of allogeneic haematopoietic stem cells. *Gematologiya i transfuziologiya = Russian Journal of Hematology and Transfusiology*, 2020, Vol. 66, no. 2, pp. 206-217. (In Russ.)]
4. Хамаганова Е.Г., Леонов Е.А., Абдрахимова А.Р., Хижинский С.П., Гапонова Т.В., Савченко В.Г. HLA генетическое разнообразие русской популяции, выявленное методом секвенирования следующего поколения // Медицинская иммунология, 2021. Т. 23, № 3. С. 509-522. [Khamaganova E.G., Leonov E.A., Abdrakhimova A.R., Khizhinskiy S.P., Gaponova T.V., Savchenko V.G. HLA diversity in the Russian population assessed by next generation sequencing. *Meditsinskaya Immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2021, Vol. 23, no. 3, pp. 509-522. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-HDI-2182.
5. Askar M., Madbouly A., Zhrebker L., Willis A., Kennedy S., Padros K., Rodriguez M.B., Bach C., Spriewald B., Ameen R., Shemmarif S.A., Tarassi K., Tsirogianni A., Hamdy N., Mossallam G., Höngeri G., Spinnler R., Fischer G., Fae I., Charlton R., Dunk A., Vayntrub T.A., Halagan M., Osoegawa K., Fernández-Viña M. HLA haplotypes in 250 families: the Baylor laboratory results and a perspective on a core NGS testing model for the 17th International HLA and Immunogenetics Workshop. *Hum. Immunol.*, 2019, Vol. 80, no. 11, pp. 897-905.
6. Bugawan T.L., Klitz W., Blair A., Erlich H.A. High-resolution HLA class I typing in the CEPH families: analysis of linkage disequilibrium among HLA loci. *Tissue Antigens*, 2000, Vol. 56, no. 5, pp. 392-404.
7. Creary L.E., Sacchi N., Mazzocco M., Morris G.P., Montero-Martin G., Chong W., Brown C., Dinou A., Stavropoulos-Giokas C., Gorodezky C., Narayan S., Periathiruvadi S., Thomas R., de Santis D., Pepperall J.,

Ghazalim G.E., Yafeim Z.A., Askar M., Tyagi S., Kanga U., Marino S.R., Planelles D., Chang C.J., Fernández-Viña M.A. High-resolution HLA allele and haplotype frequencies in several unrelated populations determined by next generation sequencing: 17th International HLA and Immunogenetics Workshop joint report. *Hum. Immunol.*, 2021, Vol. 82, no. 7, pp. 505-522.

8. Cullen M., Noble J., Erlich H., Thorpe K., Beck S., Klitz W., Trowsdale J., Carrington M. Characterization of recombination in the HLA class II region. *Am. J. Hum. Genet.*, 1997, Vol. 60, no. 2, pp. 397-407.

9. Dehn J., Setterholm M., Buck K., Kempenich J., Beduhn B., Gragert L., Abeer Madbouly A., Fingerson S., Maiers M. HapLogic: a predictive human leukocyte antigen-matching algorithm to enhance rapid identification of the optimal unrelated hematopoietic stem cell sources for transplantation. *Biol. Blood Marrow Transplant.*, 2016, Vol. 22, no. 11, pp. 2038-2046.

10. Excoffier L., Lischer H.E. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Mol. Ecol. Resour.*, 2010, Vol. 10, no. 3, pp. 564-567.

11. Gragert L., Madbouly A., Freeman J., Maiers M. Six-locus high resolution HLA haplotype frequencies derived from mixed-resolution DNA typing for the entire US donor registry. *Hum. Immunol.*, 2013, Vol. 74, no. 10, pp. 1313-1320.

12. Gragert L., Eapen M., Williams E., Freeman J., Spellman S., Baitty R., Hartzman R., Rizzo J.D., Horowitz M., Confer D., Maiers M. HLA match likelihoods for hematopoietic stem-cell grafts in the U.S. registry. *N. Engl. J. Med.*, 2014, Vol. 371, no. 4, pp. 339-348.

13. Grundschober C., Sanchez-Mazas A., Excoffier L., Langaney A., Jeannet M., Tiercy J.M. HLA-DPB1 DNA polymorphism in the Swiss population: linkage disequilibrium with other HLA loci and population genetic affinities. *Eur. J. of Immunogenet.*, 1994, Vol. 21, no. 3, pp. 143-157.

14. Gua Q., Chen J., Yao Y., Sun M., Shi L. Distribution of HLA-DRB1, DPB1 and DQB1 alleles and haplotypes in Mongolian Minority in China. *Hum. Immunol.*, 2019, Vol. 80, no. 4, pp. 215-217.

15. Jeffreys A.J., Kauppi L., Neumann R. Intensely punctate meiotic recombination in the class II region of the major histocompatibility complex. *Nat. Genet.*, 2001, Vol. 29, no. 2, pp. 217-222.

16. Kauppi L., Stumpf M.P., Jeffreys A.J. Localized breakdown in linkage disequilibrium does not always predict sperm crossover hot spots in the human MHC class II region. *Genomics*, 2005, Vol. 86, no. 1, pp. 13-24.

17. Klitz W., Gragert L., Maiers M., Fernandez-Vina M., Ben-Naeh Y., Benedek G., Brautbar C., Israel S. Genetic differentiation of Jewish populations. *Tissue Antigens*, 2010, Vol. 76, no. 6, pp. 442-458.

18. Linjama T., Räther C., Ritari J., Peräsaari J., Eberhard H.P., Korhonen M., Koskela S. Extended HLA haplotypes and their impact on DPB1 matching of unrelated hematologic stem cell transplant donors. *Biol. Blood Marrow Transplant.*, 2019, Vol. 25, no. 10, pp. 1956-1964.

19. Maiers M., Gragert L., Klitz W. High-resolution HLA alleles and haplotypes in the United States population. *Hum. Immunol.*, 2007, Vol. 68, no. 9, pp. 779-788.

20. Malfroy L., Roth M.P., Carrington M., Borot N., Volz A., Ziegler A., Coppin H. Heterogeneity in rates of recombination in the 6-Mb region telomeric to the human major histocompatibility complex. *Genomics*, 1997, Vol. 43, no. 2, pp. 226-231.

21. Nunes E., Heslop H., Fernandez-Vina M., Taves C., Wagenknecht D.R., Eisenbrey A.B., Fischer G., Poulton K., Wacker K., Hurley C.K., Noreen H., Sacchi N. Definitions of histocompatibility typing terms. *Human Immunol.*, 2011, Vol. 72, no. 12, pp. 1214-1216.

22. Osoegawa K., Mallempati K.C., Gangavarapu S., Gangavarapu S., Oki A., Gendzekhadze K., Marino S.R., Brown N.K., Bettinotti M.P., Weimer E.T., Montero-Martín G., Creary L.E., Vayntrub T.A., Chang C.-J., Askar M., Mack S.J., Fernández-Viña M.A. HLA Alleles and Haplotypes Observed in 263 US Families. *Hum. Immunol.*, 2019, Vol. 80, no. 9, pp. 644-660.

23. Passweg J.R., Baldomero H., Chabannon C., Basak G.W., de la Cámara R., Corbacioglu S., Dolstra H., Duarte R., Glass B., Greco R., Lankester A.C., Mohty M., Peffault de Latour R., Snowden J.A., Yakoub-Agha I., Kröger N. Hematopoietic cell transplantation and cellular therapy survey of the EBMT: monitoring of activities and trends over 30 years. *Bone Marrow Transplant.*, 2021, Vol. 56, no. 7, pp. 1651-1664.

24. Petersdorf E.W., Malkki M., Gooley T.A., Martin P.J., Guo Z. MHC haplotype matching for unrelated hematopoietic cell transplantation. *PLoS Med.*, 2007, Vol. 4, no. 1, e8. doi: 10.1371/journal.pmed.0040008.

25. Qin P.Q., Su F., Yan W.X., Xing Z., Meng P., Chengya W., Jie S. Distribution of human leucocyte antigen-A, -B and -DR alleles and haplotypes at high resolution in the population from Jiangsu province of China. *Int. J. Immunogenet.*, 2011, Vol. 38, no. 6, pp. 475-481.

26. Schmidt A.H., Baier D., Solloch U.V., Stahr A., Cereb N., Wassmuth R., Ehninger G., Rutt C. Estimation of high-resolution HLA-A, -B, -C, -DRB1 allele and haplotype frequencies based on 8862 German stem cell donors and implications for strategic donor registry planning. *Hum. Immunol.*, 2009, Vol. 70, no. 11, pp. 895-902.

27. Slater N., Louzoun Y., Gragert L., Maiers M., Chatterjee A., Albrecht M. Power laws for heavy-tailed distributions: modeling allele and haplotype diversity for the national marrow donor program. *PLoS Comput. Biol.*, 2015, Vol. 11, no. 4, e1004204. doi: 10.1371/journal.pcbi.1004204.

28. Slatkin M. Linkage disequilibrium-understanding the evolutionary past and mapping the medical future. *Nat. Rev. Genet.*, 2008, Vol. 9, no. 6, pp. 477-485.

29. Stewart C.A., Horton R., Allcock R.J., Ashurst J.L., Atrazhev A.M., Penny Coggill P., Dunham I., Forbes S., Halls K., Howson J.M.M., Humphray S.J., Hunt S., Mungall A.J., Osoegawa K., Palmer S., Roberts A.N., Rogers J., Sims S., Wang Y., Wilming L.G., Elliott J.F., de Jong P.J., Sawcer S., Todd J.A., Trowsdale J., Beck S. Complete MHC haplotype sequencing for common disease gene mapping. *Genome Res.*, 2004, Vol. 14, no. 6, pp. 1176-1187.

30. Thorstenson Y.R., Creary L.E., Huang H., Rozot V., Nguyen T.T., Babrzadeh F., Kancharla S., Fukushima M., Kuehn R., Wang C., Li M., Krishnakumar S., Mindrinis M., Fernandez Viña M. A., Scriba T.J., Davis M.M. Allelic resolution NGS HLA typing of class I and class II loci and haplotypes in Cape Town, South Africa. *Hum. Immunol.*, 2018, Vol. 79, no. 12, pp. 839-847.

31. Tiercy J.M. How to select the best available related or unrelated donor of hematopoietic stem cells? *Haematologica*, 2016, Vol. 101, no. 6, pp. 680-687.

32. Timofeeva O.A., Philogene M.C., Zhang Q.J. Current donor selection strategies for allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Hum. Immunol.*, 2022, Vol. 83, no. 10, pp. 674-686.

33. Trachtenberg E., Vinson M., Hayes E., Hsu Y.-M., Houtchens K., Erlich H., Klitz W., Hsia Y., Hollenbach J. HLA class I (A, B, C) and class II (DRB1, DQA1, DQB1, DPB1) alleles and haplotypes in the Han from southern China. *Tissue Antigens*, 2007, Vol. 70, no. 6, pp. 455-463.

34. Yu N., Askar M., Wadsworth K., Gragert L., Fernández-Viña M.A. Current HLA testing recommendations to support HCT. *Hum. Immunol.*, 2022, Vol. 83, no. 10, pp. 665-673.

35. Zhang T., Li Y., Yuan X., Bao X., Chen L., Jiang X., He J. Establishment of NGS-based HLA 9-locus haplotypes in the Eastern Han Chinese population highlights the role of HLA-DP in donor selection for transplantation. *HLA*, 2022, Vol. 100, no. 6, pp. 582-596.

Авторы:

Хамаганова Е.Г. — д.б.н., заведующая лабораторией тканевого типирования ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Хижинский С.П. — врач лаборатории тканевого типирования ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Абдрахимова А.Р. — научный сотрудник лаборатории тканевого типирования ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Кузьмина Е.П. — к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории тканевого типирования ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Леонов Е.А. — врач лаборатории тканевого типирования ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Покровская О.С. — к.м.н., заведующая отделением предтрансплантационной подготовки ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Кузьмина Л.А. — к.м.н., заведующая отделением химиотерапии гемобластозов и трансплантации костного мозга и гемопоэтических стволовых клеток ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Паровичникова Е.Н. — д.м.н., генеральный директор ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Authors:

Khamaganova E.G., PhD, MD (Biology), Head, Laboratory of Tissue Typing, National Medical Research Center for Hematology, Moscow, Russian Federation

Khizhinskiy S.P., Clinical Resident, Laboratory of Tissue Typing, National Medical Research Center for Hematology, Moscow, Russian Federation

Abdrakhimova A.R., Research Associate, Laboratory of Tissue Typing, National Medical Research Center for Hematology, Moscow, Russian Federation

Kuzminova E.P., PhD (Biology), Senior Research Associate, Laboratory of Tissue Typing, National Medical Research Center for Hematology, Moscow, Russian Federation

Leonov E.A., Clinical Resident, Laboratory of Tissue Typing, National Medical Research Center for Hematology, Moscow, Russian Federation

Pokrovskaya O.S., PhD (Medicine), Head, Department of Pre-transplant Preparation, National Medical Research Center for Hematology, Moscow, Russian Federation

Kuzmina L.A., PhD (Medicine), Head, Department of Chemotherapy of Hemoblastosis and Transplantation of Bone Marrow and hematopoietic stem cells, National Medical Research Center for Hematology, Moscow, Russian Federation

Parovichnikova E.N., PhD, MD (Medicine), Professor, General Director, National Medical Research Center for Hematology, Moscow, Russian Federation

Поступила 06.02.2023

Отправлена на доработку 07.02.2023

Принята к печати 16.02.2023

Received 06.02.2023

Revision received 07.02.2023

Accepted 16.02.2023

ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНОВ ПРОВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ИНТЕРЛЕЙКИНОВ ПРИ ПЕРВИЧНОЙ ОТКРЫТОУГОЛЬНОЙ ГЛАУКОМЕ

Барычева Л.Ю., Какулия Д.М., Минасян М.М., Кузнецова В.В.,
Козьмова Н.А.

ФГБОУ ВО «Ставропольский государственный медицинский университет» Министерства
здравоохранения РФ, г. Ставрополь, Россия

Резюме. Глаукома – дегенеративное заболевание зрительного нерва, сопровождающееся гибелью ганглиозных клеток сетчатки (ГКС) и потерей зрения. Важную роль в патогенезе глаукомы играет активированная микроглия, продуцирующая провоспалительные интерлейкины и инициирующая апоптоз ГКС. Установлено, что однонуклеотидные полиморфизмы генов интерлейкинов модифицируют развитие нейровоспаления, однако их влияние на риск развития глаукомы до конца не установлено.

Цель – определить патогенетическую роль полиморфизмов генов *TNF α* и *IL 1 β* в развитии первичной открытоугольной глаукомы.

Обследованы 56 пациентов русской национальности Юга России с первичной открытоугольной глаукомой (ПОУГ), 28 пациентов с I стадией, 16 – со II стадией, 12 – с III стадией ПОУГ. Исследовали однонуклеотидные полиморфизмы *TNF α 308G>A* (rs1800629) и *IL1 β -31 T>C* (rs1143627) методом рестрикции продуктов амплификации. Уровень провоспалительных цитокинов в слезной жидкости *TNF α* и *IL1 β* у пациентов с ПОУГ исследовали посредством твердофазного иммуноферментного анализа (тест-системы АО «Вектор-Бест»). Оптическая когерентная томография выполнялась на аппарате "Торсон" 3D OCT 1000 с определением толщины слоя нервных волокон сетчатки (СНВС), объема и площади нейроретинального пояса.

У пациентов с ПОУГ чаще встречались аллели *TNF α 308A* ($OR = 5,21, p = 0,001$) и *IL1 β -31T* ($OR = 1,99, p = 0,04$). Увеличение риска развития ПОУГ установлено у носителей генотипов *308A/A* ($OR = 6,30, p = 0,049$), *308G/A* ($OR = 3,60, p = 0,049$) и *-31T/T* ($OR = 2,67, p = 0,04$). Наиболее высокие показатели *TNF α* определялись в группе *308A/A* (190 (153,0-220,0) пкг/мл), *IL1 β* – в группе *(-31) T/T* – 6,50 (4,10-7,00) пкг/мл. Уменьшение толщины нервных волокон сетчатки установлено у обладателей генотипов *TNF α G308A* – 59,5 (40,0-78,0), $p = 0,03$ и *TNF α A308A* – 79,0 (65,0-80,0) мкм, $p = 0,001$.

Полиморфизмы генов цитокинов *TNF α 308 G/A* (rs1800629), *IL1 β -31T/C* (rs1143627); *IL-10 512C/A* (rs1800872) взаимосвязаны с развитием первичной открытоугольной глаукомы. Факторами риска ПОУГ России являются аллели *TNF α 308A*, *IL1 β -31T*, а также генотипы *308G/A*, *308A/A* и *-31T/T*.

Адрес для переписки:

Барычева Людмила Юрьевна
ФГБОУ ВО «Ставропольский государственный
медицинский университет» Министерства
здравоохранения РФ
355017, Россия, г. Ставрополь, ул. Мира, 310.
Тел.: 8 (918) 740-54-84.
E-mail: for_ludmila@inbox.ru

Address for correspondence:

Liudmila Yu. Barycheva
Stavropol State Medical University
310 Mira St
Stavropol
355017 Russian Federation
Phone: +7 (918) 740-54-84.
E-mail: for_ludmila@inbox.ru

Образец цитирования:

Л.Ю. Барычева, Д.М. Какулия, М.М. Минасян,
В.В. Кузнецова, Н.А. Козьмова «Полиморфизм генов
провоспалительных интерлейкинов при первичной
открытоугольной глаукоме» // Медицинская
иммунология, 2024. Т. 26, № 2. С. 303-312.
doi: 10.15789/1563-0625-POP-2878

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

For citation:

L.Yu. Barycheva, D.M. Kakulia, M.M. Minasyan,
V.V. Kuznetsova, N.A. Kozmova "Polymorphism of pro-
inflammatory interleukin genes in primary open-angle
glaucoma", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya
Immunologiya, 2024, Vol. 26, no. 2, pp. 303-312.
doi: 10.15789/1563-0625-POP-2878

© Barycheva L.Yu. et al., 2024
The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License
DOI: 10.15789/1563-0625-POP-2878

Высокое содержание $TNF\alpha$ в слезной жидкости выявлено у резидентов генотипа $308A/A$, $IL1\beta$ – генотипа $-31T/T$. Наименьшая толщина слоя нервных волокон сетчатки определялась у обладателей генотипов $TNF\alpha A308A$ и $TNF\alpha G308A$.

Ключевые слова: первичная открытоугольная глаукома, генный полиморфизм

POLYMORPHISM OF PRO-INFLAMMATORY INTERLEUKIN GENES IN PRIMARY OPEN-ANGLE GLAUCOMA

Barycheva L. Yu., Kakulia D. M., Minasyan M. M., Kuznetsova V. V.,
Kozmova N. A.

Stavropol State Medical University, Stavropol, Russian Federation

Abstract. Glaucoma is a degenerative disease of the optic nerve, accompanied by the death of retinal ganglion cells (RGCs) and loss of vision. An important role in the pathogenesis of glaucoma is ascribed to activated microglia, which produce pro-inflammatory interleukins and initiate GCS apoptosis. It has been established that single nucleotide polymorphisms of interleukin genes modify the development of neuroinflammation, but their effect on the risk of developing glaucoma is not yet fully established. Our aim was to determine the pathogenetic role of gene polymorphisms in $TNF\alpha$ and $IL1\beta$ in the development of primary open-angle glaucoma.

We have observed 56 patients of Russian nationality from the South of Russia with primary open-angle glaucoma (POAG), 28 patients with stage I, 16 with stage II, 12 with stage III POAG. The single nucleotide polymorphisms $TNF\alpha 308G>A$ (rs1800629) and $IL1\beta -31 T>C$ (rs1143627) were studied by restriction fragment analysis of PCR products. The level of pro-inflammatory cytokines ($TNF\alpha$ and $IL1\beta$) in the lacrimal fluid of patients with POAG was evaluated by enzyme-linked immunosorbent assay (Vector-Best test system). To perform optical coherence tomography by analysing the thickness of retinal nerve fiber layer (RNFL) with volume and area of the neuroretinal rim using Torson 3D OST 1000 apparatus.

Results: in patients with POAG, we have found more common incidence of $TNF\alpha 308A$ (OR = 5.21, $p = 0.001$), and $IL1\beta -31 T$ alleles (OR = 1.99, $p = 0.04$). An increased risk of developing POAG was found in carriers of genotypes $308A/A$ (OR = 6.30, $p = 0.049$), $308G/A$ (OR = 3.60, $p = 0.049$) and $-31T/T$ (OR = 2.67, $p = 0.04$). The highest levels of $TNF\alpha$ were determined in the $308A/A$ group (190 (153.0–220.0) pg/mL), $IL1\beta$ were in the group $(-31) T/T$ – 6.50 (4.10–7.00) pg/mL. A decreased thickness of the retinal nerve fibers was observed in the patients with $TNF\alpha G308A$ genotype (59.5; 40.0 to 78.0 μm , $p = 0.03$), and in $TNF\alpha A308A$ carriers (79.0; 65.0 to 80.0 μm , $p = 0.001$).

The $TNF\alpha 308 G/A$ (rs1800629), along with $IL1\beta, -31T/C$ (rs1143627) cytokine gene polymorphisms are associated with development of primary open-angle glaucoma. $TNF\alpha 308A, IL1\beta -31T$ alleles, as well as the $308G/A, 308A/A$ and $-31T/T$ genotypes seem to be the risk factors for POAG in Russian population. High content of $TNF\alpha$ in the lacrimal fluid was found in the carriers of $308A/A$ genotype and $-31T/T$ $IL1\beta$ genotype. The lowest thickness of the retinal nerve fiber layer was observed in the carriers of $TNF\alpha A308A$ and $TNF\alpha G308A$ genotypes.

Keywords: primary open-angle glaucoma, $TNF\alpha, IL1\beta$, gene polymorphism

Список сокращений и терминов

ВГД – внутриглазное давление; ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота; НПП – нейроретинальный поясок; ОСТ – оптическая когерентная томография; ПОУГ – первичная открытоугольная глаукома; СНВС – слой нервных волокон сетчатки; CI – доверительный интервал; $IL-1\beta, IL-2, IL-6, IL-12$ – интерлейкины $1\beta, 2, 6, 12$; OR (Oddis ratio) – анализ шансов; RFLP analysis – анализ полиморфизма длин рестрикционных фрагментов; SNP – Single Nucleotide

Polymorphism, полиморфизм одиночных нуклеотидов; $TNF\alpha$ – фактор некроза опухолей-альфа.

Введение

Первичная открытоугольная глаукома (ПОУГ) является одной из ведущих причин слепоты во всем мире и характеризуется отсроченной диагностикой и неутешительным прогнозом [9, 15]. Показано, что нейровоспаление является одним из ключевых механизмов, способствующих

формированию глаукоматозной нейропатии [9]. Развитие воспалительного ответа, связанного с увеличением внутриглазного давления, приводит к активации различных типов клеток, таких как астроциты, микроглия, периферические лимфоциты в зрительном нерве и/или сетчатке, что сопровождается повышенной продукцией стареющими клетками воспалительных цитокинов и глаукоматозной дегенерацией [7, 19, 23, 27]. В настоящее время возрастает число исследований, посвященных влиянию полиморфизма генов цитокинов на предрасположенность к развитию первичной открытоугольной глаукомы [13]. Установлено, что отдельные полиморфизмы способствуют увеличению *TNFα* и *IL1β* в стекловидном теле, сетчатке и зрительном нерве, повышая риск развития и прогрессирования ПОУГ [6, 8]. Учитывая широкую доступность ингибиторов провоспалительных интерлейкинов, одобренных для клинического применения, дальнейшие исследования полиморфизма генов *TNFα* и *IL1β* и профиля их экспрессии в различных этнических группах при глаукоме представляют интерес.

Цель – определить патогенетическую роль полиморфизма генов *TNFα* и *IL1β* в развитии первичной открытоугольной глаукомы.

При выполнении исследования нами были поставлены вопросы:

1. Зависит ли развитие заболевания от генотипов *TNFα* и *IL1β*?
2. Влияет ли *генный полиморфизм TNFα и IL1β* на их уровень в слезной жидкости и показатели оптической когерентной томографии у пациентов с первичной открытоугольной глаукомой?

Материалы и методы

Работа выполнена в дизайне продольного когортного нерандомизированного исследования случай-контроль. Исследование одобрено Локальным Этическим комитетом ФГБОУ ВО «Ставропольский государственный медицинский университет» Минздрава России (протокол № 81 от 27.03.2019 г.).

В исследование включены 56 пациентов (32 женщины, 24 мужчины) русской национальности, проживающие в Ставропольском крае, в возрасте от 50 до 75 лет с установленным диагнозом «первичная открытоугольная глаукома», имеющие уровень ВГД > 21 мм рт. ст., степень открытия угла передней камеры – 3-4, толщину СНВС более 60, но менее 85 μm, подписавшие добровольное информированное согласие на включение в исследование.

Из исследования исключали пациентов с воспалительными или аллергическими заболеваниями переднего отрезка глаза, помутнени-

ем оптических сред, травмами глаза, наличием диабетической ретинопатии, макулярной дегенерации, а также больных, получавших иммуносупрессивные, цитостатические или генно-инженерные биологические препараты.

В группу сравнения вошли 30 пациентов (18 женщин, 12 мужчин) в возрасте от 50 до 75 лет русской национальности с миопией слабой степени, уровнем ВГД < 21 мм рт. ст., степенью открытия угла передней камеры – 3-4, толщиной слоя нервных волокон > 90 μm, отсутствием системных аутоиммунных, опухолевых заболеваний, сахарного диабета, подписавших добровольное информированное согласие на включение в исследование.

Исследование проводилось на базе офтальмологического отделения ГБУЗ СК «Ставропольская краевая клиническая больница». Диагноз устанавливали с помощью стандартных методов исследования, включая визометрию, авторефрактометрию, биомикроскопию, гониоскопию, аппланационную тонометрию, пахиметрию, оптическую когерентную томографию (ОСТ) [2].

Для определения полиморфизма генов *TNFα* и *IL1β* использовалась венозная кровь, полученная путем пункции периферических вен (1-2 мл), собранная в одноразовые пластиковые пробирки с раствором 0,5% ЭДТА.

Сбор слезной жидкости для определения содержания *TNFα* и *IL1β* проводился из нижнего слезного мениска. В течение 14 дней до выполнения исследования пациенты не применяли глазные капли, содержащие топические простагландины и глюкокортикостероиды. Слезную жидкость собирали из нижнего конъюнктивального свода с помощью стерильной микропипетки и переносили в пробирки типа «Эппендорф». Образцы центрифугировали при 10000 g для удаления слизи и клеточного детрита и хранили при температуре -20° до проведения исследования.

При выполнении работы были отобраны два гена-кандидата с учетом их непосредственного участия в патогенезе нейровоспаления при глаукоме, имеющие частоту минорного аллеля более 5% в популяции. Исследовались функциональные полиморфизмы *TNFα 308G>A* (rs1800629) и *IL1β -31 T>C* (rs1143627) в лейкоцитах периферической крови 56 пациентов с первичной открытоугольной глаукомой. Изучался характер влияния генного полиморфизма *TNFα G308A* и *IL1β T31C* на содержание *TNFα* и *IL1β* в 107 образцах слезной жидкости пациентов с ПОУГ.

Определялись показатели оптической когерентной томографии у больных с первичной открытоугольной глаукомой в зависимости от генотипов *TNFα 308G>A* и *IL1β -31 T>C*.

Оптическая когерентная томография выполнялась на аппарате Topcon 3D OCT 1000 с определением толщины слоя нервных волокон сетчатки (СНВС), объема и площади нейроретинального пояса. Применялись стандартные протоколы RNFLThickness (число А – сканов 512, диаметр прицельного круга 3,4 мм).

Для молекулярно-генетических исследований выделяли ДНК из лейкоцитов периферической крови, взятой в пробирки с 0,5% ЭДТА с применением набора реагентов «ДНК-ЭКСПРЕСС-КРОВЬ» («ЛИТЕХ», Россия). Полученные супернатанты ДНК хранили в морозильной камере при температуре -20° .

Генотипирование SNPs $308G>A$ (rs1800629) и $IL1\beta -31 T>C$ (rs1143627) осуществляли методом Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP analysis) с помощью многоканального амплификатора «Терцик» (ООО «ДНК-Технология», Россия) и диагностических тест-систем «SNP-экспресс» ООО НПФ «ЛИТЕХ» (Москва). Разделение продуктов амплификации проводили в 3% агарозном геле методом горизонтального электрофореза с последующей электрофоретической детекцией (Bio-Rad Laboratories, США). Для визуализации результатов электрофореза применяли 1%-ный раствор бромистого этидия, фрагменты ДНК определялись в виде оранжевых и/или красных полос.

Уровень провоспалительных цитокинов в слезной жидкости TNF α и IL-1 β у пациентов с ПОУГ исследовали посредством твердофазного иммуноферментного анализа (тест-системы АО «Вектор-Бест»). Средние показатели TNF α и IL-1 β определяли с учетом всех образцов, в том числе отрицательных.

Статистическую обработку данных выполняли с помощью лицензионных программ Statistica SPSS и Primer of Biostat 4,0. Количественные значения представляли в виде медианы и интерквартильного (25 и 75 процентиля) размаха (Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)). Для оценки межгрупповых различий применяли критерии Манна-Уитни, Ньюмена-Кейлса, Данна, χ^2 . Статистическую значимость различий в частотах аллельных вариантов и генотипов оценивалась с помощью критерия χ^2 Пирсона,

Результаты

Средний возраст пациентов составил $71,3 \pm 1,98$ года. В 28 случаях верифицирована развитая, в 16 – далекозашедшая, 12 – терминальная стадии первичной открытоугольной глаукомы.

Возрастная и гендерная структура пациентов с ПОУГ не отличалась от группы сравнения. В группе ПОУГ установлено увеличение средних показателей внутриглазного давления, уменьше-

ние толщины слоя нервных волокон сетчатки (табл. 1).

У пациентов с первичной открытоугольной глаукомой чаще, чем в группе сравнения выявлялся мутантный аллель $308A$ (32,1% и 8,3%, $p = 0,001$), вероятность развития заболевания у обладателей которого возростала более, чем в 5 раз, показатель отношения шансов составил 5,21 (95% CI: 1,92-14,1, $p = 0,001$) (табл. 2).

Распространенный в популяции гомозиготный по доминантному аллелю генотип $G308G$ у пациентов с ПОУГ встречался реже, чем в группе сравнения (53,5% и 86,7% соответственно, $p = 0,003$). Увеличение риска развития ПОУГ отмечалось у резидентов гомозиготного по редкому аллелю генотипа $A308A$ – 6,30 (95% CI: 0,77-51,9, $p = 0,049$), у гетерозигот $G308A$ – 3,60 (95% CI: 0,96-13,6, $p = 0,049$) и в объединенной группе больных, носителей мутантного аллеля A ($AA+GA$ – 5,85 (95% CI: 1,81-18,9, $p = 0,003$)).

При изучении генного полиморфизма $IL1\beta (-31 T>C)$ у больных с ПОУГ чаще, чем в группе сравнения найден распространенный в популяции аллель $-31T$ (72,3% и 56,7%, $p = 0,04$) с увеличением показателей отношения шансов до 1,99 (1,04-3,86). Носительство редкого аллеля $-31C$ имело протективный эффект (ОШ 0,50; 95% ДИ 0,26-0,97; $p = 0,04$). При анализе гаплотипов $IL1\beta (-31 T>C)$ у пациентов с ПОУГ преобладающим был гомозиготный по распространенному аллелю генотип $-31T/T$ (57,1% и 33,3%, $p = 0,04$) с увеличением риска заболевания (OR = 2,67 (1,06-6,72)). Распространенность гомозиготного по редкому аллелю ($31C/C$) и гетерозиготного ($-31T/C$) генотипов была ниже, чем в группе сравнения, однако различия не были статистически значимы.

Для оценки влияния полиморфизмов генов TNF α и $IL1\beta$ на их уровень в слезной жидкости исследовано 107 образцов слезной жидкости пациентов с ПОУГ (с развитой стадией – 56 проб, далекозашедшей – 30, терминальной – 21). TNF α определялся в 95,4% образцов слезной жидкости у пациентов с ПОУГ, что было чаще, чем в группе сравнения – 85,7%, $p = 0,01$. Выявлено статистически значимое увеличение содержания TNF α до 94 (45-165) пкг/мл у пациентов с ПОУГ по отношению к группе сравнения – 32 (14-66) пкг/мл, $p = 0,001$. Установлено влияние полиморфизма гена TNF α (308) $G>A$ на его содержание в слезной жидкости при первичной открытоугольной глаукоме. У респондентов редкого аллеля $308A$ и обладателей генотипов $308G/A + 308A/A$ отмечено увеличение содержания TNF α в слезной жидкости – 49 (14,0-90,0) пкг/мл по сравнению с пациентами, имеющими генотип $308G/G$ (165 (112,5-193,5) пкг/мл), $p = 0,001$ (рис. 1).

ТАБЛИЦА 2. РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ЧАСТОТ АЛЛЕЛЕЙ И ГЕНОТИПОВ *TNFα* (308) G>A И *IL1β* (-31) T>C У БОЛЬНЫХ С ПЕРВИЧНОЙ ОТКРЫТОУГОЛЬНОЙ ГЛАУКОМОЙ

TABLE 2. FREQUENCY DISTRIBUTION OF ALLELES AND GENOTYPES OF *TNFα* (308) G>A AND *IL1β* (-31) T>C IN PATIENTS WITH PRIMARY OPEN-ANGLE GLAUCOMA

Аллели / генотип Alleles / genotype	ПОУГ POAG (n = 56)	Группа сравнения Comparison group (n = 30)	χ^2	OR (95% CI)
<i>TNFα</i> (308) G>A				
G	76/112 (67,9%)	55/60 (91,7%)	p = 0,001	0,19 (0,07-0,52)
A	36/112 (32,1%)	5/60 (8,3%)	p = 0,001	5,21 (1,92-14,10)
GG	30/56 (53,5%)	26/30 (86,7%)	p = 0,003	0,13 (0,04-0,41)
GA	16/56 (28,6%)	3/30 (10%)	p = 0,049	3,60 (0,96-13,60)
AA	10/56 (17,8%)	1/30 (3,3%)	p = 0,049	6,30 (0,77-51,90)
AA+GA	26/56 (46,4%)	4/30 (13,3%)	p = 0,003	5,85 (1,81-18,90)
<i>IL1β</i> (-31) T>C				
T	81/112 (72,3%)	34/60 (56,7%)	p = 0,04	1,99 (1,04-3,86)
C	31/112 (27,7%)	26/60 (43,3%)	p = 0,04	0,50 (0,26-0,97)
TT	32/56 (57,1%)	10/30 (33,3%)	p = 0,04	2,67 (1,06-6,72)
TC	17/56 (30,4%)	14/30 (46,7%)	p = 0,13	0,50 (0,19-1,25)
CC	7/56 (12,5%)	6/30 (20,0%)	p = 0,36	0,61 (0,17-1,89)
TT+TC	49/56 (87,5%)	24/30 (80,0%)	p = 0,36	1,75 (0,53-5,78)

Примечание. ПОУГ – первичная открытоугольная глаукома, p – статистическая значимость различий по сравнению с группой сравнения (критерий χ^2 Пирсона), OR – отношение шансов, CI – 95%-ный доверительный интервал.

Note. POAG, primary open-angle glaucoma; p, statistical significance of differences compared with the comparison group (Pearson's χ^2 test); OR, odds ratio; CI, 95% confidence interval

ТАБЛИЦА 1. ДЕМОГРАФИЧЕСКИЕ И КЛИНИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ СУБЪЕКТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

TABLE 1. DEMOGRAPHIC AND CLINICAL FEATURES OF STUDY SUBJECTS

	ПОУГ POAG (n = 56)	Группа сравнения Comparison group (n = 30)	p
Пол (м/ж), % Sex (m/w)	42,9/57,1	40,0/60,0	p = 0,79
Возраст (M±m), лет Mean age, years	70,10±0,75	70,30±0,96	p = 0,41
ВГД, мм рт.ст. Intraocular pressure, mmHg	24 (20,0-27,5)	19 (17-20)	p = 0,001
Толщина СНВС, мкм RNFL thickness, mkm	79 (61-87)	106,5 (99-119)	p = 0,001
Объем НРП, мм³ Volume neuroretinal rim, mm³	0,31 (0,21-0,52)	0,33 (0,30-0,39)	p = 0,34
Площадь НРП, мм² Area neuroretinal rim, mm²	0,31 (0,21-0,52)	2,12 (1,70-1,23)	p = 0,50

Примечание. ПОУГ – первичная открытоугольная глаукома, ВГД – внутриглазное давление, СНВС – слой нервных волокон сетчатки, НРП – нейроретинальный поясок, p – статистическая значимость различий по сравнению с группой сравнения (критерий χ^2 , Манна–Уитни).

Note. POAG, primary open-angle glaucoma; RNFL, retinal nerve fiber layer; p, statistical significance of differences compared with the comparison group (χ^2 test, Mann–Whitney).

Показатели $TNF\alpha$ были значительно выше в группе 308A/A (190 (153,0-220,0) пкг/мл), статистически значимые различия определялись по сравнению с генотипами 308G/A (132 (98,0-180,0) пкг/мл), $p = 0,01$ и 308G/G (49 (14,0-90,0) пкг/мл), $p = 0,001$ (рис. 1).

Частота выявления ИЛ-1 β в слезной жидкости у пациентов с первичной открытоугольной глаукомой составила 94,4%, в группе сравнения – 73,8%, $p < 0,001$. Средние показатели у пациентов с ПОУГ равнялись 4,30 (1,85-6,70) пкг/л, что было выше, чем в группе сравнения – 2,15 (0,0-3,70) пкг/л, $p = 0,001$.

Выявлена взаимосвязь носительства аллеля -31T и содержания ИЛ-1 β в слезной жидкости при ПОУГ. У обладателей генотипов T/T+C/T показателем

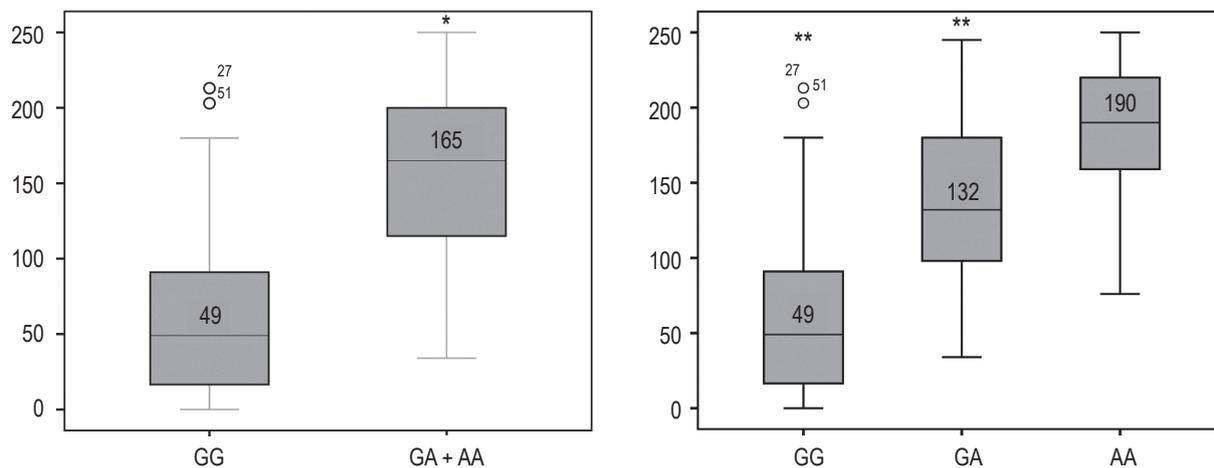


Рисунок 1. Влияние полиморфизма гена $TNF\alpha$ (308) G>A на уровень $TNF\alpha$ в слезной жидкости у пациентов с первичной открытоугольной глаукомой

Примечание: * – $p < 0,05$, статистическая значимость различий по сравнению с группой GG (критерий Манна–Уитни»);

** – $p < 0,05$, статистическая значимость различий по сравнению с группой AA (критерий Ньюмена–Кейлса, Данна).

Figure 1. Effect of $TNF\alpha$ (308) G>A gene polymorphism on the level of $TNF\alpha$ in lacrimal fluid in patients with primary open-angle glaucoma

Note. *, $p < 0.05$, statistical significance of differences compared to the GG group (Mann–Whitney test); **, $p < 0.05$, statistical significance of differences compared to the AA group (Newman–Keuls, Dunn test).

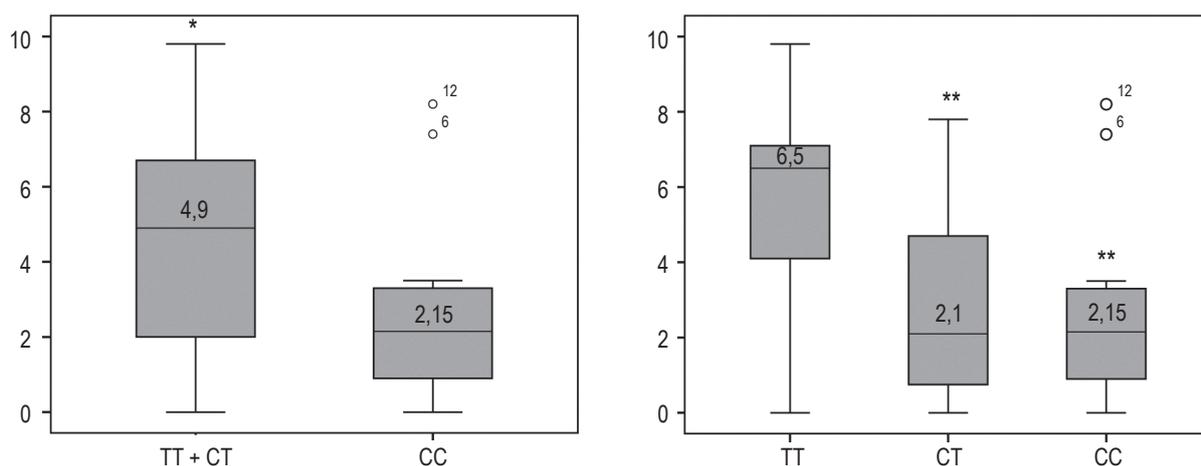


Рисунок 2. Влияние полиморфизма гена $IL1\beta$ T>C на уровень $IL1\beta$ в слезной жидкости у пациентов с первичной открытоугольной глаукомой

Примечание. * – $p < 0,05$, статистическая значимость различий по сравнению с группой CC (критерий Манна–Уитни»);

** – $p < 0,05$, статистическая значимость различий по сравнению с группой TT (критерий Ньюмена–Кейлса, Данна).

Figure 2. Effect of T>C $IL1\beta$ gene polymorphism on the level of $IL1\beta$ in lacrimal fluid in patients with primary open-angle glaucoma

Note. *, $p < 0.05$, statistical significance of differences compared to the SS group (Mann–Whitney test); **, $p < 0.05$, statistical significance of differences compared to the TT group (Newman–Keuls, Dunn test).

затели *IL1β* составили 4,90 (2,006,70) пкг/мл, что было существенно выше, чем у респондентов рецессивного генотипа *-31 C/C* – 2,15 (0,90-3,30) пкг/мл, $p = 0,02$ (рис. 2). Максимальные значения определялись у гомозигот по распространенному аллелю (*-31 T/T* – 6,50 (4,10-7,00) пкг/мл. Статистически значимые различия получены при сравнении с генотипом *T/C* 2,10 (0,70-4,20) пкг/мл, $p = 0,001$ и *C/C* 2,15 (0,90-3,30) пкг/мл, $p = 0,001$ (рис. 2).

У респондентов аллеля *TNFα 308A* и обладателей генотипов *GA+AA* показатели СНВС составили 67 (43,0-80,0) мкм и были существенно ниже, чем у носителей генотипа *GG* – 96 (81,0-101,0) мкм, $p = 0,001$.

Статистически значимые различия по сравнению с генотипом *GG* установлены для генотипа *G308A* – 59,5 (40,0-78,0), $p = 0,03$ и *A308A* – 79,0 (65,0-80,0) мкм, $p = 0,001$.

Толщина слоя нервных волокон у обладателей аллеля *IL1β -31T* (*TT+TC*) составила 80 (65,0-96,0) мкм, у носителей *CC* (*rs1143627*) – 90,5 (46,0-99,0) мкм, однако различия не были статистически значимы.

Обсуждение

У пациентов с первичной открытоугольной глаукомой русской национальности выявлено преобладание редкого аллеля *TNFα 308A* и генотипов *G308A* и *A308A*, а также распространенного аллеля *IL1β -31T* и генотипа *-31 T/T*. Наиболее высокие показатели *TNFα* определялись у пациентов с генотипом *308A/A*, *IL1β* – *-31T/T*.

В современных исследованиях показана ключевая роль *TNFα* в иммунопатологических процессах, связанных с ишемией сетчатки, повреждением нейронов, увеличением уровня внутриглазного давления и регенерацией тканей [23]. Установлено увеличение *TNFα* в стекловидном теле, сетчатке и зрительном нерве при глаукоме, способное индуцировать апоптоз ганглиозных клеток посредством нескольких механизмов, включая митохондриальную дисфункцию, окислительный стресс и рецептор-опосредованную активацию каспаз [17, 23].

Увеличение уровня *TNFα* во внутриглазной жидкости, слезах, сыворотке крови позволяет считать его потенциальным биомаркером глаукомы и критерием ее тяжести [11, 14, 18, 24].

Ранее сообщалось о том, что SNP *308G>A* (*rs1800629*) выше промоторного сайта вызывает увеличение экспрессии *TNFα* и положительно коррелирует с развитием первичной открытоугольной глаукомы в популяциях Турции, Египта и Ирана [12, 16, 22].

В исследовании Е. Тикуновой и соавт. на корте пациентов Центральной России связь по-

лиморфизма *G308A* (*rs1800629*) с ПОУГ не была подтверждена [25]. В метаанализе Yu Q.Q. и соавт. показано, что полиморфизмы *TNF-308G/A* в отличие от *-238G/A*, *-863C/A* и *-857C/T* в значительной степени связаны с развитием первичной открытоугольной глаукомы высокого давления [29]. По данным Шевченко А.В. и соавт., частота минорного генотипа *TNF-308*AA* была достоверно выше у больных с ПОУГ европеоидного происхождения, проживающих в Западной Сибири [5], что согласуется с полученными нами данными.

Интерлейкин-1β является ключевым фактором прогрессирования глаукомы, способным инициировать продукцию других цитокинов, а также матриксных металлопротеиназ и молекул адгезии [7, 28]. Высокие показатели экспрессии *IL1β* обнаружены в слезах, внутриглазной жидкости [1, 3, 4, 11], что совпадает с полученными в настоящем исследовании данными. Ранее установлено, что SNP *IL1β -31T/C* локализован в промоторной области и нуклеотидная замена на аллель *-31T* приводит к аллель-специфическому изменению экспрессии гена в связи с высоким связыванием ядерных белков [10, 21, 28]. Отмечена высокая продукция *IL1β* в присутствии аллеля *-31T* [28].

Полученные нами результаты совпадают с данными других исследований, свидетельствующих о том, что генный полиморфизм *IL1β -31T/C* увеличивает риск развития первичной открытоугольной глаукомы [21].

К ограничениям настоящего исследования следует отнести небольшой объем выборки пациентов, а также необходимость подтверждения полученных результатов в других этнических группах. Кроме того, мы изучали небольшое число полиморфизмов провоспалительных интерлейкинов *TNFα* и *IL-1β* и не учитывали активность других молекул, способных взаимодействовать с промоторной областью генов *TNFα* и *IL1β*.

Заключение

Высокая реактивность глиальных клеток при глаукоме характеризуется повышенной продукцией провоспалительных интерлейкинов, таких как *TNFα*, *IL-1β*, *IL-6*, *IL-12*, *IL-2* и хемокинов, действующих в качестве эффекторов воспалительной нейротоксичности [26]. Установлено, что генетически детерминированные различия продукции интерлейкинов могут влиять на предрасположенность к развитию нейровоспаления и глаукоматозной нейропатии [6, 8, 20]. В настоящем исследовании показано, что полиморфизмы генов *TNFα 308G/A* (*rs1800629*) и *IL1β -31T/C* (*rs1143627*) взаимосвязаны с развитием первич-

ной открытоугольной глаукомы. Факторами риска ПОУГ у пациентов русской национальности Юга России являются аллели *TNF α 308A*, *IL1 β -31T*, а также генотипы *308G/A*, *308A/A* и *-31T/T*. Высокая продукция *TNF α* в слезной жидкости при первичной открытоугольной глаукоме выявляется у пациентов с генотипом *308A/A*, *IL1 β -* обладателей *-31T/T*.

Благодарности

Авторы выражают благодарность директору ФКУЗ «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора, академику РАН, доктору медицинских наук, профессору Куличенко А.Н. за помощь в организации исследования.

Источник финансирования

Авторы заявляют об отсутствии финансовой поддержки настоящей статьи.

Участие авторов

Концепция и дизайн исследования, интерпретация полученных результатов, написание текста статьи – Барычева Л.Ю.

Выполнение исследования, сбор и объединение данных, статистическая обработка и интерпретация полученных результатов – Какулия Д.М., Кузнецова В.В., Козьмова Н.А.

Статистическая обработка полученных результатов – Минасян М.М.

Все авторы прочли и одобрили финальную версию статьи перед публикацией.

Список литературы / References

1. Агарков Н.М., Чухраев А.М., Яблокова Н.В. Диагностика и прогнозирование первичной открытоугольной глаукомы по уровню местных цитокинов // Медицинская иммунология, 2019. Т. 21, № 6. С. 1163-1168. [Agarkov N.M., Chukhraev A.M., Yablokova N.V. Diagnosis and prediction of primary open-angle glaucoma by the level of local cytokine. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2019, Vol. 21, no. 6, pp. 1163-1168. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2019-6-1163-1168.
2. Егоров Е.А. Глаукома. Национальное руководство. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2014. 824 с. [Egorov E.A. Glaucoma. Glaucoma. National guidelines]. Moscow: GEOTAR-Media, 2014. 824 p.
3. Чередниченко Л.П., Барычева Л.Ю., Берновская А.А. Значение провоспалительных цитокинов в развитии первичной открытоугольной глаукомы // Медицинский вестник Северного Кавказа, 2013. Т. 8, № 2. С. 52-54. [Cherednichenko L.P., Barycheva L.Yu., Bernovskaya A.A. Cytokine profile in patients with initial manifestations of primary open-angle glaucoma. *Meditsinskiy vestnik Severnogo Kavkaza = Medical News of the North Caucasus*, 2013, Vol. 8, no. 2, pp. 52-54. (In Russ.)]
4. Чередниченко Л.П., Барычева Л.Ю., Берновская А.А. Цитокиновый профиль у пациентов с начальными проявлениями первичной открытоугольной глаукомы // Российская педиатрическая офтальмология, 2013. № 1. С. 38-42. [Cherednichenko L.P., Barycheva L.Yu., Bernovskaya A.A. Cytokine profile in patients with initial manifestations of primary open-angle glaucoma. *Rossiyskaya pediatricheskaya oftalmologiya = Russian Pediatric Ophthalmology*, 2013, no. 1, pp 38-42. (In Russ.)]
5. Шевченко А.В., Прокофьев В.Ф., Коненков В.И., Еремина А.В., Трунов А.Н., Черных В.В. Ассоциация промоторного полиморфизма гена *TNF- α* с первичной открытоугольной глаукомой // Клиническая офтальмология, 2022. Т. 22, № 1. С. 11-15. [Shevchenko A.V., Prokof'ev V.F., Konenkov V.I., Eremina A.V., Trunov A.N., Chernykh V.V. Association of *TNF- α* gene promoter polymorphism with primary open-angle glaucoma. *Klinicheskaya oftalmologiya = Russian Journal of Clinical Ophthalmology*, 2022, Vol. 22, no. 1, pp. 11-15. (In Russ.)]
6. Aboobakar I.F., Wiggs J.L. The genetics of glaucoma: Disease associations, personalised risk assessment and therapeutic opportunities-A review. *J. Clin Exp. Ophthalmol.*, 2022, Vol. 50, no. 2, pp. 143-162.
7. Adornetto A., Russo R., Parisi V. Neuroinflammation as a target for glaucoma therapy. *Neural Regen. Res.*, 2019, Vol. 14, no. 3, pp. 391-394.
8. Atanasovska Velkovska M., Goričar K., Blagus T., Dolžan V., Cvenkel B. Association of genetic polymorphisms in oxidative stress and inflammation pathways with glaucoma risk and phenotype. *Clin. Med.*, 2021, Vol. 10, no. 5, 1148. doi: 10.3390/jcm10051148.
9. Baudouin C., Kolko M., Melik-Parsadaniantz S., Messmer E.M. Inflammation in Glaucoma: From the back to the front of the eye, and beyond. *Prog. Retin Eye Res.*, 2021, Vol. 83, 100916. doi: 10.1016/j.preteyeres.2020.100916.
10. Behzadi P., Sameer A.S., Nissar S., Banday M.Z., Gajdacs M., García-Perdomo H.A., Akhtar K., Pinheiro M., Magnusson P., Sarshar M., Ambrosi C. The Interleukin-1 (IL-1) superfamily cytokines and their single nucleotide polymorphisms (SNPs). *Immunol Res.*, 2022, Vol. 2022, 2054431. doi: 10.1155/2022/2054431.
11. Benitez-Del-Castillo J., Cantu-Dibildox J., Sanz-González S.M., Zanón-Moreno V., Pinazo-Duran M.D. Cytokine expression in tears of patients with glaucoma or dry eye disease: A prospective, observational cohort study. *Eur. J. Ophthalmol.*, 2019, Vol. 29, no. 4, pp. 437-443.
12. Bozkurt B., Mesci L., Irkeç M., Ozdag B.B., Sanal O., Arslan U., Ersoy F., Tezcan I. Association of tumour necrosis factor- α -308 G/A polymorphism with primary open-angle glaucoma. *Clin. Exp. Ophthalmol.*, 2012, Vol. 40, no. 4, pp. e156-162.

13. Burgos-Blasco B., Vidal-Villegas B., Saenz-Frances F., Morales-Fernandez L., Perucho-Gonzalez L., Garcia-Feijoo J., Martinez-de-la-Casa J.M. Tear and aqueous humour cytokine profile in primary open-angle glaucoma. *Acta Ophthalmol.*, 2020, Vol. 98, no. 6, pp. e768-e772.
14. Hamid M.A., Moemen L., Labib H., Helmy H., Elsergany T. Risk of open angle glaucoma due to tumor necrosis factor alpha gene polymorphisms. *Electron. Physician*, 2016, Vol. 8, no. 2, pp. 1978-1983.
15. Csósz É., Deák E., Tóth N., Traverso C.E., Csutak A., Tözsér J. Comparative analysis of cytokine profiles of glaucomatous tears and aqueous humour reveals potential biomarkers for trabeculectomy complication. *FEBS Open Bio*, 2019, Vol. 9, no. 5, pp. 1020-1028.
16. Fernández-Vega Cueto A., Álvarez L., García M., Álvarez-Barrios A., Artime E., Fernández-Vega Cueto L., Coca-Prados M., González-Iglesias H. Candidate glaucoma biomarkers: from proteins to metabolites, and the pitfalls to clinical applications. *Biology (Basel)*, 2021, Vol. 10, no. 8, 763. doi: 10.3390/biology10080763.
17. Jung Y., Ohn K., Shin H., Oh S.E., Park C.K., Park H.L. Factors associated with elevated tumor necrosis factor- α in aqueous humor of patients with open-angle glaucoma. *Clin. Med.*, 2022, Vol. 11, no. 17, 5232. doi: 10.3390/jcm11175232.
18. Kondkar A.A., Sultan T., Almobarak F.A., Kalantan H., Al-Obeidan S.A., Abu-Amero K.K. Association of increased levels of plasma tumor necrosis factor alpha with primary open-angle glaucoma. *Clin. Ophthalmol.*, 2018, Vol. 12, pp. 701-706.
19. Lambuk L., Suhaimi N.A.A., Sadikan M.Z., Jafri A.J.A., Ahmad S., Nasir N.A.A., Uskoković V., Kadir R., Mohamud R. Nanoparticles for the treatment of glaucoma-associated neuroinflammation. *Eye Vis. (Lond.)*, 2022, Vol. 9, no. 1, 26. doi: 10.1186/s40662-022-00298-y.
20. Núñez G., Sakamoto K., Soares M.P. Innate nutritional immunity. *J. Immunol.*, 2018, Vol. 201, no. 1, pp. 11-18.
21. Oliveira M.B., de Vasconcellos J.P.C., Ananina G., Costa V.P., de Melo M.B. Association between IL1A and IL1B polymorphisms and primary open angle glaucoma in a Brazilian population. *Exp. Biol. Med. (Maywood)*, 2018, Vol. 243, no. 13, pp. 1083-1091.
22. Razeghinejad M.R., Rahat F., Kamali-Sarvestani E. Association of TNFA -308 G/A and TNFRI +36 A/G gene polymorphisms with glaucoma. *Ophthalmic Res.*, 2009, Vol. 42, no. 3, pp. 118-124.
23. Tezel G. Molecular regulation of neuroinflammation in glaucoma: Current knowledge and the ongoing search for new treatment targets. *Prog. Retin. Eye Res.*, 2022, Vol. 87, 100998. doi: 10.1016/j.preteyeres.2021.100998.
24. Tezel G. Multiplex protein analysis for the study of glaucoma. *Expert Rev. Proteomics*, 2021, Vol. 18, no. 10, pp. 911-924.
25. Tikunova E., Ovtcharova V., Reshetnikov E., Dvornyk V., Polonikov A., Bushueva O., Churnosov M. Genes of tumor necrosis factors and their receptors and the primary open angle glaucoma in the population of Central Russia. *Int. J. Ophthalmol.*, 2017, Vol. 10, no. 10, pp. 1490-1494.
26. Vidal-Villegas B., Burgos-Blasco B., Santiago Alvarez J.L., Espino-Paisan L., Fernández-Vigo J., Andrés-Guerrero V., García-Feijoo J., Martínez-de-la-Casa J.M. Proinflammatory cytokine profile differences between primary open-angle and pseudoexfoliative glaucoma. *Ophthalmic Res.*, 2022, Vol. 65, no. 1, pp. 111-120.
27. Wei X., Cho K.S., Thee E.F., Jager M.J., Chen D.F. Neuroinflammation and microglia in glaucoma: time for a paradigm shift. *J. Neurosci Res.*, 2019, Vol. 97, no. 1, pp. 70-76.
28. Wooff Y., Man S.M., Aggio-Bruce R., Natoli R., Fernando N. IL-1 family members mediate cell death, inflammation and angiogenesis in retinal degenerative diseases. *Front. Immunol.*, 2019, Vol. 10, 1618. doi: 10.3389/fimmu.2019.01618.
29. Yu Q.Q., Yao Y. A detailed meta-analysis shows no association between TNF- α -308G/A polymorphism and different forms of glaucoma. *Ophthalmic Res.*, 2012, Vol. 47, no. 1, pp. 47-51.

Авторы:

Барычева Л.Ю. — д.м.н., профессор, заведующая кафедрой иммунологии с курсом дополнительного профессионального образования ФГБОУ ВО «Ставропольский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Ставрополь, Россия

Какулия Д.М. — аспирант кафедры иммунологии с курсом дополнительного профессионального образования ФГБОУ ВО «Ставропольский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Ставрополь, Россия

Authors:

Barycheva L. Yu., PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Department of Immunology with a Course of Continuing Professional Education, Stavropol State Medical University, Stavropol, Russian Federation

Kakulia D. M., Postgraduate Student, Department of Immunology with a Course of Continuing Professional Education, Stavropol State Medical University, Stavropol, Russian Federation

Минасян М.М. — к.м.н., доцент кафедры иммунологии с курсом дополнительного профессионального образования ФГБОУ ВО «Ставропольский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Ставрополь, Россия

Minasyan M.M., PhD (Medicine), Associate Professor, Department of Immunology with a Course of Continuing Professional Education, Stavropol State Medical University, Stavropol, Russian Federation

Кузнецова В.В. — ассистент кафедры иммунологии с курсом дополнительного профессионального образования ФГБОУ ВО «Ставропольский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Ставрополь, Россия

Kuznetsova V.V., Assistant Professor, Department of Immunology with a Course of Continuing Professional Education, Stavropol State Medical University, Stavropol, Russian Federation

Козьмова Н.А. — аспирант кафедры иммунологии с курсом дополнительного профессионального образования ФГБОУ ВО «Ставропольский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Ставрополь, Россия

Kozmova N.A., Postgraduate Student, Department of Immunology with a Course of Continuing Professional Education, Stavropol State Medical University, Stavropol, Russian Federation

Поступила 02.06.2023

Отправлена на доработку 07.07.2023

Принята к печати 04.10.2023

Received 02.06.2023

Revision received 07.07.2023

Accepted 04.10.2023

ЦИТОКИНОВЫЙ ПРОФИЛЬ ПАЦИЕНТОВ С СОЧЕТАННОЙ КАРДИО- И ОФТАЛЬМОПАТОЛОГИЕЙ

Фабрикантов О.Л.¹, Шурыгин С.Н.², Липатова Т.Е.³, Судаков О.В.⁴,
Потапов В.Н.⁵, Чернов А.В.⁴, Шавкута Г.В.⁶, Голиков А.В.⁷,
Якунченко Т.И.⁸, Аксёнов В.В.⁹

¹ Тамбовский филиал МНТК «Микрохирургия глаза имени академика С.Н. Федорова» Министерства здравоохранения РФ, г. Тамбов, Россия

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

³ ФГБОУ ВО «Саратовский государственный медицинский университет имени В.И. Разумовского» Министерства здравоохранения РФ, г. Саратов, Россия

⁴ ФГБОУ ВО «Воронежский государственный медицинский университет имени Н.Н. Бурденко», г. Воронеж, Россия

⁵ ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного образования» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

⁶ ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Ростов-на-Дону, Россия

⁷ ФГБОУ ВО «Курский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Курск, Россия

⁸ ФГАОУ ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет», г. Белгород, Россия

⁹ ФГБОУ ВО «Юго-Западный государственный университет», г. Курск, Россия

Резюме. Сочетанная кардиологическая и офтальмологическая патология имеет высокую распространенность в старших возрастных группах населения и общие патогенетические механизмы, к числу которых, безусловно, относится нарушение цитокинового профиля. Однако цитокиновый профиль крови практически не анализировался у пациентов пожилого возраста с сочетанной ишемической болезнью сердца с глаукомой. Цель исследования — изучение цитокинового профиля у пациентов с сочетанной кардио- и офтальмопатологией. Исследование выполнено в Тамбовском филиале МНТК «Микрохирургия глаза имени академика С.Н. Федорова» в двух группах: пациенты с сочетанной ишемической болезнью сердца с глаукомой (n = 58 человек) и пациенты с ишемической болезнью сердца (n = 49 человек), имеющих в обоих случаях одинаковый возраст 60-74 лет. Диагностика глаукомы проведена в соответствии с критериями «Национального руководства по глаукоме». Для

Адрес для переписки:

Аксёнов Виталий Вячеславович
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:

Vitaly V. Aksenov
Southwestern State University
94 50 let Oktyabrya St
Kursk
300540 Russian Federation
Phone: +7 (910) 740-96-13.
E-mail: vitalaxen@mail.ru

Образец цитирования:

О.Л. Фабрикантов, С.Н. Шурыгин, Т.Е. Липатова, О.В. Судаков, В.Н. Потапов, А.В. Чернов, Г.В. Шавкута, А.В. Голиков, Т.И. Якунченко, В.В. Аксёнов «Цитокиновый профиль пациентов с сочетанной кардио- и офтальмопатологией» // Медицинская иммунология, 2024. Т. 26, № 2. С. 313-320. doi: 10.15789/1563-0625-CPI-2639
© Фабрикантов О.Л. и соавт., 2024
Эта статья распространяется по лицензии Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

O.L. Fabrikantov, S.N. Shurygin, T.E. Lipatova, O.V. Sudakov, V.N. Potapov, A.V. Chernov, G.V. Shavkuta, A.V. Golikov, T.I. Yakunchenko, V.V. Aksenov "Cytokine profile in the patients with combined cardio- and ophthalmopathies", Medical Immunology (Russia)/ Meditsinskaya Immunologiya, 2024, Vol. 26, no. 2, pp. 313-320.
doi: 10.15789/1563-0625-CPI-2639
© Fabrikantov O.L. et al., 2024
The article can be used under the Creative Commons Attribution 4.0 License
DOI: 10.15789/1563-0625-CPI-2639

диагностики ишемической болезни сердца выполнялись электрокардиографические, эхокардиографические, рентгенографические, энзимные исследования. Определение цитокинов в плазме крови проводилось на аппарате Becton Dickinson FACS Canto 2 (США) с помощью специального набора СВА (BD Biosciences, США). Среди пациентов сравниваемых групп одинакового возраста выявлены достоверные различия по большинству цитокинов, а именно преимущественное повышение у пациентов с сочетанной кардио- и офтальмопатологией относительно группы с ишемической болезнью сердца. Повысилось в плазме крови пациентов с ишемической болезнью сердца, сочетанной с глаукомой, содержание IL-5, IL-12, IFN γ , TNF α с достоверным различием по сравнению с пациентами с ишемической болезнью сердца. Однако наивысшее увеличение среди рассматриваемых цитокинов характерно для IL-6 и IL-17, составившее у пациентов с сочетанной кардио- и офтальмопатологией $23,8 \pm 1,1$ пг/мл и $20,2 \pm 1,7$ пг/мл против $6,3 \pm 0,3$ пг/мл и $7,9 \pm 0,5$ пг/мл соответственно у пациентов с ишемической болезнью сердца. Вместе с тем существенно снизился уровень IL-4 и IL-10 до $2,2 \pm 0,2$ пг/мл и $6,4 \pm 0,4$ пг/мл против $4,8 \pm 0,3$ пг/мл и $11,9 \pm 0,6$ пг/мл. Использование логистической регрессии позволило определить величины относительного риска изученных цитокинов крови и разработать нескорректированные и скорректированные модели, согласно которым наиболее тесная ассоциация с риском развития сочетанной ишемической болезни сердца с глаукомой установлена для IL-6 и IL-17, с величинами относительного риска в нескорректированной модели 2,87 и 2,71 соответственно ($p < 0,001$). Однако в скорректированной модели ассоциация IL-6 с сочетанной ишемической болезнью сердца с глаукомой повысилась до 2,92 (ДИ 2,80-3,27, $p = 0,004$), а IL-17 уменьшилось до 2,64 (ДИ 2,51-2,85, $p = 0,003$). Установлена также достоверная ассоциация IL-4, IL-5, IL-12, IFN γ и TNF α с сочетанной ишемической болезнью сердца с глаукомой. Исследование продемонстрировало новые ассоциации системных цитокинов с риском развития сочетанной ишемической болезнью сердца с глаукомой.

Ключевые слова: цитокины, ишемическая болезнь сердца, глаукома, сочетанная кардиопатология, сочетанная офтальмопатология, логистическая регрессия

CYTOKINE PROFILE IN THE PATIENTS WITH COMBINED CARDIO- AND OPHTHALMOPATHIES

Fabrikantov O.L.^a, Shurygin S.N.^b, Lipatova T.E.^c, Sudakov O.V.^d, Potapov V.N.^e, Chernov A.V.^d, Shavkuta G.V.^f, Golikov A.V.^g, Yakunchenko T.I.^h, Aksenov V.V.ⁱ

^a S. Fedorov National Medical Research Center "MNTK Eye Microsurgery", Tambov, Russian Federation

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

^c V. Razumovsky Saratov State Medical University, Saratov, Russian Federation

^d N. Burdenko Voronezh State Medical University, Voronezh, Russian Federation

^e Russian Medical Academy of Continuing Education, Moscow, Russian Federation

^f Rostov State Medical University, Rostov-on-Don, Russian Federation

^g Kursk State Medical University, Kursk, Russian Federation

^h Belgorod State National Research University, Belgorod, Russian Federation

ⁱ Southwestern State University, Kursk, Russian Federation

Abstract. Combined cardiological and ophthalmological pathology has a high prevalence in older age groups of the population and common pathogenetic mechanisms, among which, of course, is a violation of the cytokine profile. However, the cytokine profile of the blood was practically not analyzed in elderly patients with combined ischemic heart disease with glaucoma. The aim of the study was to study the cytokine profile in patients with combined cardio- and ophthalmopathy. The study was performed at the S.N. Fedorov National Medical Research Center "MNTK Eye Microsurgery", in two groups: patients with combined coronary heart disease with glaucoma ($n = 58$ people), and patients with coronary heart disease ($n = 49$ people), who in both cases have the same age of 60-74 years. The diagnosis of glaucoma was carried out in accordance with the criteria of the "National Glaucoma Guidelines". Electrocardiographic, echocardiographic, radiographic, and enzyme studies were performed to diagnose coronary heart disease. The determination of cytokines in blood plasma was

carried out on the device “Becton Dickinson FACS Canto 2 (USA)” using a special set of CBA (BD Biosciences, USA). Among the patients of the compared groups of the same age, significant differences in most cytokines were revealed, namely, a predominant increase in patients with combined cardio- and ophthalmopathy relative to the group with coronary heart disease. The content of IL-5, IL-12, IFN γ , TNF α in the blood plasma of patients with coronary heart disease combined with glaucoma increased with a significant difference compared to patients with coronary heart disease. However, the highest increase among the cytokines under consideration is characteristic of IL-6 and IL-17, which amounted to 23.8 ± 1.1 pg/mL and 20.2 ± 1.7 pg/mL in patients with combined cardio- and ophthalmopathy *versus* 6.3 ± 0.3 pg/mL and 7.9 ± 0.5 pg/mL, respectively, in patients with coronary heart disease. At the same time, the level of IL-4 and IL-10 decreased significantly to 2.2 ± 0.2 pg/mL and 6.4 ± 0.4 pg/mL *versus* 4.8 ± 0.3 pg/mL and 11.9 ± 0.6 pg/mL. The use of logistic regression made it possible to determine the relative risk values of the studied blood cytokines and to develop uncorrected and adjusted models, according to which the closest association with the risk of developing combined coronary heart disease with glaucoma was established for IL-6 and IL-17, with the relative risk values in the uncorrected model of 2.87 and 2.71, respectively ($p < 0.001$). However, in the adjusted model, the association of IL-6 with combined coronary heart disease with glaucoma increased to 2.92 (CI 2.80-3.27, $p = 0.004$), and IL-17 decreased to 2.64 (CI 2.51-2.85, $p = 0.003$). There was also a significant association of IL-4, IL-5, IL-12, IFN γ and TNF α with combined coronary heart disease with glaucoma. The study demonstrated new associations of systemic cytokines with the risk of developing combined coronary heart disease associated with glaucoma.

Keywords: cytokines, ischemic heart disease, glaucoma, cardiopathology, ophthalmopathy, combined, logistic regression

Введение

Многие офтальмологические заболевания, в том числе глаукома, являются возрастассоциированной патологией и развиваются преимущественно в пожилом и старческом возрасте. Именно в данных возрастных группах глаукома считается лидирующей нозологией, приводящей к снижению остроты зрения и часто к слепоте. В настоящее время, по оценкам различных исследователей, в мире насчитывается от 60 до 70 миллионов больных глаукомой [11, 13].

В развитии глаукомы показана важная роль сердечно-сосудистых нарушений [2, 15] и, в частности, артериальной гипертензии, ишемической болезни сердца (ИБС), представляющих системные факторы риска глаукомы. ИБС – глобально распространенная кардиопатология с высоким доминированием, как и глаукомы, среди старших возрастных групп населения, насчитывающая в последние годы более 150 миллионов человек [12].

Интегрирующим звеном ИБС и глаукомы считаются иммунологические нарушения в цитокиновом профиле [9]. Однако изменения цитокинов в крови изучаются, как правило, отдельно среди пациентов с ИБС и среди пациентов с глаукомой. Показано увеличение ряда цитокинов – IL-1 β и IL-10 [6], IL-5, IL-6, IL-6R, TNF α , IFN γ [9], IL-25 и IL-27 [18, 19] в качестве факторов риска ИБС. Сообщается также об участии интерлейкинов крови в патогенезе глаукомы [3, 4]. Однако такое раздельное изучение цитокинов у пациентов с ИБС и глаукомой не позволяет на уровне целостного организма установить их зна-

чение в формировании сочетанной офтальмо- и кардиопатологии, увеличение которой интенсивно происходит в последние годы.

Цель исследования – изучение цитокинового профиля у пациентов с сочетанной кардио- и офтальмопатологией.

Материалы и методы

Настоящее исследование проведено в клинических условиях Тамбовского филиала МНТК «Микрохирургия глаза имени академика С.Н. Федорова» среди 49 пациентов в возрасте 60–74 лет с ИБС и 58 пациентов в возрасте 60–74 лет с сочетанной ИБС с глаукомой. Диагностика первичной глаукомы осуществлялась в соответствии с критериями и рекомендациями «Национального руководства по глаукоме» [1]. Диагноз «ИБС» устанавливался на основании комплексного обследования пациентов, включающего эхокардиографию, электрокардиографию, тест 6-минутной ходьбы, рентгенографию органов грудной клетки с верификацией признаков венозного застоя в легких. Критериями определения ИБС выступали также подтвержденный диагноз «инфаркт миокарда» на основе стандартных электрокардиографических и энзимных показателей, случаи острого коронарного синдрома или стабильной стенокардии.

Содержание цитокинов определяли в плазме крови, взятой в утренние часы, посредством точной цитометрии на аппарате Becton Dickinson FACS Canto 2 (США) с помощью специального набора CBA (BD Biosciences, США).

Исследование выполнялось с соблюдением этических норм и принципов в соответствии со

стандартами надлежащей клинической практики – Good Clinical Practice.

При статистической обработке с применением программы Statistica 10.0 определялись средние величины и их ошибки. Для выявления ассоциации рассматриваемых цитокинов у пациентов с сочетанной ИБС с глаукомой проведен логистический регрессионный анализ с разработкой нескорректированной и скорректированной по полу и возрасту модели. Достоверность различий определялась по критерию χ^2 , которая считалась значимой при $p < 0,05$.

Результаты

Содержание большинства изученных цитокинов крови среди пациентов с сочетанной ИБС с глаукомой относительно пациентов такого же возраста с изолированной ИБС статистически значимо различается (табл. 1). Так, среди пациентов с сочетанной ИБС с глаукомой репрезентативно выше содержание IL-1 β на системном уровне по непараметрическому критерию χ^2 . Редко используемый в оценке иммунологических реакций среди пациентов с кардиопатологией, в том числе с ИБС, IL-5 оказался повышенным у пациентов с сочетанной ИБС и глаукомой по сравнению с группой, представленной только ИБС. При этом увеличение данного цитокина у пациентов с сочетанной ИБС и глаукомой более существенно, чем уровень предыдущего IL-1 β , содержание которых возросло относительно пациентов аналогичного возраста с ИБС в 1,46 раза и 1,34 раза соответственно.

Сравнимые группы существенно различались и по содержанию в крови IL-12, который был статистически значимо повышен у пациентов с сочетанной ИБС и глаукомой. Более выраженные различия в уровне рассматриваемых системных цитокинов у пациентов с сочетанной ИБС с глаукомой и ИБС характерны для TNF α и IFN γ . Как уровень TNF α , так IFN γ достоверно повышены у пациентов с сочетанной ИБС и глаукомой, причем в большей степени увеличение среди вышеуказанных цитокинов крови относится к IFN γ с превышением более чем в 2 раза по отношению к пациентами с ИБС.

Сочетанная ИБС с глаукомой сопровождается среди провоспалительных цитокинов максимальным подъемом в плазме крови IL-6 и IL-17, содержание которых превышало таковые параметры пациентов с монокардиопатологией в 3,77 раза и 2,56 раза.

Противовоспалительные цитокины, рассматриваемые в настоящем исследовании – IL-4 и IL-10, в отличие от провоспалительных цитокинов статистически значимо снизились в крови пациентов с ИБС, сочетанной с глаукомой. Со-

держание IL-4 и IL-10 в крови пациентов с ИБС соответственно оказались выше.

Среди сравниваемых пациентов с сочетанной ИБС и глаукомой не имели достоверных различий по отношению к группе пациентов с ИБС цитокин крови IL-1 α , уровень которого имел тенденцию к повышению, но не достиг значимых изменений, и IL-18, содержание которого имело тенденцию к снижению ($p > 0,05$).

Использование логистического регрессионного анализа позволило установить в нескорректированной модели ассоциацию многих системных цитокинов с развитием ИБС, сочетанной с глаукомой (табл. 2). Потенциально риск обсуждаемой сочетанной кардио- и офтальмопатологии возрастает достоверно с увеличением в плазме крови содержания провоспалительных цитокинов – IL-5, IL-12 в диапазоне от 1,31 до 1,67 с достоверными доверительными интервалами. Влияние указанных цитокинов крови сохраняется и в скорректированной на возраст и пол модели, но этот эффект незначительно понизился с сохранением статистической значимости.

Более тесная ассоциация среди изученных цитокинов с сочетанной ИБС и глаукомой установлена для TNF α и IFN γ как в нескорректированной, так и в скорректированной модели с поправкой на возраст и пол. Увеличение данных цитокинов в плазме крови повышает риск сочетанной ИБС с глаукомой более чем в 2 раза. При этом в скорректированной модели при сохранении статистической значимости средних величин относительного риска и доверительных интервалов влияние IFN γ возросло, а TNF α – снизилось.

В группе провоспалительных цитокинов наивысшей оказалась ассоциация сочетанной ИБС с глаукомой с IL-6 и IL-17, повышение уровня которых достоверно увеличивало риск развития анализируемой кардио- и офтальмопатологии практически в 3 раза. В нескорректированной модели более значимым было влияние повышенного уровня в плазме крови IL-6, чем IL-17. В скорректированной модели возросла связь высокого риска сочетанной ИБС с глаукомой с уровнем IL-6, а с уровнем IL-17 в крови незначительно снизилась.

Вместе с тем среди рассматриваемых провоспалительных цитокинов не установлено достоверной ассоциации сочетанной ИБС с глаукомой с IL-1 α , IL-1 β и IL-18. Отсутствие ассоциации не наблюдалось как в нескорректированной, так и скорректированной модели.

Согласно величине относительного риска и доверительных интервалов с сочетанной ИБС с глаукомой тесно связаны противовоспалительные цитокины – IL-4 и IL-10. Значимое влияние наблюдалось для обоих цитокинов в нескоррек-

ТАБЛИЦА 1. СОДЕРЖАНИЕ СИСТЕМНЫХ ЦИТОКИНОВ У ПАЦИЕНТОВ С СОЧЕТАННОЙ ИШЕМИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНЬЮ СЕРДЦА С ГЛАУКОМОЙ (M±m, пг/мл)

TABLE 1. CONTENT OF SYSTEMIC CYTOKINES IN PATIENTS WITH COMBINED ISCHEMIC HEART DISEASE WITH GLAUCOMA (M±m, pg/mL)

Наименование цитокина Name of cytokine	Пациенты с ишемической болезнью сердца и глаукомой Patients with coronary heart disease and glaucoma	Пациенты с ишемической болезнью сердца Patients with coronary heart disease	Величина χ^2 и p Value χ^2 и p
IL-1 α	31,8±1,3	27,6±1,2	$\chi^2 = 1,08$ p > 0,05
IL-1 β	85,4±2,2	63,5±1,9	$\chi^2 = 4,27$ p < 0,001
IL-4	2,2±0,2	4,8±0,3	$\chi^2 = 5,19$ p < 0,01
IL-5	12,3±0,6	8,4±0,4	$\chi^2 = 7,84$ p < 0,01
IL-6	23,8±1,1	6,3±0,3	$\chi^2 = 13,28$ p < 0,001
IL-10	6,4±0,4	11,9±0,6	$\chi^2 = 9,14$ p < 0,001
IL-12	14,6±0,8	9,5±0,4	$\chi^2 = 6,29$ p < 0,01
IL-17	20,2±1,7	7,9±0,5	$\chi^2 = 18,25$ p < 0,001
IL-18	80,4±2,6	82,7±2,1	$\chi^2 = 0,63$ p > 0,05
IFN γ	51,7±2,3	24,3±1,8	$\chi^2 = 21,43$ p < 0,001
TNF α	102,5±3,1	54,6±2,7	$\chi^2 = 19,84$ p < 0,001

ТАБЛИЦА 2. АССОЦИАЦИЯ СИСТЕМНЫХ ЦИТОКИНОВ С СОЧЕТАННОЙ ИШЕМИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНЬЮ СЕРДЦА С ГЛАУКОМОЙ

TABLE 2. ASSOCIATION OF SYSTEMIC CYTOKINES WITH COMBINED ISCHEMIC HEART DISEASE WITH GLAUCOMA

Наименование цитокина Name of cytokine	Нескорректированная модель Uncorrected model			Скорректированная модель Adjusted model		
	ОР OR	95% ДИ 95% CI	p	ОР OR	95% ДИ 95% CI	p
IL-1 α	0,62	0,38-0,74	0,431	0,59	0,48-0,71	0,627
IL-1 β	1,15	0,89-1,21	0,159	1,11	0,92-1,20	0,248
IL-4	2,39	2,24-2,62	0,002	2,28	2,09-2,51	0,013
IL-5	1,31	1,18-1,55	0,013	1,25	1,12-1,42	0,024
IL-6	2,87	2,73-3,11	0,002	2,92	2,80-3,27	0,004
IL-10	2,08	1,94-2,26	0,001	2,11	2,01-2,32	0,003
IL-12	1,67	1,53-1,78	0,011	1,62	1,57-1,84	0,012
IL-17	2,71	2,55-2,90	0,001	2,64	2,51-2,85	0,003
IL-18	0,22	0,13-0,29	0,756	0,24	0,15-0,35	0,708
IFN γ	2,25	2,11-2,49	0,010	2,38	2,24-2,53	0,002
TNF α	2,47	2,34-2,68	0,012	2,13	2,02-2,29	0,021

тированной модели и сохранилось с небольшими колебаниями в скорректированной по возрасту и полу модели.

Обсуждение

Настоящее исследование продемонстрировало новые и достоверные ассоциации ряда провоспалительных и противовоспалительных цитокинов с риском сочетанной ИБС с глаукомой. Особенно высокой для данной сочетанной патологии оказалась связь с IL-6 и IL-17 как в нескорректированной, так и скорректированной модели. Содержание в крови этих цитокинов у пациентов с сочетанной ИБС и глаукомой было существенно выше по сравнению с пациентами аналогичного возраста только с ИБС ($p < 0,001$). Среди пациентов с ИБС, сочетанной с артериальной гипертензией, установлено увеличение уровня IL-6, IL-17 и IL-23, которое авторы [17] связывают либо с повышенными значениями артериального давления, либо с повреждением органов-мишеней. Более того, отмечается, что некоторые цитокины (в частности IL-6), по видимому, определяют гипертензивный ответ, независимо от величин артериального давления.

Повышенные уровни IL-6, по мнению многих исследователей [8, 9, 10, 16], повышают риск развития ИБС. Так, при названной монокардиопатологии без глаукомы выявлено увеличение содержания в плазме крови IL-6 почти в 2 раза по сравнению со здоровыми людьми, а величина относительного риска для этого цитокина составляла 2,53 ($p < 0,001$) [9]. Однако в указанной работе, как и в других, изучена ассоциация IL-6 и других системных цитокинов с ИБС без сочетания с глаукомой, имеющих, как известно общие патогенетические механизмы [7].

Считается, что IL-6 более, чем другой цитокин, тесно связан с риском ИБС [16] и согласуется с результатами мета-анализа 17 проспективных исследований, в которых сообщалось об относительном риске IL-6 для ИБС в 1,61 (95% ДИ 1,42-1,83) [10]. В связи с этим высокие уровни IL-6 могут служить ценным неинвазивным биомаркером пациентов с высоким риском ИБС [8].

Другим важным биомаркером ИБС без сочетания с глаукомой называется IL-17 [20]. Нами же показана ассоциация увеличения IL-17 в плазме

крови с высоким риском развития сочетанной ИБС с глаукомой, что расширяет представления о роли провоспалительных цитокинов в формировании сочетанной кардиоофтальмопатологии. Изменения других провоспалительных цитокинов (IL-1 β , IL-1, IL-2, IL-12, IL-16, IL-18) у пациентов с ИБС характеризуются неоднозначной реакцией [20], но достоверное повышение при ИБС установлено для IL-1 β , IL-1, IL-12, IL-18, а роль IL-16 в риске ИБС требует дальнейшего изучения.

Показано также, что уровень IL-12 в крови при сочетанной ИБС с метаболическим синдромом коррелирует с IL-6, TNF α и IL-10 [8]. В нашем исследовании для пациентов с сочетанной ИБС с глаукомой доказана значимая ассоциация TNF α и IFN γ . Вместе с тем не установлено связи уровня TNF α в крови с риском ИБС, хотя для IFN γ он составлял 1,46 (ДИ 1,09-1,95) [9]. Более же высокие уровни IL-10 у пациентов с сочетанной ИБС и метаболическим синдромом связаны с низкой частотой тяжелой ИБС, что свидетельствует о защитном эффекте IL-10 [8]. Нами же установлено более высокое содержание IL-10, как и другого противовоспалительного цитокина – IL-4 у пациентов с ИБС, чем у пациентов с сочетанной ИБС и глаукомой. При сочетании ИБС с артериальной гипертензией диагностировано увеличение IL-10 до $49,7 \pm 2,8$ пг/мл против $10,2 \pm 3,0$ пг/мл в группе соматических здоровых лиц зрелого возраста [6]. Сообщается также о важной роли в возникновении и развитии ИБС IL-27 [18], IL-23, IL-35 [17], IL-34 [14], но сочетание ИБС с глаукомой не рассматривается, что определяет значимость настоящего исследования.

Заключение

Цитокиновый профиль пациентов с сочетанной ИБС с глаукомой статистически значимо отличается от пациентов аналогичного возраста с ИБС повышением содержания в крови большинства изученных провоспалительных цитокинов, и особенно IL-6, IL-17, и снижением противовоспалительного IL-4, которые ассоциируются с высоким риском развития вышеназванной сочетанной кардио- и офтальмопатологии.

Список литературы / References

1. Егоров Е.А., Еричев В.П. Национальное руководство по глаукоме. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2019. 384 с. [Egorov E.A., Erichev V.P. National guide to glaucoma]. Moscow: GEOTAR-Media, 2019. 384 p.
2. Лихванцева В.Г., Соколов В.А., Леванова О.Н., Ковеленова И.В. Прогнозирование вероятности развития и прогрессирования первичной открытоугольной глаукомы методом регрессионного моделирования // Вестник офтальмологии, 2018. Т. 134, № 3. С. 35-41. [Likhvantseva V.G., Sokolov V.A., Livanova O.N., Kovelonova I.V. Prediction of the probability of development and progression of primary open-angle glaucoma by regression modeling. *Vestnik oftalmologii = Bulletin of Ophthalmology*, 2018, Vol. 134, no. 3, pp. 35-41. (In Russ.)]

3. Маркелова Е.В., Хохлова А.С., Кириенко А.В., Филина Н.В., Серебрянная Н.Б. Особенности иммунопатогенеза и дополнительные дифференциальные маркеры первичной открытоугольной и первичной закрытоугольной глаукомы // Здоровье и образование в XXI веке, 2016. Т. 18, № 2. С. 613-621. [Markelova E.V., Khokhlova A.S., Kirienko A.V., Filina N.V., Serebryanaya N.B. Features of immunopathogenesis and additional differential markers of primary open-angle and primary closed-angle glaucoma. *Zdorovye i obrazovanie v XXI veke = Health and Education in the XXI Century*, 2016, Vol. 18, no. 2, pp. 613-621. (In Russ.)]
4. Слепова О.С., Арапиев М.У., Ловпаче Дж.Н., Балацкая Н.В., Куликова И.Г. Особенности местного и системного цитокинового статуса у здоровых разного возраста и пациентов с начальной стадией первичной открытоугольной глаукомой // Национальный журнал глаукома, 2016. Т. 15, № 1. С. 3-12. [Slepova O.S., Arapiev M.U., Lovpache J.N., Balatskaya N.V., Kulikova I.G. Features of local and systemic cytokine status in healthy people of different ages and patients with the initial stage of primary open-angle glaucoma. *Natsionalnyy zhurnal glaucoma = National Journal of Glaucoma*, 2016, Vol. 15, no. 1, pp. 3-12. (In Russ.)]
5. Фабрикантов О.Л., Агарков Н.М., Лев И.В., Гурко Т.С., Яблоков М.М., Москалева Е.О., Москалев А.А. Аллостатическая нагрузка как способ объективизации возрастной жизнеспособности пациентов с офтальмопатологией // Научные результаты биомедицинских исследований, 2021. Т. 7, № 3. С. 451-460. [Fabrikantov O.L., Agarkov N.M., Lev I.V., Gurko T.S., Yablokov M.M., Moskaleva E.O., Moskalev A.A. Allostatic load as a method of objectification of age-related viability of patients with ophthalmopathology. *Nauchnye rezultaty biomedicinskikh issledovaniy = Research Results in Biomedicine*, 2021, Vol. 7, no. 3, pp. 451-460. (In Russ.)]
6. Хараева З.Ф., Хоконова Т.М., Камбачокова З.А., Барокова Е.Б., Накова Л.В. Сывороточные значения цитокинов у пациентов с ишемической болезнью сердца и артериальной гипертензией // Клиническая лабораторная диагностика, 2018. Т. 63, № 10. С. 626-629. [Kharaeva Z.F., Khokonova T.M., Kambachokova Z.A., Barokova E.B., Noskova L.V. Serum cytokine values in patients with coronary heart disease and arterial hypertension. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika = Russian Clinical Laboratory Diagnostics*, 2018, Vol. 63, no. 10, pp. 626-629. (In Russ.)]
7. Чухраев А.М., Агарков Н.М., Коняев Д.А., Попова Е.В., Яблоков М.М., Кулабухов А.С. Информативность интерлейкинов слезной жидкости в диагностике и развитии закрытоугольной глаукомы в пожилом возрасте // Инфекция и иммунитет, 2020. Т. 10, № 4. С. 755-761. [Chukhraev A.M., Agarkov N.M., Konyayev D.A., Popova E.V., Yablokov M.M., Kulabukhov A.S. Informative value of lacrimal fluid interleukins in the diagnosis and development of angle-closure glaucoma in old age. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2020, Vol. 10, no. 4, pp. 755-761. (In Russ.)] doi: 10.15789/2220-7619-IIT-1247.
8. Barcelos A.L., Oliveira E.A., Haute G.V., Costa B.P., Pedrazza L., Donadio M.V., Oliveira J.R., Bodanese L.C. Association of IL-10 to coronary disease severity in patients with metabolic syndrome. *Clin. Chim. Acta*, 2019, no. 495, pp. 394-398.
9. Clarke R., Valdes-Marquez E., Hill M., Gordon J., Farrali M., Hamsten A., Watkins H., Hopewell J.C. Plasma cytokines and risk of coronary heart disease in the PROCARDIS study. *Open Heart*, 2018, Vol. 5, no. 1, e000807. doi: 10.1136/openhrt-2018-000807.
10. Danesh J., Kaptoge S., Mann A.G., Sarwar N., Wood A., Angleman S.B., Wensley F., Higgins J.P., Lennon L., Eiriksdottir G., Rumley A., Whincup P.H., Lowe G.D., Gudnason V. Long-term interleukin-6 levels and subsequent risk of coronary heart disease: two new prospective studies and a systematic review. *PLoS Med.*, 2018, Vol. 5, no. 4, e78. doi: 10.1371/journal.pmed.0050078.
11. Farrali J.A., Filla M.S., Peters D.M. Role of fibronectin in primary open angle glaucoma. *Cells*, 2019, Vol. 8, no. 12, 1518. doi: 10.3390/cells8121518.
12. Hosseini K., Mortazavi S.H., Sadeghian S., Ayati A., Nalini M., Aminorroaya A., Tavolinejad H., Salarifar M., Pourhosseini H., Aein A., Jalali A., Bozorgi A., Mehrani M., Kamangar F. Prevalence and trends of coronary artery disease risk factors and their effect on age of diagnosis in patients with established coronary artery disease: Tehran Heart Center (2005-2015). *BMC Cardiovasc. Disord.*, 2021, Vol. 21, no. 1, 477. doi: 10.1186/s12872-021-02293-y.
13. Laroche D., Nkrumah G., Ng C. Real-world efficacy of the Hydrus microstent in Black and Afro-Latinx patients with glaucoma: a retrospective study. *Ther Adv Ophthalmol.*, no. 12, 2515841420964311. doi: 10.1177/2515841420964311.
14. Liu H., Jin F., Li Q., Gao Y., Liu X., Hou R. IL-34 and coronary heart disease complicated with diabetes mellitus. *Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban*, 2021, Vol. 46, no. 12, pp. 1409-1414.
15. Mars N., Lindbohm J.V., Parolo P.D., Widen E., Kaprio J., Palotie A., Ripatti F.S. Systematic comparison of family history and polygenic risk across 24 common diseases. *Am. J. Hum. Genet.*, 2022, Vol. 109, no. 12, pp. 2152-2162. doi: 10.1016/j.ajhg.2022.10.009.
16. Ridker P.M., Rane M. Interleukin-6 signaling and anti-interleukin-6 therapeutics in cardiovascular disease. *Circ. Res.*, 2021, Vol. 128, no. 11, pp. 1728-1746.
17. Tanase D.M., Gosav E.M., Radu S., Ouatu A., Rezus C., Ciocoiu M., Costea C.F., Floria M. Arterial hypertension and interleukins: potential therapeutic target or future diagnostic marker? *Int. J. Hypertens.*, 2019, no. 2019, 3159283. doi: 10.1155/2019/3159283.
18. Wang Y., Zhou C., Yu T., Zhao F. Correlation between Changes in Serum RBP4, hs-CRP, and IL-27 levels and rosuvastatin in the treatment of coronary heart disease. *J. Healthc. Eng.*, 2021, no. 2021, 8476592. doi: 10.1155/2021/8476592.

19. Xu Y., Ye J., Wang M., Liu J., Wang Z., Jiang H., Ye D., Zhang J., Wan J. The expression of interleukin-25 increases in human coronary artery disease and is associated with the severity of coronary stenosis. *Anatol. J. Cardiol.*, 2020, Vol. 23, no. 3, pp. 151-159.

20. Yuan S., Lin A., He Q.Q., Burgess S., Larsson S.C. Circulating interleukins in relation to coronary artery disease, atrial fibrillation and ischemic stroke and its subtypes: A two-sample Mendelian randomization study. *Int. J. Cardiol.*, 2020, no. 319, pp. 99-104.

Авторы:

Фабрикантов О.Л. — д.м.н., профессор, директор Тамбовского филиала МНТК «Микрохирургия глаза имени академика С.Н. Федорова» Министерства здравоохранения РФ, г. Тамбов, Россия

Шурыгин С.Н. — д.м.н., заведующий кафедрой геронтологии, физической и реабилитационной медицины ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы», Москва, Россия

Липатова Т.Е. — д.м.н., доцент, заведующая кафедрой терапии с курсами кардиологии, функциональной диагностики и гериатрии ФГБОУ ВО «Саратовский государственный медицинский университет имени В.И. Разумовского» Министерства здравоохранения РФ, г. Саратов, Россия

Судаков О.В. — д.м.н., доцент, профессор кафедры управления в здравоохранении ФГБОУ ВО «Воронежский государственный медицинский университет имени Н.Н. Бурденко», г. Воронеж, Россия

Потапов В.Н. — д.м.н., профессор кафедры гериатрии и медико-социальной экспертизы ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного образования» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Чернов А.В. — д.м.н., доцент, заведующий кафедрой физической и реабилитационной медицины, гериатрии ИДПО ФГБОУ ВО «Воронежский государственный медицинский университет имени Н.Н. Бурденко», г. Воронеж, Россия

Шавкута Г.В. — д.м.н., профессор, заведующая кафедрой общей врачебной практики (семейной медицины) (с курсами гериатрии и физиотерапии) ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Ростов-на-Дону, Россия

Голиков А.В. — к.м.н., доцент кафедры хирургических болезней № 1 ФГБОУ ВО «Курский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Курск, Россия

Якунченко Т.И. — д.м.н., профессор, заведующая кафедрой пропедевтики внутренних болезней и клинических информационных технологий ФГАОУ ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет», г. Белгород, Россия

Аксёнов В.В. — заведующий лабораториями кафедры биомедицинской инженерии ФГБОУ ВО «Юго-Западный государственный университет», г. Курск, Россия

Authors:

Fabrikantov O.L., PhD, MD (Medicine), Professor, Director, S. Fedorov National Medical Research Center "MNTK Eye Microsurgery", Tambov, Russian Federation

Shurygin S.N., PhD, MD (Medicine), Head, Department of Gerontology, Physical and Rehabilitation Medicine, P. Lumumba Peoples' Friendship University of Russia, Moscow, Russian Federation

Lipatova T.E., PhD, MD (Medicine), Associate Professor, Head, Department of Therapy with Courses in Cardiology, Functional Diagnostics and Geriatrics, V. Razumovsky Saratov State Medical University, Saratov, Russian Federation

Sudakov O.V., PhD, MD (Medicine), Associate Professor, Professor of the Department of Management in Healthcare, N. Burdenko Voronezh State Medical University, Voronezh, Russian Federation

Potapov V.N., PhD, MD (Medicine), Professor of the Department of Geriatrics and Medical and Social Expertise, Russian Medical Academy of Continuing Education, Moscow, Russian Federation

Chernov A.V., PhD, MD (Medicine), Associate Professor, Head, Department of Physical and Rehabilitation Medicine, Geriatrics IDPO, N. Burdenko Voronezh State Medical University, Voronezh, Russian Federation

Shavkuta G.V., PhD, MD (Medicine), Professor, Head of the Department of General Medical Practice (Family Medicine) (with Courses of Geriatrics and Physiotherapy), Rostov State Medical University, Rostov-on-Don, Russian Federation

Golikov A.V., PhD (Medicine), Associate Professor of the Department of Surgical Diseases No. 1, Kursk State Medical University, Kursk, Russian Federation

Yakunchenko T.I., PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Department of Propaedeutics of Internal Diseases and Clinical Information Technologies, Belgorod State National Research University, Belgorod, Russian Federation

Aksenov V.V., Head, Laboratories of the Department of Biomedical Engineering Southwestern State University, Kursk, Russian Federation

Поступила 11.01.2023

Отправлена на доработку 20.01.2023

Принята к печати 24.02.2023

Received 11.01.2023

Revision received 20.01.2023

Accepted 24.02.2023

ЦИТОКИНОВЫЙ ПРОФИЛЬ У ПАЦИЕНТОВ С ВИБРАЦИОННОЙ БОЛЕЗНЬЮ, ОТЯГОЩЕННОЙ АРТЕРИАЛЬНОЙ ГИПЕРТЕНЗИЕЙ И ОЖИРЕНИЕМ

Чистова Н.П., Бодиенкова Г.М.

ФГБНУ «Восточно-Сибирский институт медико-экологических исследований», г. Ангарск, Иркутская обл., Россия

Резюме. Известно, что сочетанное течение артериальной гипертензии (АГ), сопровождающей избыточную массу тела, и вибрационной болезни (ВБ) способствует взаимному отягощению профессиональной и сердечно-сосудистой патологии. Несмотря на результаты многочисленных исследований, свидетельствующих о том, что при воздействии вибрации наблюдаются изменения в иммунной системе, вклад цитокинов в коморбидное течение вибрационной болезни изучен недостаточно. Цель работы – оценить роль медиаторов воспаления в развитии артериальной гипертензии и ожирения при вибрационной болезни.

Показатели цитокинового профиля определяли методом твердофазного иммуноферментного анализа с помощью тест-систем АО «Вектор-Бест».

Установлены однонаправленные изменения сывороточных концентраций цитокинов у пациентов с ВБ, отягощенной АГ, и лиц с ВБ без АГ, характеризующиеся возрастанием провоспалительных IL-1 β , TNF α , IL-17, противовоспалительного IL-4 и IFN γ , снижением многофункционального IL-2 относительно группы сравнения. Различия между группами, в зависимости от наличия или отсутствия АГ, заключались в компенсаторном нарастании противовоспалительного IL-10 у последних. При этом все пациенты с ВБ и АГ имели избыточную массу тела, в половине случаев – ожирение 1-й степени, что статистически значимо отличалось от лиц с ВБ без АГ. Показано, что IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-8, TNF α , по-видимому, играют роль в процессе развития ожирения, наибольший вклад вносит IL-1 β , о чем свидетельствуют установленные с помощью логистического регрессионного анализа количественные взаимосвязи индекса массы тела с их концентрациями.

Ограничением данного исследования может служить небольшой объем выборки.

Таким образом, установлено, что у пациентов с ВБ, отягощенной АГ и у пациентов с ВБ, неотягощенной АГ, выявлены однонаправленные изменения цитокинов относительно группы сравнения. У лиц с ВБ и АГ эти изменения были более выражены, что может свидетельствовать о том, что АГ является отягощающим фактором. Установленная зависимость между отдельными цитокинами (IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-8, TNF α) и ИМТ свидетельствует об участии их в развитии ожирения. Все вышеперечисленное может служить основанием для разработки профилактических и лечебных мероприятий, снижающих риск развития артериальной гипертензии и ожирения у лиц, работающих в условиях вибрационного воздействия.

Ключевые слова: цитокины, вибрационная болезнь, коморбидность, ожирение, индекс массы тела, артериальная гипертензия

Адрес для переписки:

Чистова Надежда Павловна
ФГБНУ «Восточно-Сибирский институт медико-экологических исследований»
665826, Россия, Иркутская обл.,
г. Ангарск, мкр. 12 «А», 3.
Тел.: 8 (924) 715-05-89.
E-mail: chistInad2pavl3@gmail.com

Address for correspondence:

Nadezhda P. Chistova
Eastern Siberia Institute of Medical and Ecological Studies
3 mcd 12 "A"
Angarsk, Irkutsk Region
665826 Russian Federation
Phone: +7 (924) 715-05-89.
E-mail: chistInad2pavl3@gmail.com

Образец цитирования:

Н.П. Чистова, Г.М. Бодиенкова «Цитокиновый профиль у пациентов с вибрационной болезнью, отягощенной артериальной гипертензией и ожирением» // Медицинская иммунология, 2024. Т. 26, № 2. С. 321-328. doi: 10.15789/1563-0625-CPI-2679

© Чистова Н.П., Бодиенкова Г.М., 2024
Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

N.P. Chistova, G.M. Bodienkova "Cytokine profile in patients with vibration disease, aggravated by hypertension and obesity", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2024, Vol. 26, no. 2, pp. 321-328. doi: 10.15789/1563-0625-CPI-2679

© Chistova N.P., Bodienkova G.M., 2024
The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License

DOI: 10.15789/1563-0625-CPI-2679

CYTOKINE PROFILE IN PATIENTS WITH VIBRATION DISEASE, AGGRAVATED BY HYPERTENSION AND OBESITY

Chistova N.P., Bodienkova G.M.

Eastern Siberia Institute of Medical and Ecological Studies, Angarsk, Irkutsk Region, Russian Federation

Abstract. Comorbid diseases which include arterial hypertension (AH) accompanied by overweight, and vibration disease (VD) are known to contribute to the mutual aggravation of occupational and cardiovascular pathology. Despite numerous studies indicating that some changes of immune system are observed when exposed to vibration, the contribution of cytokines to the comorbid course of vibration disease has not been sufficiently studied. The aim of the work is to evaluate the role of inflammatory mediators in development of hypertension and obesity in vibration disease.

The cytokine profile parameters were determined by ELISA immunoassay using “Vector-Best” test systems.

Some unidirectional changes in serum cytokine concentrations were found in patients with VD complicated by AH, and those with VD without AH, being characterized by increase in pro-inflammatory IL-1 β , TNF α , IL-17, anti-inflammatory IL-4 and IFN γ , and a decrease in multifunctional IL-2 cytokinem, relative to the comparison group. The groups with versus without AH differed in compensatory increase of anti-inflammatory IL-10 in the latter group. At the same time, all patients with combined VD and AH had excessive body weight, with grade 1 obesity in half of the cases, thus being significantly different from those with VD without AH. It is shown that IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-8, TNF α play an apparent role in the development of obesity. The greatest contribution is observed for IL-1 β , as evidenced by the quantitative relationship of body mass index with its concentrations as assessed by logistic regression analysis. The limitation of this study may be a small sample size.

It was found that the unidirectional changes in cytokines when compared to the comparison group were revealed in patients with VD complicated by AH, and in patients with VD without AH. In the subjects with VD and AH, these changes were more pronounced, which may suggest the hypertension is an aggravating factor. The established relationship between individual cytokines (IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-8, TNF α) and BMI indicates their participation in development of obesity. All these findings may provide a basis for development of preventive and therapeutic measures that reduce the risk of hypertension and obesity in the people working under permanent exposure of vibration.

Keywords: cytokines, vibration disease, comorbidity, obesity, body mass index, arterial hypertension

Введение

Многочисленные исследования свидетельствуют, что вибрация вызывает изменения на молекулярном, клеточном и субклеточном уровнях. Так, предыдущими исследованиями установлено, что при воздействии вибрации наблюдаются изменения в иммунной системе, характеризующиеся дисбалансом цитокинов, фенотипического спектра лимфоцитов и др. [11]. Выявлена взаимосвязь между изменением иммунологических и нейрофизиологических показателей, характеризующих состояние центральной и периферической нервной систем [7]. Роль медиаторов воспаления в развитии АГ при ВБ в настоящее время исследована недостаточно. Имеются немногочисленные противоречивые сообщения, свидетельствующие о взаимосвязи цитокинов и ожирения [5]. Вместе с тем роль механизмов цитокиновой регуляции, иммунного ответа при коморбидном течении ВБ, остается недоста-

точно исследованной проблемой. В настоящее время представляет интерес изучение взаимного влияния АГ и ожирения между собой. Так, в исследованиях Аметова А.С. и соавт. показана связь избыточной массы тела с АГ. Установлено, что при превышении массы тела на каждые 5 кг систолическое давление увеличивается на 4,4 мм рт. ст. [1]. В работе Атаманчук А.А. и соавт. в подгруппе пациентов с возрастом 50-59 лет отмечались более высокие значения индекса массы тела (ИМТ) у лиц с ВБ и АГ (27,0 кг/м²) по сравнению с обследованными без АГ (24,6 кг/м²). При этом у лиц, экспонированных умеренными уровнями вибрации, по сравнению с рабочими, подвергавшимися воздействию высоких уровней вибрации, наблюдались более высокие показатели ИМТ (27,2 кг/м² и 25,4 кг/м² соответственно) [3]. Таким образом, можно предположить, что ожирение является фактором риска формирования АГ, в том числе у лиц с ВБ.

По данным Государственного доклада, в последние годы вибрационная болезнь (ВБ) неизменно занимает в структуре профессиональной патологии второе место (47%). При этом в 2021 году количество впервые выявленных случаев ВБ увеличилось, по сравнению с 2020 годом, на 30% [12]. В работе Паначевой Л.А. у пациентов с ВБ от воздействия локальной вибрации артериальная гипертензия (АГ) выявлялась у 94% лиц [14]. Сочетанное течение АГ и ВБ способствует взаимному отягощению профессиональной и сердечно-сосудистой патологии [2]. По данным современных эпидемиологических исследований, АГ увеличивает риск смерти от ишемической болезни сердца в 3 раза, а от инсульта в 6 раз [4]. Таким образом, изучение иммунных нарушений при коморбидном течении ВБ, АГ и ожирения является важной медико-социальной задачей иммунологии.

Цель исследования заключалась в оценке роли медиаторов воспаления в развитии артериальной гипертензии и ожирения при вибрационной болезни.

Материалы и методы

В клинике института было проведено обследование 28 мужчин с ВБ, отягощенной АГ, в возрасте $53,7 \pm 0,68$ года и стажем работы $22,5 \pm 0,85$ года. В качестве групп сравнения были обследованы 15 мужчин с ВБ, у которых не были выявлены АГ и ожирение (возраст — $47,8 \pm 1,1$ года, стаж — $19,9 \pm 6,8$ года), а также 34 «условно здоровых» мужчины, сопоставимые по возрасту и не экспонированные вибрацией. Объем выборки был рассчитан на основе предыдущих исследований. Постановка диагноза проводилась в соответствии с Международной классификацией болезней 11-го пересмотра (МКБ-11). Обследование пациентов проводилось в соответствии с этическими стандартами Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации и «Правилами клинической практики в Российской Федерации», утвержденными Приказом Минздрава РФ. Всеми пациентами было подписано информированное согласие на участие в исследовании.

Кровь для исследований забирали в утренние часы натощак, используя пробирки Vacutainer. Далее их центрифугировали при 2000 об/мин в течение 15 минут для получения сыворотки. Показатели цитокинового профиля (IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-8, IL-10, IL-17, TNF α , IFN γ) определяли в сыворотке крови методом твердофазного иммуноферментного анализа с помощью тест-систем (АО «Вектор-Бест», Новосибирск).

У всех пациентов с ВБ был рассчитан индекс массы тела (ИМТ) по формуле:

$$\text{ИМТ (кг/м}^2\text{)} = \text{Вес (кг)} / (\text{Рост (м)})^2.$$

Нормальный ИМТ для мужчин определяли в границах 23–25 кг/м², избыточная масса тела (предожирение) регистрировалась при значениях 25–30 кг/м², ожирение 1-й степени — при 30–35 кг/м². У всех лиц, включенных в контрольную группу, ИМТ принимал значения, характерные для норм.

Статистическую обработку полученных результатов проводили с помощью пакета прикладных программ STATISTICA 10. Для проверки на нормальность применяли критерий Шапиро–Уилка. Возраст обследованных представлен в виде средней (M) и ее ошибки (m). Для описания остальных данных выполняли вычисление медианы (Me), верхнего и нижнего квартиля (Q_{0,25}–Q_{0,75}). Сравнение групп проводили с помощью непараметрических критериев ANOVA Краскала–Уоллиса и Манна–Уитни. Уровень значимости с поправкой Бонферрони был принят как $p < 0,017$. Для установления количественных зависимостей между содержанием цитокинов и индексом массы тела использовался логистический регрессионный анализ.

Результаты

В предыдущих исследованиях нами показано, что течение ВБ сопровождается выраженными изменениями в иммунной системе, характеризующимися нарушением аутоиммунной регуляции, цитокинового баланса и фенотипического спектра лимфоцитов [6]. Учитывая, что при ВБ высока доля пациентов, имеющих АГ (78,4%), представляла определенный интерес провести сопоставление изменений цитокинового профиля в зависимости от наличия или отсутствия АГ (табл. 1). Результаты проведенного исследования показали, что у пациентов с ВБ, ассоциированной с АГ, и у лиц с ВБ, неотягощенной АГ, при сопоставлении с группой сравнения наблюдались однонаправленные изменения. Установлено возрастание провоспалительных IL-1 β ($p = 0,001$ и $p = 0,001$ соответственно), TNF α ($p = 0,002$, $p = 0,01$), IL-17 ($p = 0,001$, $p = 0,01$), противовоспалительного IL-4 ($p = 0,001$, $p = 0,001$), IFN γ ($p = 0,01$, $p = 0,01$), а также снижение IL-2 ($p = 0,001$, $p = 0,001$). Обращает на себя внимание тот факт, что различия между пациентами с ВБ, отягощенной АГ, и ВБ без АГ, статистически значимые изменения были обнаружены только для IL-10. У пациентов с ВБ, неотягощенной АГ, было зарегистрировано его статистически значимое нарастание ($p = 0,003$).

На следующем этапе наших исследований представляло определенный интерес выявить зависимость изменений сывороточных концентраций цитокинов от наличия или отсутствия ожирения. Сравнительный анализ индекса мас-

ТАБЛИЦА 1. ЗНАЧЕНИЯ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ЦИТОКИНОВОГО ПРОФИЛЯ У ОБСЛЕДОВАННЫХ, Ме (Q_{0,25}-Q_{0,75})

TABLE 1. VALUES OF CYTOKINE PROFILE INDICATORS IN THE EXAMINED PATIENTS, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

Показатель, ед. изм. Indicator, units of measure	Группа 1 Вибрационная болезнь с артериальной гипертензией Group 1 Vibration disease with arterial hypertension n = 28	Группа 2 Вибрационная болезнь без артериальной гипертензии Group 2 Vibration disease without arterial hypertension n = 15	Контрольная группа Control group n = 34	р по Краскелу– Уоллису p according to Kruskal–Wallis
IL-1β, пг/мл IL-1β, pg/mL	12,81 (8,41-53,69)*	10,10 (8,13-29,23)¤	3,37 (1,21-6,19)	0,0001
IL-2, пг/мл IL-2, pg/mL	0,1 (0,01-4,22)*	0,01 (0,01-2,73)¤	4,22 (2,68-6,33)	0,0011
IL-4, пг/мл IL-4, pg/mL	4,27 (3,08-8,21)*	4,63 (2,61-6,73)¤	0,01 (0,01-0,32)	0,0001
IL-8, пг/мл IL-8, pg/mL	7,59 (6,21-18,85)	7,66 (6,42-18,20)	6,24 (2,22-18,76)	0,8
IL-10, пг/мл IL-10, pg/mL	0,01 (0,01-0,01)	1,37 (0,01-3,10)^	0,01 (0,01-1,55)	0,05
IL-17, пг/мл IL-17, pg/mL	15,07 (8,42-33,79)*	13,06 (6,04-45,34)¤	0,01 (0,01-11,14)	0,013
TNFα, пг/мл TNFα, pg/mL	2,17 (1,58-4,36)*	2,21 (1,32-3,47)¤	0,73 (0,01-1,48)	0,0028
IFNγ, пг/мл IFNγ, pg/mL	1,38 (0,25-8,92)*	1,87 (0,57-4,21)¤	0,02 (0,01-1,16)	0,004

Примечание. * – различия между 1-й и 3-й группами статистически значимы, $p < 0,017$; ¤ – различия между 2-й и 3-й группами статистически значимы, $p < 0,017$; ^ – различия между 1-й и 2-й группами статистически значимы, $p < 0,017$.

Note. *, differences between groups 1 and 3 are statistically significant, $p < 0.017$; ¤, differences between groups 2 and 3 are statistically significant, $p < 0.017$; ^, differences between groups 1 and 2 are statistically significant, $p < 0.017$.

ТАБЛИЦА 2. ПЕРЕМЕННЫЕ ЛОГИСТИЧЕСКОЙ РЕГРЕССИИ, ОКАЗЫВАЮЩИЕ ВЛИЯНИЕ НА ИМТ У ЛИЦ С ВИБРАЦИОННОЙ БОЛЕЗНЬЮ

TABLE 2. LOGISTIC REGRESSION VARIABLES INFLUENCING THE FORMATION OF OBESITY IN INDIVIDUALS WITH VIBRATION DISEASE

Переменная Variable	Свобод. член Free term	р	Скорр. r ² Corrected r ²	F	Станд. ошибка Standard error
IL-1β	2,3	0,001	0,19	7,7	0,19
IL-2	2,01	0,001	-0,01	0,8	0,9
IL-4	1,9	0,001	-0,03	0,17	0,3
IL-8	2,2	0,001	0,02	1,6	0,2
TNFα	2,3	0,001	0,03	1,8	0,3

сы тела показал избыточную массу тела у всех обследованных пациентов с ВБ в сочетании с АГ. У них зарегистрирован статистически значимо высокий ИМТ (29,6 (26,6-32,4) кг/м², $p = 0,001$) при сопоставлении с пациентами с ВБ, неотягощенной АГ (25,2 (23,4-27,1) кг/м²). При этом у 50%

ИМТ превышал значение 30 кг/м², что соответствовало ожирению.

Для проведения логистического регрессионного анализа обследованные были распределены на 3 подгруппы. В подгруппу с кодом 1 были включены пациенты с избыточной массой тела

(ИМТ 25-29 кг/м²), подгруппу с кодом 2 составляли лица с ожирением (ИМТ \geq 30 кг/м²), подгруппу с кодом 3 представляли пациенты с ВБ без ожирения и избыточной массы тела (ИМТ $<$ 24,9 кг/м²). В качестве зависимой переменной использовали кодированные группы, независимые переменные – указанные выше уровни цитокинов. Анализ полученных результатов позволил установить количественные взаимосвязи ИМТ с уровнями IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-8, TNF α (табл. 2). Наибольший вклад в развитие ожирения внес IL-1 β ($r^2 = 0,19$, $p = 0,001$).

Таким образом, результаты проведенного исследования и данные литературы позволили обозначить цитокины, отягощающие течение и играющие важную роль в развитии ожирения.

Обсуждение

Анализ показателей иммунного статуса позволил выявить изменения в гуморальном звене иммунной системы. Согласно полученным результатам, в группах ВБ с АГ и ВБ, неотягощенной АГ, отмечались однонаправленные изменения IL-1 β , IL-4, IL-17, TNF α , IFN γ и IL-2, по сравнению с группой сравнения, что было больше выражено в группе с ВБ и АГ. По данным других исследований, в том числе проведенных нами ранее, у лиц с ВБ отмечалось изменение концентраций IL-1 β , IL-2, IL-4, TNF α , IFN γ , по сравнению с контрольной группой [6, 9, 11]. Результаты регрессионного анализа показали зависимость индекса массы тела от содержания цитокинов IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-8, TNF α , при этом для IL-1 β был отмечен наибольший вклад в формирование ожирения у лиц с ВБ. Отмечено, что IL-1, IL-2, IL-8, TNF α и IFN γ относятся к провоспалительным цитокинам (IL-4 – к противовоспалительным), которые вовлечены в патогенез ожирения и сопутствующих заболеваний, таких как артериальная гипертензия и сахарный диабет 2-го типа [15].

Известно, что действие IL-1 β в жировой ткани направлено на уменьшение ее гиперплазии, активацию липолиза и ингибирование дифференцировки преадипоцитов, что в целом должно приводить к снижению способности жировой ткани накапливать триглицериды. Исследование E. Maculewicz показало ассоциацию повышенного ИМТ и высокого содержания жировой массы тела с мутантными аллелями генов IL-1 β и IL-1Ra (антагонист рецептора к IL-1) [24]. Установлено, что продукция IL-1 β увеличивается в ответ на образование окисленных липопротеинов низкой плотности при атеросклерозе [16]. При модифицированном атеросклерозе у животных также наблюдалось увеличение concentra-

ции этого цитокина и уменьшение экспрессии его рецептора [25].

Для лиц с ВБ и ожирением были характерны высокие уровни IL-4. Известно, что IL-4 представляет собой противовоспалительное соединение, которое вызывает пролиферацию В-лимфоцитов и регулирует секрецию иммуноглобулинов. Внутривенные инфузии IL-4 тучным мышам дикого типа, получавших диету с высоким содержанием жиров, уменьшали воспалительную активность в жировой ткани и системе кровообращения [26]. Результаты данного исследования показали, что макрофаги, подвергавшиеся воздействию IL-4, приобретали противовоспалительный фенотип, при этом увеличивалась их липофагия и митохондриальная активность.

В исследовании Бабанова С.А., так же как и в нашей работе, было показано статистически значимое повышение концентрации TNF α у лиц с ВБ независимо от вида воздействующей вибрации [6]. TNF α – внеклеточный белок, многофункциональный провоспалительный цитокин, образуется как адипоцитами, так и инфильтрирующими ткань макрофагами и лимфоцитами [21]. Он играет важную роль в метаболизме и функционировании жировых клеток, а именно, ингибирует липопротеиновую липазу и экспрессию ядерного рецептора пролифератора пероксисом, что может приводить к накоплению триглицеридов и увеличению объема висцеральной жировой ткани – концентрация TNF α коррелирует с ее массой. Культуры макрофагов и адипоцитов, выделенные из жировой ткани при ожирении, содержат в повышенных концентрациях такие цитокины, как TNF α и IL-6, при этом разграничить источники цитокинов жировой ткани практически невозможно [28].

Еще один важный цитокин, высокие уровни которого отмечены в нашей работе, IFN γ , продуцируется Т-клетками, макрофагами, гладкомышечными клетками сосудов и имеет ключевое значение в патогенезе атеросклероза. Установлено, что его воздействие изменяет экспрессию генов, отвечающих за метаболизм липидов, воспалительные реакции и образование хемокинов [23]. Повышенной продукцией хемокинов и хемокиновых рецепторов характеризуются стимулированные IFN γ адипоциты [17]. Этот цитокин способствует образованию TNF α и IL-6 и действует синергично с ними. При этом он способствует формированию атеросклеротической бляшки через атерогенную модификацию липидов [27].

У лиц с ВБ было отмечено повышение уровня IL-17, более выраженное у пациентов с ВБ и АГ. По литературным данным уровень IL-17 возрастает как у людей с избыточной массой тела,

так и при выраженном морбидном ожирении, а также может являться одним из диагностических показателей развития и течения профессионального заболевания [8, 13]. В исследовании Бодровой Е.А. и соавт. были установлены достоверные умеренные прямые корреляционные связи между содержанием IL-17, IL-1, IL-6, TNF α и ИМТ, а также с ультразвуковыми показателями, отражающими геометрию ЛЖ и сосудистое ремоделирование [10]. IL-17 продуцируется Т-хелперными лимфоцитами, его функция заключается в стимуляции образования IL-6 и IL-8. Подтверждена роль IL-17 в иммунопатогенезе нейротоксикации парами ртути [8].

В наших исследованиях зарегистрировано снижение IL-2, который является многофункциональным цитокином и участвует в развитии хронического слабовыраженного воспаления у лиц с ожирением, следовательно, он может представлять собой маркер метаболического воспаления и резистентности к инсулину [22]. Отмечено, что диета с высоким содержанием жиров у мышей подавляла синтез IL-2 [19]. В работе Godoy G.J. и соавт. было показано, что IL-2 имеет важное значение в поддержании нормального функционирования Т-клеток, а при его дефиците наблюдаются аутоиммунные реакции [20].

Особенностью группы ВБ без АГ было увеличение концентрации IL-10. Он используется иммунными клетками для подавления воспаления. По данным литературы этот цитокин может порождать инсулинорезистентность и подавлять расход энергии адипоцитами, способствуя развитию ожирения [18]. Можно предположить, что

повышенное содержание IL-10 у лиц без АГ носило компенсаторный характер.

Данные нашего исследования показали отсутствие статистически значимых различий в содержании IL-8. IL-8 — один из основных провоспалительных цитокинов, в основном секретируется макрофагами, его основная функция — привлечение нейтрофилов, эти клетки оказываются задействованными на начальных стадиях воспаления. Равные уровни IL-8 во всех группах можно объяснить тем, что в группе с ВБ и АГ воспаление носит хронический характер и патогенетические механизмы, связанные с IL-8, оказались незадействованными в данном случае.

Ограничением нашего исследования может служить небольшой объем выборки.

Заключение

Таким образом, установлено, что у пациентов с ВБ, отягощенной АГ, и у пациентов с ВБ, неотягощенной АГ, выявлены однонаправленные изменения цитокинов относительно группы сравнения. У лиц с ВБ и АГ эти изменения были более выражены, что может свидетельствовать о том, что АГ является отягощающим фактором. Установленная зависимость между отдельными цитокинами (IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-8, TNF α) и ИМТ свидетельствует об участии их в развитии ожирения. Все вышеперечисленное может служить основанием для разработки профилактических и лечебных мероприятий, снижающих риск развития артериальной гипертензии и ожирения у лиц, работающих в условиях вибрационного воздействия.

Список литературы / References

1. Аметов А.С., Демидова Т.Ю., Целиковская А.Л. Ожирение и сердечно-сосудистые заболевания // Терапевтический архив, 2002. Т. 74, № 10. С. 5-7. [Ametov A.S., Demidova T.Yu., Tselikovskaya A.L. Obesity and cardiovascular disease. *Terapevticheskiy arkhiv = Therapeutic Archive*, 2002, Vol. 74, no. 10, pp. 5-7. (In Russ.)]
2. Артамонова В.Г. Некоторые современные аспекты патогенеза вибрационной болезни // Медицина труда и промышленная экология, 2000. № 2. С. 1-4. [Artamonova V.G. Some modern aspects of the pathogenesis of vibration disease. *Meditsina truda i promyshlennaya ekologiya = Russian Journal of Occupational Health and Industrial Ecology*, 2000, no. 2, pp. 1-4. (In Russ.)]
3. Атаманчук А.А. Факторы риска гипертонической болезни у пациентов с вибрационной болезнью в Московской области // Медицина труда и промышленная экология, 2011. № 8. С. 21-26. [Atamantchuk A.A., Liubtchenko P.N., Shirokova E.B. Risk factors of arterial hypertension in vibration disease patients in Moscow region. *Meditsina truda i promyshlennaya ekologiya = Russian Journal of Occupational Health and Industrial Ecology*, 2011, no. 8, pp. 21-26. (In Russ.)]
4. Афанасова О.Е., Потеряева Е.Л., Верещагина Г.Н. Влияние условий труда на формирование артериальной гипертензии у работающих в условиях высокого профессионального риска // Медицина труда и промышленная экология, 2010. № 8. С. 19-22. [Afanasova O.E., Poteryaeva E.L., Vereshagina G.N. Influence of work conditions on arterial hypertension formation in workers under high occupational risk. *Meditsina truda i promyshlennaya ekologiya = Russian Journal of Occupational Health and Industrial Ecology*, 2010, no. 8, pp. 19-22. (In Russ.)]
5. Бабанов С.А., Бараева Р.А., Стрижаков Л.А., Моисеев С.В., Фомин В.В. Цитокиновая регуляция и эндотелиальная дисфункция при сочетании вибрационной болезни и артериальной гипертензии // Тера-

пептический архив, 2021. № 6. С. 693-698. [Babanov S.A., Baraeva R.A., Strizhakov L.A., Moiseev S.V., Fomin V.V. The state of cytokine regulation and endothelial dysfunction in the combined course of vibration disease and arterial hypertension. *Terapevticheskiy arkhiv = Therapeutic Archive*, 2021, no. 6, pp. 693-698. (In Russ.)]

6. Бабанов С.А., Бараева Р.А., Будащ Д.С., Байкова А.Г. Состояние иммунного профиля и цитокины при вибрационной болезни // Русский медицинский журнал. Медицинское обозрение, 2018. № 1-2. С. 108-112. [Babanov S.A., Baraeva R.A., Budash D.S., Bajkova A.G. The state of the immune profile and cytokines in vibration disease. *Russkiy meditsinskiy zhurnal. Meditsinskoe obozrenie = Russian Medical Inquiry*, 2018, no. 1-2, pp. 108-112. (In Russ.)]

7. Бодиенкова Г.М., Курчевенко С.И., Русанова Д.В. Нейроаутоиммунные процессы при вибрационной болезни // Нейрохимия, 2018. Т. 35, № 3. С. 269-274. [Bodienkova G.M., Kurchevenko S.I., Rusanova D.V. Neuroautoimmune processes in vibration disease. *Neyrokhimiya = Neurochemical Journal*, 2018, Vol. 35, no. 3, pp. 269-274. (In Russ.)]

8. Бодиенкова Г.М., Боклаженко Е.В. Диагностическая информативность IL-17 при нейроинтоксикации парами ртути // Медицинская иммунология, 2021. Т. 23, № 2. С. 395-400. [Bodienkova G.M., Boklazhenko E.V. Diagnostic value of IL-17 in neurointoxication with mercury. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2021, Vol. 23, no. 2, pp. 395-400. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-DVO-2139.

9. Бодиенкова Г.М., Курчевенко С.И., Русанова Д.В. Роль цитокинов в развитии нарушений периферической нервной системы при вибрационной болезни // Российский иммунологический журнал, 2017. Т. 11, № 1 (20). С. 58-63. [Bodienkova G.M., Kurchevenko S.I., Rusanova D.V. Role of cytokines in developmental disorders peripheral nervous system in vibration induced diseases. *Rossiyskiy immunologicheskiy zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2017, Vol. 11, no. 1 (20), pp. 58-63. (In Russ.)]

10. Бодрова Е.А., Кондрючая Н.С., Захаров Ю.В., Давыдов С.И., Бабаева А.Р. Взаимосвязь провоспалительных цитокинов и структурно-функциональных нарушений сердца при артериальной гипертензии и метаболическом синдроме // Современные проблемы науки и образования, 2020. Т. 1. С. 62. [Bodrova E.A., Kondryuchaya N.S., Zakharov Y.V., Davydov S.I., Babaeva A.R. Relationship between proinflammatory cytokines and heart structural and functional abnormalities in arterial hypertension and metabolic syndrome. *Sovremennye problemy nauki i obrazovaniya = Modern Problems of Science and Education*, 2020, no. 1, p. 62. (In Russ.)]

11. Боклаженко Е.В., Бодиенкова Г.М. Дисбаланс состава лимфоцитов и цитокинового профиля как фактор риска развития вибрационной болезни // Анализ риска здоровью, 2022. № 1. С. 140-143. [Boklazhenko E.V., Bodienkova G.M. Imbalance in lymphocyte composition and cytokine profile as a risk factor of vibration disease. *Analiz riska zdorovuyu = Health Risk Analysis*, 2022, no. 1, pp. 140-143. (In Russ.)]

12. Государственный доклад «О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2021 г.» [State report "On the state of sanitary and epidemiological expenditure of the population in the Russian Federation in 2021". (In Russ.)]

13. Гусова З.Р., Дзантиева Е.О., Хрипун И.А. Иммунологические аспекты ожирения // Альманах клинической медицины, 2015. № S1. С. 30-35. [Gusova Z.R., Dzantieva E.O., Khripun I.A. Immunological aspects of obesity. *Almanakh klinicheskoy meditsiny = Almanac of Clinical Medicine*, 2015, no. S1, pp. 30-35. (In Russ.)]

14. Паначева Л.А., Платонова Е.А., Кузнецова Г.В. Частота и клинические проявления метаболического синдрома при вибрационной болезни // Медицина труда и промышленная экология, 2011. № 10. С. 36-39. [Panacheva L.A., Platonova E.A., Kouznetsova G.V. Prevalence and clinical manifestations of metabolic syndrome in vibration disease. *Meditsina truda i promyshlennaya ekologiya = Russian Journal of Occupational Health and Industrial Ecology*, 2011, no. 10, pp. 36-39. (In Russ.)]

15. Рашидова М.А., Даренская М.А., Колесникова Л.И. Роль некоторых цитокинов (ИЛ-1, ИЛ-6, ИЛ-18, ИЛ-22, ФНО- α) в генезе ожирения // Современные проблемы науки и образования, 2022. № 6. С. 2. [Rashidova M.A., Darenskaya M.A., Kolesnikova L.I. The role of some cytokines (IL-1, IL-6, IL-18, IL-22, TNF- α) in the genesis of obesity. *Sovremennye problemy nauki i obrazovaniya = Modern Problems of Science and Education*, 2022, no. 6, p. 2. (In Russ.)]

16. Спиридонов А.Н., Худякова А.Д., Рагино Ю.И. Адипокины/цитокины и нарушения липидного обмена // Атеросклероз, 2022. Т. 18, № 2. С. 157-164. [Spiridonov A.N., Hudyakova A.D., Ragino Yu.I. Adipokines/cytokines and lipid metabolism disorders. *Ateroskleroz = Atherosclerоз*, 2022, Vol. 18, no. 2, pp. 157-164. (In Russ.)]

17. Чаулин А.М., Григорьева Ю.В. Воспаление при атеросклерозе: от теории к практике // Бюллетень науки и практики, 2020. Т. 6, № 10. С. 186-205. [Chaulin A., Grigoryeva Yu. Inflammation in atherosclerosis: from theory to practice. *Byulleten nauki i praktiki = Bulletin of Science and Practice*, 2020, Vol. 6, no. 10, pp. 186-205. (In Russ.)]

18. Beppu L.Y., Mooli R.G.R., Qu X., Marrero G.J., Finley C.A., Fooks A.N., Mullen Z.P., Frias A.B. Jr., Sipula I., Xie B., Helfrich K.E., Watkins S.C., Poholek A.C., Ramakrishnan S.K., Jurczak M.J., D'Cruz L.M. Tregs facilitate obesity and insulin resistance via a Blimp-1/IL-10 axis. *J. Clin. Investig.*, 2021, Vol. 6, no. 3, e140644. doi: 10.1172/jci.insight.140644.

19. Chen Z., Sui G., Wang L., Yang C., Wang F. High-fat diet induced hippocampal CREB dysfunction, cognitive impairment and depression-like behaviors via downregulation of interleukin-2 in the mice. *Metab. Brain Dis.*, 2022, Vol. 37, no. 4, pp. 1163-1174.

20. Godoy G.J., Olivera C., Paira D.A., Salazar F.C., Ana Y., Stempin C.C., Motrich R.D., Rivero V.E. T regulatory cells from non-obese diabetic mice show low responsiveness to IL-2 stimulation and exhibit

differential expression of anergy-related and ubiquitination factors. *Front. Immunol.*, 2019, no. 10, 2665. doi: 10.3389/fimmu.2019.02665.

21. Jang D.I., Lee A.H., Shin H.Y., Song H.R., Park J.H., Kang T.B., Lee S.R., Yang S.H. The role of tumor necrosis factor alpha (TNF- α) in autoimmune disease and current TNF- α inhibitors in therapeutics. *Int. J. Mol. Sci.*, 2021, Vol. 22, no. 5, 2719. doi: 10.3390/ijms22052719.

22. Kochumon S., Al Madhoun A., Al-Rashed F., Thomas R., Sindhu S., Al-Ozairi E., Al-Mulla F., Ahmad R. Elevated adipose tissue associated IL-2 expression in obesity correlates with metabolic inflammation and insulin resistance. *Sci. Rep.*, 2020, Vol. 10, no. 1, pp. 163-164.

23. Mach F., Sauty A., Iarossi A.S., Sukhova G.K., Neote K., Libby P., Luster A.D. Differential expression of three T lymphocyte-activating CXC chemokines by human atheroma-associated cells. *J. Clin. Investig.*, 1999, Vol. 104, no. 8, pp. 1041-1050.

24. Maculewicz E., Antkowiak B., Antkowiak O., Borecka A., Mastalerz A., Leońska-Duniec A., Humińska-Lisowska K., Michałowska-Sawczyn M., Garbacz A., Lorenz K., Szarska E., Dziuda Ł., Cywińska A., Ciężczyk P. The interactions between interleukin-1 family genes: IL1A, IL1B, IL1RN, and obesity parameters. *BMC Genomics*, 2022, Vol. 9, no. 23 (1), 112. doi: 10.1186/s12864-021-08258-x.

25. Okamoto M., Ohara-Imaizumi M., Kubota N., Hashimoto S., Eto K., Kanno T., Kubota T., Wakui M., Nagai R., Noda M., Nagamatsu S., Kadowaki T. Adiponectin induces insulin secretion *in vitro* and *in vivo* at a low glucose concentration. *Diabetologia*, 2008, no. 51, pp. 827-835.

26. Phu T.A., Ng M., Vu N.K., Bouchareychas L., Raffai R.L. IL-4 polarized human macrophage exosomes control cardiometabolic inflammation and diabetes in obesity. *Mol. Ther.*, 2022, Vol. 30, no. 6, pp. 2274-2297.

27. Tenger C., Sundborger A., Jawien J., Zhou X. IL-18 accelerates atherosclerosis accompanied by elevation of IFN- γ and CXCL16 expression independently of T cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 2005, Vol. 25, no. 4, pp. 791-796.

28. Weisberg S.P., McCann D., Desai M., Rosenbaum M., Leibel R.L., Ferrante A.W.Jr. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J. Clin. Invest.*, 2003, Vol. 112, no. 12, pp. 1796-1808.

Авторы:

Чистова Н.П. — младший научный сотрудник, аспирант ФГБНУ «Восточно-Сибирский институт медико-экологических исследований», г. Ангарск, Иркутская обл., Россия

Бодиенкова Г.М. — д.м.н., профессор, заведующая лабораторией иммуно-биохимических и молекулярно-генетических исследований в гигиене ФГБНУ «Восточно-Сибирский институт медико-экологических исследований», г. Ангарск, Иркутская обл., Россия

Authors:

Chistova N.P., Junior Research Associate, Postgraduate Student, Eastern Siberia Institute of Medical and Ecological Studies, Angarsk, Irkutsk Region, Russian Federation

Bodienko G.M., PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Laboratory of Immunobiochemical and Molecular Biology Studies in Hygiene, Eastern Siberia Institute of Medical and Ecological Studies, Angarsk, Irkutsk Region, Russian Federation

Поступила 28.03.2023
Принята к печати 07.05.2023

Received 28.03.2023
Accepted 07.05.2023

ЦИТОКИНОВЫЙ ПРОФИЛЬ БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКИМ МИЕЛОЛЕЙКОЗОМ

Александрова Т.Н.¹, Мулина И.И.², Лямкина А.С.¹,
Студеникина А.А.^{1,3}, Вараксин Н.А.⁴, Михайлова Е.С.^{1,3},
Поспелова Т.И.¹, Аутеншлюс А.И.^{1,3}

¹ ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Новосибирск, Россия

² ГАУ РС(Я) «Республиканская больница № 1 – Национальный центр медицины», г. Якутск, Россия

³ Научно-исследовательский институт молекулярной биологии и биофизики ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины», г. Новосибирск, Россия

⁴ АО «Вектор-Бест», г. Новосибирск, Россия

Резюме. Развитие резистентности к ингибиторам тирозинкиназ (ИТК) в настоящее время является важной клинической проблемой в лечении больных хроническим миелолейкозом (ХМЛ). Исследования последних лет свидетельствуют о том, что одним из BCR/ABL-независимых факторов резистентности может являться aberrантная секреция цитокинов, способствующая персистенции лейкемических стволовых клеток на фоне непрерывной таргетной терапии.

Цель исследования – изучение концентрации цитокинов в сыворотке крови у больных ХМЛ в зависимости от эффективности лечения.

Определение концентрации цитокинов TNF α , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17, IL-18, IFN α и VEGF-A в сыворотке крови больных ХМЛ в хронической фазе (n = 84) и условно здоровых лиц (n = 30) проводили с помощью иммуноферментного анализа (ИФА). Больные ХМЛ в зависимости от длительности терапии были разделены на 3 группы: группа I – впервые выявленные больные (n = 10), группа II – больные, получающие терапию менее 12 месяцев (n = 10), и группа III – больные, получающие терапию более 12 месяцев – (n = 64).

Результаты исследования показали, что концентрация цитокинов среди больных ХМЛ статистически значимо различалась в зависимости от длительности терапии. Достоверно более высокая концентрация цитокинов IL-17, IL-6, IL-1 β , IL-10, IL-18, IL-2 и TNF α была характерна для I группы больных по сравнению с контрольной группой. II группа больных также характеризовалась достоверно более высокими концентрациями TNF α , IL-6, IL-10, IL-18 и IFN α по сравнению с контрольной, а также IFN α по сравнению с группами I и III. У III группы больных концентрации IL-17, IL-1 β , TNF α , IL-6, IL-10, IL-18 были статистически значимо выше по сравнению с контрольной группой. При сравнении показателей больных III группы с больными I группы установлено, что концентрации IL-1 β , IL-2 и IL-18 были статистически значимо ниже. Выявлена прямая корреляционная связь

Адрес для переписки:

Александрова Туйара Никоновна
ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный
медицинский университет» Министерства
здравоохранения РФ
630091, Россия, г. Новосибирск, Красный пр., 52.
Тел./факс: 8 (924) 874-81-34.
E-mail: alexandrova_tuyara@mail.ru

Address for correspondence:

Tuiara N. Aleksandrova
Novosibirsk State Medical University
52 Krasny Ave
Novosibirsk
630091 Russian Federation
Phone/fax: +7 (924) 874-81-34.
E-mail: alexandrova_tuyara@mail.ru

Образец цитирования:

Т.Н. Александрова, И.И. Мулина, А.С. Лямкина,
А.А. Студеникина, Н.А. Вараксин, Е.С. Михайлова,
Т.И. Поспелова, А.И. Аутеншлюс «Цитокиновый
профиль больных хроническим миелолейкозом»
// Медицинская иммунология, 2024. Т. 26, № 2.
С. 329-336. doi: 10.15789/1563-0625-CPI-2851

© Александрова Т.Н. и соавт., 2024

Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

T.N. Aleksandrova, I.I. Mulina, A.S. Lyamkina,
A.A. Studenikina, N.A. Varaksin, E.S. Mikhaylova,
T.I. Pospelova, A.I. Autenshlyus "Cytokine profile in patients
with chronic myeloid leukemia", *Medical Immunology
(Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2024, Vol. 26, no. 2,
pp. 329-336. doi: 10.15789/1563-0625-CPI-2851

© Aleksandrova T.N. et al., 2024

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

DOI: 10.15789/1563-0625-CPI-2851

между уровнем экспрессии химерного гена *BCR/ABL* – маркера ХМЛ и концентрацией ИЛ-1 β и ИЛ-17. Результаты ROC-анализа показали высокое качество моделей, характеризующее достижение большого молекулярного ответа (БМО) при низких концентрациях в сыворотке крови ИЛ-1 β , ИЛ-6, ИЛ-17 и VEGF.

Таким образом, результаты исследования показали, что определение концентрации ИЛ-1 β , ИЛ-6, ИЛ-17 и VEGF может являться прогностическим маркером для оценки эффективности терапии и вероятности достижения БМО у больных ХМЛ.

Ключевые слова: хронический миелолейкоз, цитокины, сыворотка крови, ингибиторы тирозинкиназ, большой молекулярный ответ, резистентность

CYTOKINE PROFILE IN PATIENTS WITH CHRONIC MYELOID LEUKEMIA

Aleksandrova T.N.^a, Mulina I.I.^b, Lyamkina A.S.^a, Studenikina A.A.^{a, c},
Varaksin N.A.^d, Mikhaylova E.S.^{a, c}, Pospelova T.I.^a, Autenshlyus A.I.^{a, c}

^a Novosibirsk State Medical University, Novosibirsk, Russian Federation

^b Republican Hospital No. 1 – National Centre of Medicine, Yakutsk, Russian Federation

^c Institute of Molecular Biology and Biophysics, Federal Research Center of Fundamental and Translational Medicine, Novosibirsk, Russian Federation

^d JSC Vector-Best, Novosibirsk, Russian Federation

Abstract. Resistance to tyrosine kinase inhibitors (TKIs) is currently an important clinical problem in the management of patients with chronic myeloid leukemia (CML). Recent studies suggested that aberrant cytokine secretion may be among the BCR/ABL-independent mechanisms of resistance, thus contributing to the persistence of leukemic stem cells in spite of continuous targeted therapy. The aim of the study was to evaluate concentration of cytokines in the serum of patients with CML depending on the efficiency of therapy.

Quantitative determination of the cytokines (TNF α , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17, IL-18, IFN α and VEGF) in blood serum of patients with chronic-phase CML (n = 84) and healthy subjects (n = 30) was performed using enzyme immunoassay (ELISA). The patients with CML were divided into 3 groups depending on the duration of therapy: group I, newly diagnosed patients (n = 10); group II, patients receiving therapy for < 12 months (n = 10); group III included patients receiving therapy for more than 12 months (n = 64).

The results of our study showed that cytokine concentration among CML patients significantly differed, depending on the duration of therapy. Significantly higher concentration of IL-17, IL-6, IL-1 β , IL-10, IL-18, IL-2 and TNF α was found in group I compared with control group. Group II patients also demonstrated significantly higher concentrations of TNF α , IL-6, IL-10, IL-18 and IFN α by comparison with control group, as well as higher concentration of IFN α compared with in groups I and III. In group III, concentrations of IL-17, IL-1 β , TNF α , IL-6, IL-10, IL-18 were significantly higher than in control group. When compared with group I, it was found that concentrations of IL-1 β , IL-2 and IL-18 were significantly lower. A direct correlation was found between expression levels of chimeric *BCR/ABL* gene, (a marker of CML malignancy), and concentrations of IL-1 β and IL-17. ROC-analysis demonstrated high-quality models which showed an association between achievement of major molecular response (MMR) and low serum concentrations of IL-1 β , IL-6 and IL-17.

Hence, the results of our study have shown that determination of IL-1 β , IL-6 and IL-17 concentrations may be a prognostic marker for assessing the efficiency of therapy and probability of achieving MMR in CML.

Keywords: chronic myeloid leukemia, cytokines, blood serum, tyrosine kinase inhibitors, major molecular response, resistance

Введение

При хроническом миелолейкозе (ХМЛ) в настоящее время стандартом терапии являются ингибиторы тирозинкиназ (ИТК), внедрение которых в клиническую практику кардинально изменило прогноз заболевания. Однако нако-

пленный опыт продемонстрировал, что у 20-30% больных наблюдается развитие первичной или вторичной резистентности к ИТК, что является важной клинической проблемой [7].

В основе развития резистентности к таргетному воздействию лежат различные биологиче-

ские механизмы, которые традиционно делят на *BCR/ABL*-зависимые и независимые. Предполагается, что нарушение взаимодействия между популяцией опухолевых клеток и их микроокружением, опосредованное цитокиновым дисбалансом, может являться одним из факторов развития резистентности к терапии. Так, цитокины способствуют ускользанию злокачественного клона от таргетного воздействия и позволяют лейкоэмическим стволовым клеткам (ЛСК) персистировать даже на фоне непрерывной многолетней терапии ИТК, что ведет к развитию резистентности и рецидива заболевания [17, 20]. Кроме того, результаты исследований свидетельствуют о том, что aberrантная секреция цитокинов сопряжена с клиническим фенотипом миелолипролиферативных неоплазий, а также оказывает влияние на исход заболевания [4, 11]. Таким образом, изучение особенностей экспрессии цитокинов при ХМЛ является перспективным направлением в улучшении понимания молекулярных механизмов резистентности к ИТК.

Цель работы – изучение концентрации цитокинов в сыворотке крови у больных ХМЛ в зависимости от эффективности лечения.

Материалы и методы

В исследование включено 84 больных ХМЛ в хронической фазе заболевания, наблюдающихся в ГАУ Республика Саха (Якутия) «Республиканской больнице № 1 – Национальный центр медицины», г. Якутск и ГБУЗ НСО «Городская клиническая больница № 2, г. Новосибирск». Средний возраст больных ХМЛ составил 54 ± 14 лет (95% ДИ 51-57), соотношение мужчин и женщин: 29 (34,5%) и 55 (65,5%). Всем больным в момент включения в исследование выполнялось клиническое обследование в соответствии с Российскими клиническими рекомендациями, 2020 [1]. Определение фазы заболевания и глубины ответа проводилось согласно критериям European Leukemia Net, 2020 [7].

Группу контроля составили 30 клинически здоровых доноров Новосибирского клинического центра крови. Средний возраст доноров составил 32 ± 7 лет; распределение по полу: 15 (50%) женщин и 15 (50%) мужчин.

Согласно рекомендациям European Leukemia Net, 2020 [7], в течение ХМЛ принято выделять три фазы, отражающие степень прогрессирования заболевания: хроническую, фазу акселерации и бластного криза. Поскольку в настоящее исследование включены больные с различным сроком терапии и уровнем противоопухолевого ответа, для идентификации особенностей цитокинового профиля условно было выделено три группы: впервые выявленные больные (10/11,9%)

(группа I), больные со сроком терапии менее 12 месяцев (10/11,9%) (группа II) и больные со сроком терапии более 12 месяцев (64/76,2%) (группа III). Медиана времени наблюдения составила 4 года (1-9).

На момент включения в исследование первично-сдерживающая терапия гидроксикарбамидом проводилась 10 (11,9%) впервые диагностированным больным, терапия ИТК 1-го поколения (иматиниб) – 48 (57,1%), ИТК 2-го поколения – 26 (31,0%) больным. Среди ИТК 2-го поколения во вторую и последующие линии в 11 (13,1%) случаях назначены nilотиниб, в 11 (13,1%) – дазатиниб и в 4 (4,8%) случаях – бозутиниб. Проводимая терапия позволила 50 (59,5%) больным достичь большого молекулярного ответа (БМО), из них 44 (52,4%) больным – глубокого молекулярного ответа (ГМО). Достижение БМО констатировали при уровне *BCR/ABL* $\leq 0,1\%$. ГМО расценивали как $MO^{4.0}$ при уровне *BCR/ABL* $\leq 0,01\%$, $MO^{4.5}$ при уровне *BCR/ABL* $\leq 0,032\%$, $MO^{5.0}$ при уровне *BCR/ABL* $\leq 0,001\%$ [1, 7].

Больным и лицам контрольной группы проведено количественное определение концентрации цитокинов TNF α , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17, IL-18, IFN α и VEGF-A в сыворотке крови с помощью иммуноферментного анализа (ИФА) и использованием набора реагентов «ИФА-БЕСТ» АО «Вектор-Бест» (Россия). Исследование проведено на базе Центральной научно-исследовательской лаборатории Новосибирского государственного медицинского университета Минздрава России.

Статистический анализ проводился с использованием программы StatTech v. 3.0.6 (разработчик ООО «Статтех», Россия). Количественные показатели оценивались на предмет соответствия нормальному распределению с помощью критерия Колмогорова–Смирнова. Поскольку распределение количественных показателей отличалось от нормального, сравнение двух групп по количественному показателю выполнялось с помощью U-критерия Манна–Уитни. Сравнение трех и более групп по количественному показателю выполнялось с помощью критерия Краскела–Уоллиса, апостериорные сравнения – с помощью критерия Данна с поправкой Холма. Корреляционный анализ между двумя количественными показателями проводился с помощью коэффициента ранговой корреляции Спирмена. Для оценки диагностической значимости количественных признаков при прогнозировании вероятности достижения БМО, применялся метод анализа ROC-кривых. Разделяющее значение количественного признака в точке cut-off определялось по наивысшему значению индекса Юдена.

Результаты

Результаты исследования показали, что у пациентов I группы (впервые диагностированные пациенты) концентрации IL-17, IL-6, IL-1 β , IL-10, IL-18, IL-2 и TNF α были статистически значимо выше по сравнению с контрольной (табл. 1). При сравнении пациентов II группы (с длительностью терапии менее 12 месяцев) с контрольной установлены статистически значимые различия концентраций следующих цитокинов – TNF α , IL-6, IL-10, IL-18 и IFN α . Кроме того, обращает на себя внимание достоверно более высокая

концентрация IFN α среди больных группы II по сравнению с больными групп I и III.

У III группы больных, получающих длительную терапию ИТК (более 12 месяцев), концентрации IL-17, IL-1 β , TNF α , IL-6, IL-10, IL-18 также были статистически значимо выше по сравнению контрольной группой. Однако при сравнении с больными I группы выявлено, что концентрации IL-1 β , IL-2 и IL-18 были статистически значимо ниже.

С целью выявления взаимосвязи между показателями цитокинового профиля больных ХМЛ и эффективностью терапии проведен корреляци-

ТАБЛИЦА 1. КОНЦЕНТРАЦИИ ЦИТОКИНОВ В РАЗЛИЧНЫХ ГРУППАХ БОЛЬНЫХ ХМЛ ПО СРАВНЕНИЮ С КОНТРОЛЕМ (пг/мл), Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

TABLE 1. CONCENTRATION OF CYTOKINES IN DIFFERENT GROUPS OF PATIENTS WITH CML AND CONTROL GROUP (pg/mL), Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

Цитокин Cytokine	Контрольная группа Control group	I группа Group I	II группа Group II	III группа Group III	p
TNF α	1,00 (0,43-1,35)	1,80 (1,73-2,05)	2,10 (1,60-3,25)	2,05 (1,20-4,62)	< 0,001* p _{контроль-I} = 0,019** p _{контроль-II} = 0,007** p _{контроль-III} < 0,001**
IL-2	0,78 (0,78-2,00)	2,00 (2,00-2,00)	0,78 (0,78-0,78)	0,78 (0,78-0,78)	0,001* p _{III-I} = 0,003** p _{контроль-I} = 0,040**
IL-1 β	0,88 (0,88-2,19)	6,90 (5,83-8,00)	1,82 (0,88-5,25)	1,35 (0,88-3,00)	< 0,001* p _{III-I} = 0,002** p _{контроль-I} = 0,001**
IL-6	0,75 (0,60-1,00)	9,70 (5,55-16,30)	4,15 (2,65-15,18)	3,10 (2,00-5,12)	< 0,001* p _{контроль-I} < 0,001** p _{контроль-II} < 0,001** p _{контроль-III} < 0,001**
IL-18	149,80 (96,80-98,90)	526,00 (479,78-611,32)	294,25 (265,45-345,38)	289,80 (184,90-379,40)	< 0,001* p _{III-I} = 0,016** p _{контроль-I} < 0,001** p _{контроль-II} = 0,001** p _{контроль-III} < 0,001**
IL-10	0,95 (0,95-1,58)	6,00 (5,20-9,53)	4,70 (2,95-6,33)	3,65 (1,90-6,10)	< 0,001* p _{контроль-I} < 0,001** p _{контроль-II} < 0,001** p _{контроль-III} < 0,001**
IFN α	5,00 (4,00-5,60)	5,00 (5,00-5,45)	7,10 (5,00-8,60)	5,60 (4,00-11,00)	0,044*
IL-17	0,10 (0,10-0,78)	7,60 (6,30-10,80)	1,10 (0,50-4,90)	2,30 (0,60-5,00)	< 0,001* p _{контроль-I} < 0,001** p _{контроль-III} < 0,001**

Примечание. I группа – впервые диагностированные больные, II группа – больные с длительностью терапии менее 12 месяцев, III группа – больные с длительностью терапии более 12 месяцев; * – критерий Краскела–Уоллиса (различия показателей статистически значимы, p < 0,05); ** – апостериорные сравнения (критерий Данна с поправкой Холма) (различия показателей статистически значимы, p < 0,05).

Note. Group I, newly diagnosed patients; group II, patients receiving therapy for less than 12 months; group III, patients receiving therapy for more than 12 months; *, Kruskal–Wallis criteria (differences are statistically significant, p < 0.05); **, Dunn's multiple comparison (differences are statistically significant, p < 0.05).

ТАБЛИЦА 2. КОНЦЕНТРАЦИЯ ЦИТОКИНОВ СРЕДИ БОЛЬНЫХ ХМЛ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ МОЛЕКУЛЯРНОГО ОТВЕТА (пг/мл), Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)

TABLE 2. CONCENTRATION OF CYTOKINES DEPENDING ON MOLECULAR RESPONSE (pg/mL), Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)

Цитокин Cytokine	Больные без БМО Patients without MMR	Больные с БМО Patients with MMR	р
IL-1 β	5,45 (2,75-7,80)	0,88 (0,88-2,10)	< 0,001
IL-6	5,30 (4,05-17,68)	2,80 (1,75-4,28)	< 0,001
IL-17	5,70 (3,48-7,50)	0,70 (0,30-2,00)	< 0,001
VEGF	295,25 (201,35-449,57)	81,80 (45,20-265,40)	0,002

Примечание. Значения концентраций цитокинов указаны только при $p < 0,05$.

Note. The concentration values of cytokines are indicated only at $p < 0.05$.

ТАБЛИЦА 3. ПОРОГОВЫЕ ЗНАЧЕНИЯ КОНЦЕНТРАЦИИ ЦИТОКИНОВ IL-17, IL-1 β , IL-6, VEGF-A И ИХ ДИАГНОСТИЧЕСКАЯ ЦЕННОСТЬ. РЕЗУЛЬТАТЫ РОС-АНАЛИЗА

TABLE 3. CUT-OFF VALUE OF CONCENTRATIONS OF CYTOKINES IL-17, IL-1 β , IL-6, VEGF-A AND THEIR DIAGNOSTICS SIGNIFICANCE. RESULTS OF ROC-ANALYSIS

Цитокин Cytokine	Площадь под ROC-кривой Area under curve	р	Точка cut-off "Cut-off" value	Чувствительность, % Sensitivity, %	Специфичность, % Specificity, %
IL-1 β	0,870	< 0,001	2,5	86,0	80,6
IL-6	0,757	< 0,001	4,2	72,0	75
IL-17	0,916	< 0,001	2,6	94,1	76,7
VEGF-A	0,758	0,002	140,0	62,2	88,9

Примечание. Значения площади под кривой 0,9-1 – отличное качество модели; 0,8-0,9 – очень хорошее качество модели; 0,7-0,8 – хорошее качество модели; 0,6-0,7 – среднее качество модели; 0,5-0,6 – неудовлетворительное качество модели.

Note. Values area under curve 0.9-1, perfect model; 0.8-0.9, very good model; 0.7-0.8, good model; 0.6-0.7, adequate model; 0.5-0.6, unsatisfactory model.

онный анализ между уровнем экспрессии химерного гена *BCR/ABL* и концентрацией цитокинов. Выявлено, что уровень экспрессии *BCR/ABL* прямо коррелирует с концентрацией IL-17 ($r = 0,748$, $p < 0,001$) и IL-1 β ($r = 0,559$, $p < 0,001$). Был проведен сравнительный анализ концентрации цитокинов между больными ХМЛ, достигшими БМО ($n = 50$) и больными без БМО ($n = 34$). Так, у больных, не достигших БМО, концентрации IL-1 β , IL-6, IL-17 и VEGF-A были статистически значимо выше по сравнению с больными, достигшими БМО (табл. 2).

По результатам ROC-анализа выявлены пороговые значения концентрации цитокинов, позволяющие прогнозировать достижение БМО (табл. 3). Так, пороговое значение концентрации IL-1 β в точке cut-off, которому соответствовало наивысшее значение индекса Юдена, составило 2,5 пг/мл (чувствительность и специфичность модели – 86% и 80,6%, соответствен-

но), IL-6 – 4,2 пг/мл (чувствительность – 72%, специфичность – 76%), IL-17 – 2,6 пг/мл (чувствительность 94,1%, специфичность – 76,7%), а VEGF-A – 140 пг/мл (чувствительность – 62,2%, специфичность – 88,9%). Достижение БМО можно прогнозировать при концентрациях ниже указанных величин. На основании полученных значений площади под ROC-кривой можно сделать вывод о том, что прогностическая модель для IL-17 обладает отличным качеством, для IL-1 β очень хорошим, а для IL-6 и VEGF – хорошим. Все модели являлись статистически значимыми ($p < 0,001$).

Обсуждение

Таким образом, исследование показало, что для больных ХМЛ характерно повышение секреции как провоспалительных, так и противовоспалительных цитокинов, что подтверждается ли-

тературными данными, свидетельствующими об aberrантной секреции цитокинов при миелопродиферативных неоплазиях, в том числе ХМЛ [15, 17, 20].

В дебюте заболевания отмечалась наиболее интенсивная продукция IL-17, IL-6, IL-1 β , IL-18, IL-2, TNF α и IL-10, что связано с высвобождением большого количества биологически активных молекул, в том числе цитокинов, в ответ на опухолевую трансформацию. Было доказано, что лейкоэмические стволовые клетки способны продуцировать IL-1, IL-6, TNF α , G-CSF, которые способствуют поддержанию собственного пролиферативного потенциала на начальном этапе лейкогенеза [10, 17, 19]. Также известно, что гиперпродукция TNF α активирует сигнальный путь NF- κ B, стимулирующий каскадную реакцию синтеза других провоспалительных цитокинов, и создает условия для преимущественной пролиферации злокачественного клона [6, 15, 19]. Повышение концентрации противовоспалительного цитокина IL-10 у больных ХМЛ свидетельствует о его проонкогенных свойствах, которые способствуют ускользанию опухолевых клеток от иммунного надзора и прогрессированию злокачественного процесса [16].

Необходимо отметить, что в дебюте ХМЛ в наибольшей степени повышена секреция IL-17. Принимая во внимание способность цитокина мобилизовать миелоидные клетки-предшественники и нейтрофилы, можно предположить, что IL-17 способствует пролиферации и экспансии опухолевого клона [21].

Известно, что на фоне ИТК наблюдается редукция пула опухолевых клеток. Это позволяет к 3 и 6 месяцам терапии достичь снижения экспрессии BCR/ABL \leq 10% у 60-80% больных. К 12 месяцам терапии от 20% до 59% больных способны достичь БМО, при котором показатели выживаемости близятся к 100% [7]. Однако, несмотря на уменьшение опухолевой нагрузки, сохраняется достоверно более высокая концентрация некоторых цитокинов. Данный феномен, вероятно, обусловлен перепрограммированием клеток кроветворной ниши в опухолевое микроокружение, которое способствует выживаемости злокачественных клеток даже на фоне непрерывной таргетной терапии [5, 9, 17].

Отличительной чертой цитокинового профиля больных II группы являлась статистически значимо высокая концентрация IFN α по сравнению с больными в дебюте заболевания и получающими терапию ИТК более 12 месяцев. Известно, что интерфероны в канцерогенезе проявляют антипролиферативную активность, а IFN α до эры тирозинкиназ являлся золотым стандартом терапии ХМЛ, впервые позволившим достичь

полного цитогенетического ответа [2, 7]. Можно предположить, что усиление секреции IFN α в первые месяцы терапии обусловлено адаптивными механизмами иммунной системы, которые способствуют элиминации опухолевых клеток [2]. Кроме того, обращают на себя внимание достоверно более низкие концентрации IL-1 β , IL-2 и IL-18 в III группе больных по сравнению с впервые выявленными больными, что свидетельствует об уменьшении секреции провоспалительных цитокинов при длительной терапии ИТК.

Результаты нашего исследования показали неблагоприятную прогностическую роль IL-1 β , IL-6, IL-17 и VEGF-A, подтвержденную данными ROC-анализа. На экспериментальных моделях было показано, что IL-6 способствует дифференцировке мультипотентных клеток-предшественников по миелоидной линии, блокируя их про-V-потенциал, а ингибирование сигнального пути цитокина замедляет прогрессирование ХМЛ [14]. Работы других исследовательских групп также свидетельствуют о том, что высокий уровень IL-6 ассоциируется с неблагоприятным прогнозом, коррелирующим с риском недостижения раннего и глубокого молекулярного ответа, а также трансформации в бластный криз [13, 18], а IL-1-опосредованные сигналы к клеткам опухолевого микроокружения способствуют развитию резистентности к ИТК [3].

В противоположность IL-1 и IL-6, роль IL-17 при ХМЛ менее изучена. Моделирование прогностической способности цитокинов показывает, что IL-17 обладает наибольшей чувствительностью (94,1%), хотя специфичность была относительно низкой (74,1%), что обусловлено широким спектром его биологических эффектов. Имеются данные о том, что при солидных опухолях IL-17 принимает участие в процессах ангиогенеза опухолей и фиброзировании окружающих их тканей [12, 21]. На основании этого предположено, что IL-17 активирует деятельность фибробластов и таким образом ремоделирует архитектуру опухолевого микроокружения, что способствует прогрессированию опухоли и развитию резистентности к лечению [21].

Для больных, не достигших БМО, также был характерен статистически значимо более высокий уровень VEGF-A по сравнению с больными с БМО, что, вероятно, косвенно свидетельствует о большей степени васкуляризации костного мозга и диссеминации опухолевых клеток в экстрамедуллярные очаги. Результаты работ других исследовательских групп подтверждают, что BCR/ABL способствует повышению экспрессии гена VEGF, а достижение БМО приводит к нормализации плотности микроваскулярной сети [8].

Заключение

Достижение стойкого молекулярного ответа является краеугольным камнем лечения больных ХМЛ. Результаты настоящего исследования продемонстрировали, что концентрация цитокинов в сыворотке больных ХМЛ зависит от продолжительности терапии и уровня молекулярного ответа, что, вероятно свидетельствует об их роли в патогенезе заболевания. Выявлено, что повы-

шение концентрации IL-1 β , IL-6, IL-17 и VEGF ассоциировано с неблагоприятным прогнозом, коррелирующим с риском недостижения БМО. Таким образом, изучение особенностей цитокинового профиля больных ХМЛ может являться перспективным направлением в поиске прогностических маркеров для раннего выявления лиц с неудачей терапии и подбора оптимальной тактики терапии.

Список литературы / References

1. Клинические рекомендации. Хронический миелолейкоз, 2020. [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://cr.minzdrav.gov.ru/recomend/142>. [Clinical guidelines. Chronic myeloid leukemia [Electronic resource]. Access mode: <https://cr.minzdrav.gov.ru/recomend/142>.
2. Соснина А.В., Великая Н.В., Вараксин Н.А., Гришаев М.П., Аутеншлюс А.И. Роль цитокинов в патогенезе злокачественных новообразований. Новосибирск, 2014. 128 с. [Sosnina A.V., Velikaya N.V., Varaksin N.A., Grishaev M.P., Autenshlus A.I. The role of cytokines in the pathogenesis of malignant tumors]. Novosibirsk, 2014. 128 p.
3. Ågerstam H., Hansen N., von Palffy S., Sandén C., Reckzeh K., Karlsson C., Lilljebjörn H., Landberg N., Askmyr M., Högborg C., Rissler M., Porkka K., Wadenvik H., Mustjoki S., Richter J., Järås M., Fioretos T. IL1RAP antibodies block IL-1-induced expansion of candidate CML stem cells and mediate cell killing in xenograft models. *Blood*, 2016, Vol. 128, no. 23, pp. 2683-2693.
4. Fisher D.A.C., Fowles J.S., Zhou A., Oh S.T. Inflammatory pathophysiology as a contributor to myeloproliferative neoplasms. *Front. Immunol.*, 2021, Vol. 12, 683401. doi: 10.3389/fimmu.2021.683401.
5. Greten F.R., Grivennikov S.I. Inflammation and cancer: triggers, mechanisms and consequences. *Immunity*, 2019, Vol. 51, no. 1, pp. 27-41.
6. Herrmann O., Kuepper M.K., Bütow M., Costa I.G., Appelmann I., Beier F., Luedde T., Braunschweig T., Koschmieder S., Brümmendorf T.H., Schemionek M. Infliximab therapy together with tyrosine kinase inhibition targets leukemic stem cells in chronic myeloid leukemia. *BMC Cancer*, 2019, Vol. 19, no. 1, 658. doi: 10.1186/s12885-019-5871-2.
7. Hochhaus A., Baccarani M., Silver R.T., Schiffer C., Apperley J.F., Cervantes F., Clark R.E., Cortes J.E., Deininger M.W., Guilhot F., Hjorth-Hansen H., Hughes T.P., Janssen J.J.W.M., Kantarjian H.M., Kim D.W., Larson R.A., Lipton J.H., Mahon F.X., Mayer J., Nicolini F., Niederwieser D., Pane F., Radich J.P., Rea D., Richter J., Rosti G., Rousselot P., Saglio G., Sauße S., Soverini S., Steegmann J.L., Turkina A., Zaritskey A., Hehlmann R. European LeukemiaNet 2020 recommendations for treating chronic myeloid leukemia. *Leukemia*, 2020, Vol. 34, pp. 966-984.
8. Kvasnicka H.M., Thiele J., Staib P., Schmitt-Graeff A., Griesshammer M., Klose J., Engels K., Krieneret S. Reversal of bone marrow angiogenesis in chronic myeloid leukemia following imatinib mesylate (STI571) therapy. *Blood*, 2004, Vol. 103, pp. 3549-3551.
9. Lan T., Chen L., Wei X. Inflammatory cytokines in cancer: comprehensive understanding and clinical progress in gene therapy. *Cells*, 2021, Vol. 10, no. 1, 100. doi: 10.3390/cells10010100.
10. Luciano M., Krenn P.W., Horejs-Hoeck J. The cytokine network in acute myeloid leukemia. *Front. Immunol.*, 2022, Vol. 13, 1000996. doi: 10.3390/cells10010100.
11. Masselli E., Pozzi G., Gobbi G., Merighi S., Gessi S., Vitale M., Carubbi C. Cytokine profiling in myeloproliferative neoplasms: overview on phenotype correlation, outcome prediction, and role of genetic variants. *Cells*, 2020, Vol. 9, no. 9, 2136. doi: 10.3390/cells9092136.
12. Mikkola T., Almahmoudi R., Salo T., Al-Samadi A. Variable roles of interleukin-17F in different cancers. *BMC Cancer*, 2022, Vol. 22, no. 1, 54. doi: 10.1186/s12885-021-08969-0.
13. Nievergall E., Reynolds J., Kok C.H., Watkins D.B., Biondo M., Busfield S.J., Vairo G., Fuller K., Erber W.N., Sadras T., Grose R., Yeung D.T., Lopez A.F., Hiwase D.K., Hughes T.P., White D.L. TGF- α and IL-6 plasma levels selectively identify CML patients who fail to achieve an early molecular response or progress in the first year of therapy. *Leukemia*, 2016, Vol. 30, no. 6, pp. 1263-1272.
14. Reynaud D., Pietras E., Barry-Holson K., Mir A., Binnewies M., Jeanne M., Sala-Torra O., Radich J.P., Passegué E. IL-6 controls leukemic multipotent progenitor cell fate and contributes to chronic myelogenous leukemia development. *Cancer Cell*, 2011, Vol. 20, no. 5, pp. 661-673.
15. Riether C., Schürch C.M., Ochsenbein A.F. Regulation of hematopoietic and leukemic stem cells by the immune system. *Cell Death Differ.*, 2015, Vol. 22, no. 2, pp. 187-198.
16. Saraiva M., Vieira P., O'Garra A. Biology and therapeutic potential of interleukin-10. *J. Exp. Med.*, 2020, Vol. 217, no. 1, e20190418. doi: 10.1084/jem.20190418.
17. Shah M., Bhatia R. Preservation of quiescent chronic myelogenous leukemia stem cells by the bone marrow microenvironment. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 2018, Vol. 1100, pp. 97-110.

18. Sharma K., Singh U., Rai M., Shukla J., Gupta V., Narayan G., Kumar S. Interleukin 6 and disease transformation in chronic myeloid leukemia: A Northeast Indian population study. *J. Cancer Res. Ther.*, 2020, Vol. 16, no. 1, pp. 30-33.
19. Shen N., Liu S., Cui J., Li Q., You Y., Zhong Z., Cheng F., Guo A.Y., Zou P., Yuan G., Zhu X. Tumor necrosis factor α knockout impaired tumorigenesis in chronic myeloid leukemia cells partly by metabolism modification and miRNA regulation. *Onco Targets Ther.*, 2019, Vol. 29, no. 12, p. 2355-2364.
20. Zhang B., Ho Y.W., Huang Q., Maeda T., Lin A., Lee S.U., Hair A., Holyoake T.L., Huettner C., Bhatia R. Altered microenvironmental regulation of leukemic and normal stem cells in chronic myelogenous leukemia. *Cancer Cell*, 2012, Vol. 21, no. 4, pp. 577-592.
21. Zhao J., Chen X., Herjan T., Li X. The role of interleukin-17 in tumor development and progression. *J. Exp. Med.*, 2020, Vol. 217, no. 1, e20190297. doi: 10.1084/jem.20190297.

Авторы:

Александрова Т.Н. — аспирант кафедры терапии, гематологии и трансфузиологии ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Новосибирск, Россия

Мулина И.И. — заведующая отделением гематологии ГАУ РС(Я) «Республиканская больница № 1 – Национальный центр медицины», г. Якутск, Россия

Лямкина А.С. — к.м.н., доцент кафедры терапии, гематологии и трансфузиологии ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Новосибирск, Россия

Студеникина А.А. — к.м.н., научный сотрудник центральной научно-исследовательской лаборатории ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ; научный сотрудник, Научно-исследовательский институт молекулярной биологии и биофизики ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины», г. Новосибирск, Россия

Вараксин Н.А. — заведующий лабораторией, АО «Вектор-Бест», г. Новосибирск, Россия

Михайлова Е.С. — научный сотрудник центральной научно-исследовательской лаборатории ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ; старший научный сотрудник, Научно-исследовательский институт молекулярной биологии и биофизики ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины», г. Новосибирск, Россия

Поспелова Т.И. — д.м.н., профессор, заведующая кафедрой терапии, гематологии и трансфузиологии ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Новосибирск, Россия

Аутеншлюс А.И. — д.б.н., профессор, заведующий центральной научно-исследовательской лабораторией ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ; главный научный сотрудник, Научно-исследовательский институт молекулярной биологии и биофизики ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины», г. Новосибирск, Россия

Authors:

Aleksandrova T.N., Postgraduate Student, Department of Therapy, Hematology and Transfusiology, Novosibirsk State Medical University, Novosibirsk, Russian Federation

Mulina I.I., Head, Department of Hematology, Republican Hospital No. 1 – National Centre of Medicine, Yakutsk, Russian Federation

Lyamkina A.S., PhD (Medicine), Associate Professor, Department of Therapy, Hematology and Transfusiology, Novosibirsk State Medical University, Novosibirsk, Russian Federation

Studenikina A.A., PhD (Medicine), Research Associate, Central Research Laboratory, Novosibirsk State Medical University; Research Associate, Institute of Molecular Biology and Biophysics, Federal Research Center of Fundamental and Translational Medicine, Novosibirsk, Russian Federation

Varaksin N.A., Head of Laboratory, JSC Vector-Best, Novosibirsk, Russian Federation

Mikhaylova E.S., Research Associate, Central Research Laboratory at the Novosibirsk State Medical University; Senior Research Associate, Institute of Molecular Biology and Biophysics, Federal Research Center of Fundamental and Translational Medicine, Novosibirsk, Russian Federation

Pospelova T.I., PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Department of Therapy, Hematology and Transfusiology, Novosibirsk State Medical University, Novosibirsk, Russian Federation

Autenshlyus A.I., PhD, MD (Biology), Professor, Head, Central Research Laboratory; Main Research Associate, Institute of Molecular Biology and Biophysics, Federal Research Center of Fundamental and Translational Medicine, Novosibirsk, Russian Federation

НЕЛИНЕЙНЫЕ ГЛАВНЫЕ КОМПОНЕНТЫ ЦИТОКИНОВОГО ПРОФИЛЯ У ДЕТЕЙ С ВНЕБОЛЬНИЧНОЙ ПНЕВМОНИЕЙ

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

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

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

Резюме. Цитокины являются важнейшими медиаторами, которые контролируют и регулируют иммунные и воспалительные реакции через сложные сети и служат биомаркерами многих заболеваний. Количественное определение цитокинов помогает в определении иммунного статуса пациента и корректировке терапии при различных воспалительных заболеваниях, таких как сепсис, пневмония. Поскольку внебольничная пневмония остается распространенной причиной детской заболеваемости и смертности, прогноз тяжести заболевания у детей является актуальной проблемой на современном этапе. Целью исследования было выявление ассоциаций между цитокинами у здоровых детей и у детей с внебольничной пневмонией (ВП) в зависимости от возраста пациентов и тяжести патологического процесса. Работа проведена на кафедре микробиологии, вирусологии и иммунологии, кафедре пропедевтики детских болезней и педиатрии и в НИИ иммунологии ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации. В исследование вошли 117 детей в возрасте от 1 года до 18 лет с рентгенологически подтвержденным диагнозом внебольничной пневмонии тяжелой и нетяжелой. Группа сравнения сформирована из 28 здоровых детей, не имеющих на момент обследования внебольничной пневмонии, а также других признаков острой респираторной вирусной инфекции и не состоящих на диспансерном наблюдении по поводу какой-либо хронической патологии. Были определены уровни IL-1 β , IFN γ , IL-6, IL-4, IL-10, IL-2, TNF α , IFN λ 2 (IL-28A), IFN λ 3 (IL-28B), IL-8, MCP-1, IL-17AF, GM-CSF в сыворотке крови с помощью тест-систем, основанных на «сэндвич»-методе твердофазного ИФА с применением пероксидазы в качестве индикаторного фермента. Для статистического анализа использовали многомерный метод – нелинейный анализ главных компонент по алгоритму CATPCA. Проведенное исследование позволило обнаружить согласованное увеличение в сыворотке крови у детей с ВП IL-1 β , IL-4, IL-10, IL-2, TNF α , IFN λ 2 (IL-28A), IFN λ 3 (IL-28B), IL-8, MCP-1, IL-17AF, GM-CSF, причем наибольшую корреляцию с тяжестью показали IFN λ 2 (IL-28A), IFN λ 3 (IL-28B) и MCP-1, которые могут рассматриваться дополнительными биомаркерами тяжести внебольничной пневмонии. Также была обнаружена существенная вариабельность цитокинового профиля у здоровых детей и ее существенное сужение при пневмониях, особенно тяжелой.

Ключевые слова: внебольничная пневмония, дети, цитокиновый профиль, тяжелая внебольничная пневмония, метод CATPCA, биомаркеры пневмонии

Адрес для переписки:

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

Address for correspondence:

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

Образец цитирования:

Н.В. Изюрова, Д.Ю. Нохрин, А.Ю. Савочкина, А.Н. Узунова «Нелинейные главные компоненты цитокинового профиля у детей с внебольничной пневмонией» // Медицинская иммунология, 2024. Т. 26, № 2. С. 337-344. doi: 10.15789/1563-0625-NMC-2673

© Изюрова Н.В. и соавт., 2024

Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

N.V. Izjiurova, D.Yu. Nokhrin, A.Yu. Savochkina, A.N. Uzunova "Nonlinear main components of the cytokine profile in children with community-acquired pneumonia", *Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2024, Vol. 26, no. 2, pp. 337-344.

doi: 10.15789/1563-0625-NMC-2673

© Izjiurova N.V. et al., 2024

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

DOI: 10.15789/1563-0625-NMC-2673

NONLINEAR MAIN COMPONENTS OF THE CYTOKINE PROFILE IN CHILDREN WITH COMMUNITY-ACQUIRED PNEUMONIA

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

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

^b Chelyabinsk State University, Chelyabinsk, Russian Federation

Abstract. Cytokines are the key mediators which control and regulate immune and inflammatory responses *via* complex networks and serve as biomarkers of many diseases. Quantitative determination of cytokines is helpful in assessing immune status and adjusting therapy for various inflammatory diseases, such as sepsis and pneumonia. Since community-acquired pneumonia remains a common cause of childhood morbidity and mortality. At the present stage, prognosis of the disease severity in children is an urgent problem. The aim of our study was to identify associations between cytokine levels in healthy children and in children with community-acquired pneumonia (CAP), depending on the age of patients and severity of the pathological process. The work was carried out at the Department of Microbiology, Virology and Immunology, Department of Propaedeutics of Childhood Diseases and Pediatrics, and at the Research Institute of Immunology at the South Ural State Medical University. The study included 117 children aged 1 to 18 years with radiologically confirmed diagnosis of CAP, either severe or mild degree. The comparison group was composed from 28 healthy children who did not have community-acquired pneumonia, as well as other signs of acute respiratory viral infection at the time of examination, being observed for any chronic disorders. The levels of IL-1 β , IFN γ , IL-6, IL-4, IL-10, IL-2, TNF α , IFN λ 2 (IL-28A), IFN λ 3 (IL-28B), IL-8, MCP-1, IL-17AF, GM-CSF were determined in blood serum by means of ELISA test systems (a “sandwich” technique with peroxidase as an indicator enzyme). For statistical analysis, a multidimensional method was used, i.e., non-linear analysis of the principal components using the CATPCA algorithm. Among the children with CAP, our study revealed a consistent increase of IL-1, IL-4, IL-10, IL-2, TNF α , IFN λ 2 (IL-28A), IFN λ 3 (IL-28B), IL-8, MCP-1, IL-17AF, GM-CSF in blood serum. The highest correlation with severity was shown for IFN λ 2 (IL-28A), IFN λ 3 (IL-28B) and MCP-1, which may be considered additional biomarkers of the CAP severity. There was also a significant variability of the cytokine profile in healthy children and its significant skewing in pneumonia, especially in severe cases.

Keywords: community-acquired pneumonia, children, cytokine profile, severe community-acquired pneumonia, CATPCA method, biomarkers of pneumonia

Введение

Растущие знания о реакции цитокиновой сети привели к лучшему пониманию механизмов при различных патологических состояниях и разработке новых методов лечения с использованием биологических препаратов, способных блокировать специфические молекулы иммунного ответа. Поскольку иммунная система и ее реакция меняют свои свойства в связи с развитием и в зависимости от периода детства, следует учитывать различия в возрасте пациентов как с физиологической точки зрения, так и при различных заболеваниях [11, 20].

Воспалительная реакция при различных патологических состояниях обусловлена сложной сетью медиаторов и сигнальных путей. Среди медиаторов воспаления важную роль играют цитокины, регулирующие воспалительную реакцию, включая интерлейкины, которые отвечают за связь между лейкоцитами, хемокины, которые способствуют хемотаксису, и интерфероны, которые оказывают противовирусное действие. Более того, эти молекулы участвуют в становлении

как врожденного, так и адаптивного иммунитета, играя значительную физиологическую роль в онтогенезе лимфоидной ткани, органогенезе, васкулогенезе и восстановлении тканей. Когда экспрессия этих молекул длительно изменяется, может возникать различная патология [11, 20]. Следует отметить, что возникновение патологии у детей и взрослых часто имеет схожие клинические проявления, но в отношении физиологических параметров существуют специфические для детей проблемы, которые необходимо учитывать в случае определенного заболевания, чтобы обеспечить раннюю диагностику и соответствующее медицинское лечение [1, 11].

Несмотря на успехи, достигнутые в диагностике и лечении органов дыхания, заболеваемость пневмонией у детей и подростков остается высокой, особенно в возрасте до 5 лет. Незрелая иммунная система предрасполагает выраженную восприимчивость к инфекциям у детей раннего возраста [3, 9, 12]. Иммунопатология внебольничной пневмонии (ВП) характеризуется воспалительной реакцией в нижних дыхательных

путях, которая регулируется цитокинами, первоначально высвобождаемыми в дыхательных путях, с последующим усилением иммунного ответа в кровотоке [26]. В последние годы в ряде исследований была выявлена значимость различных цитокинов в патогенезе ВП. В частности, определена роль IL-6, IL-1 β , IL-17, GM-CSF, IFN λ , MCP-1 как факторов, отражающих тяжесть пневмонии [9, 19, 23, 26]. В ранее проведенном нами исследовании по изучению врожденного иммунитета было выявлено значительное повышение уровня IL-6, IL17A/F, MCP-1, IFN λ 2 (IL-28A), IFN λ 3 (IL-28B), GM-CSF в сыворотке крови у детей с тяжелой формой внебольничной пневмонии. Кроме того, изменялся уровень IL-6, IFN λ 2 (IL-28A), IFN λ 3 (IL-28B), GM-CSF в зависимости от возраста пациентов [2].

Более глубокое понимание взаимосвязи иммунных реакций при внебольничной пневмонии может способствовать улучшению оценки тяжести заболевания, эффективности диагностики и, в конечном счете, благоприятному клиническому исходу у пациентов с ВП. Учитывая, что цитокины оказывают совместное действие, может быть недостаточно оценить только несколько из этих медиаторов для оценки тяжести воспаления [23].

Целью исследования было выявление ассоциаций между цитокинами у здоровых детей и у детей с ВП в зависимости от возраста пациентов и тяжести патологического процесса.

Материалы и методы

Работа проведена на кафедре микробиологии, вирусологии и иммунологии, кафедре пропедевтики детских болезней и педиатрии и в НИИ иммунологии ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации. В исследование вошли 117 детей в возрасте от 1 года до 18 лет с рентгенологически подтвержденным диагнозом внебольничной пневмонии тяжелой и нетяжелой, госпитализированные в отделения респираторных инфекций МБУЗ ДГКБ № 7 и МАУЗ ДГКБ № 8 в г. Челябинска. Для оценки тяжести пациентов с ВП использованы критерии степени тяжести у детей с внебольничной пневмонией, представленные в клинических рекомендациях 2022 года [3]. Группа сравнения сформирована из 28 здоровых детей, не имеющих на момент обследования внебольничной пневмонии, а также других признаков острой респираторной вирусной инфекции и не состоящих на диспансерном наблюдении по поводу какой-либо хронической патологии. Все дети были сопоставимы по полу и возрасту.

Для определения уровня IL-1 β , IFN γ , IL-6, IL-4, IL-2, IL-10, TNF α , IL-8, MCP-1 использо-

ваны тест-системы АО «Вектор-Бест» (г. Новосибирск), IL-17AF, GM-CSF применялась система ELISA Kit Bender MedSystems (GmbH Campus Vienna Biocenter 2, Wien, Австрия). Для определения уровня IFN λ 2 (IL-28A), IFN λ 3 (IL-28B) использована тест-система OmniKine™ ELISA Kit (Assay Biotechnology Company, Inc. Fremont, США). Исследование проводилось по методикам, приложенным к тест-системам. Эти тест-системы основаны на «сэндвич»-методе твердофазного ИФА с применением пероксидазы в качестве индикаторного фермента. Учет результатов проводили на ИФА анализаторе. Результаты выражались в пг/мл.

В ходе статистического анализа полученных данных использовали многомерный метод – нелинейный анализ главных компонент по алгоритму CATPCA [14]. Наряду с 13 иммунологическими показателями в него также были включены возраст, пол пациентов, а здоровые дети, дети с тяжелой и нетяжелой ВП были промаркированы соответствующей меткой (1–3), которая была включена в анализ в качестве дополнительной переменной: она отслеживалась в ходе ординации, однако не влияла на результаты. Пол и метки групповой принадлежности обрабатывались как номинальные категории (nominal), а все количественные показатели – как сглаженные сплайном порядковые переменные (spline ordinal) с последующим ранжированием в качестве способа дискретизации данных. Для минимизации потерь объясненной дисперсии количество внутренних узлов для сплайнов устанавливали в максимально возможное число, которое зависело от числа уникальных значений для переменной и определялось программой автоматически; в нашем случае оно варьировало от 26 для GM-CSF до 139 для возраста. При выборе числа главных компонент, необходимых и достаточных для редукции данных с обобщением, руководствовались критериями Кэттелла и Кайзера. Расчеты выполнены в пакете IBM® SPSS® Statistics (v. 23), графические построения – в пакетах PAST (version 4.11) [7].

Результаты

Нелинейный анализ главных компонент

Классический анализ главных компонент (Principal component analysis, PCA) основан на корреляции Пирсона и требует многомерного нормального распределения показателей, а также линейности их связей друг с другом. В то же время известно, что иммунологические показатели имеют обычно асимметричные распределения и распределены скорее логарифмически нормально [16, 22]. Также связи между биологическими показателями редко бывают линейными. Поэтому нами был использован нелинейный

вариант PCA, называемый также оптимальным шкалированием, который был проведен по алгоритму CATPCA – Categorical Principal Component Analysis [14]. Поскольку этот вариант анализа не является распространенным в медицине, опишем его подробнее.

Алгоритм CATPCA позволяет задействовать в анализе одновременно качественные (номинальные, порядковые) и количественные показатели и состоит из нескольких этапов. На первом этапе задаются способы обработки исходных данных, которые включают возможность их сглаживания сплайнами, а также выбор способа дискретизации: умножение, ранжирование или группировка. На втором этапе проводится многомерное преобразование данных по Джиффи, которое оцифровывает качественные номинальные и порядковые показатели, а также преобразует количественные показатели таким образом, чтобы связи между всеми показателями в наборе стали максимально взаимно линейными [6, 17]. В результате присутствующие в данных нелинейности связи, во-первых, не уходят в ошибку анализа, а во-вторых, появляется дополнительная возможность их изучения путем сопоставления исходных и оцифрованных значений. На третьем этапе на подготовленных таким образом данных проводится обычный PCA, результаты которого либо интерпретируют сразу, либо чаще используют только для выбора числа главных компонент, необходимых и достаточных для объяснения большей части дисперсии набора

признаков. В последнем случае проводится еще один – окончательный – анализ с сохранением настроек предыдущего, но с заданием выбранного числа главных компонент (как в эксплораторном факторном анализе). В ходе него часть дисперсии остаточных компонент переносится на несколько выбранных первых, что увеличивает долю объясненной дисперсии в анализируемом наборе данных. В результате сочетания описанных настроек метода возможно получение результатов, аналогичных классическому анализу главных компонент (используются исходные количественные данные с умножением в качестве способа дискретизации), анализу соответствий (используются исходные качественные данные с группировкой в качестве способа дискретизации), а также различных промежуточных вариантов. Используемые нами настройки метода, описанные в методическом разделе, позволяют отнести проведенный PCA к непараметрической основанной на рангах порядковой технике.

Как видно из рисунка 1, согласно критерию Кэттелла имело смысл выделять 1 или 4 главные компоненты (ГК), а согласно критерию Кайзера – 6. Однако 5 и 6 ГК имели собственные числа, близкие к 1, т. е. несли количество информации на уровне 1 признака, и, следовательно, обладали слабыми обобщающими свойствами. Поэтому на этапе 3 было выбрано решение из 4 ГК, объясняющих в сумме 49,3% общей дисперсии данных, которое на последнем этапе усилилось до 63,5%. Его основные результаты представлены в таблице 1 и на рисунке 2 (см. 3-ю стр. обложки).

Первая главная компонента объясняла 28,2% общей изменчивости (количественно – дисперсии) в наборе данных. В нее с высокими нагрузками вошли все цитокины за исключением IL-6 и IFN γ , а с максимальными – IL-28A, IL-28B и MCP-1. Также ГК 1 сильно положительно коррелировала с меткой тяжести ВП, а нагрузки для возраста и пола были близки к нулю.

На рисунке 2 представлена разновидность ординационной диаграммы – сдвоенный график (биplot), на котором в пространстве двух первых ГК одновременно приведены как векторы признаков, так и метки детей трех групп. Из него видно, что метки здоровых детей расположились преимущественно в левой отрицательной части графика вдоль оси ГК 1, а группы детей с ВП – в правой положительной, в которую направлены векторы всех кроме IL-6 и IFN γ цитокинов. Таким образом, ГК 1 следует интерпретировать как независимое от возраста и пола увеличение концентрации большинства цитокинов в сыворотке крови детей с ВП, особенно тяжелой.

Вторая ГК объясняла 16,1% общей дисперсии. С максимальными положительными нагрузками

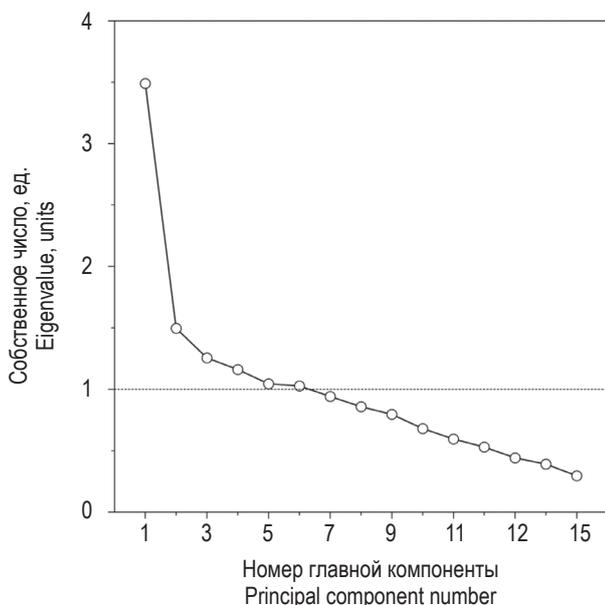


Рисунок 1. Выделение латентных переменных на графике «каменистой осыпи» Кэттелла

Примечание. Пунктир – критерий Кайзера.

Figure 1. Finding of latent variables on Cattell's scree plot

Note. Dotted line is Kaiser criterion.

в нее вошли IL-6 и IFN γ , менее выражено – IL-2 и IL-10, т. е. как провоспалительные, так и противовоспалительные цитокины. Для понимания процессов, описываемых ГК 2, необходимо подробнее рассмотреть группы.

Из рисунка 2 видно, что группа здоровых детей характеризовалась очень высокой изменчивостью, которую отражают размеры выпуклого многоугольника, описанного около факторных меток крайних вариантов на графике. В действительности она даже больше, чем на рисунке, поскольку в целях повышения читаемости графика на обеих его осях были установлены разрывы. Без последних площади выпуклых многоугольников, описанных около групповых меток детей здоровых, с нетяжелой ВП и тяжелой ВП, относились соответственно как 3,7:3,1:1. Это означает, что вариабельность иммунологических показателей в группе здоровых детей была более чем в 3 раза выше, чем у детей с ВП, а сама эта группа была неоднородна и в пространстве двух первых ГК представляла собой 4 кластера (пронумерованы курсивом). Рассмотрим их более подробно.

Кластер 1 состоял из 6 детей в возрасте 4-5 лет (в результате близости факторных меток они видны на рисунке 2 как два наблюдения); он находился в максимально отрицательной зоне вдоль ГК 1. Соответственно, эти дети имели минимальные концентрации практически всех цитокинов и особенно тех, проекции векторов которых расположены в максимально положительной зоне и свойственны детям с ВП (IL-28A, MCP-1 и IL-28A). Кластер 2 состоял из 4 детей 6-7 лет, которые имели более высокие уровни цитокинов, но особенно тех, проекции векторов которых находились в максимально положительной зоне вдоль ГК 2 (IFN γ и IL-6). Кластер 4 был представлен 7 детьми 9-15 лет с наиболее высокими концентрациями всех цитокинов, за исключением IFN γ и IL-6, которые обнаруживались в следовых количествах (соответственно около 1 и 0,1 пг/мл). Кластер 3 здоровых детей состоял из 11 человек 1-3 лет и 16-17 лет, которые имели промежуточные значения как вдоль ГК 1, так и ГК 2.

Третья ГК объясняла 10,8% изменчивости и отражала возрастные изменения ряда цитокинов. С положительными нагрузками в нее вошли GM-CSF и IL-1 β , с отрицательными – IL-8, IL-17A/F, IFN γ . ГК 4 характеризовала взаимодействие между возрастом и полом детей и объясняла лишь 8,5% общей изменчивости. С положительной нагрузкой пол и возраст был связан с IFN γ и IL-6, отрицательно – IL-2 и IL-10.

Обсуждение

По данным проведенного исследования, уровни в сыворотке крови IL-1 β , IL-4, IL-10, IL-2,

TNF α , IFN λ 2 (IL-28A), IFN λ 3 (IL-28B), IL-8, MCP-1, IL-17AF, GM-CSF достоверно коррелировали с тяжестью внебольничной пневмонией. Эти данные согласуются с некоторыми исследованиями, проведенными при ВП как у детей, так и у взрослых, поскольку цитокины являются важными растворимыми медиаторами врожденного и приобретенного иммунного ответа. Дифференцировка клеток, хемотаксис, активаторы или регуляторы воспалительных и противовоспалительных процессов являются одними из некоторых основных функций цитокинов в ответ на патоген [2, 9, 19, 21, 23, 26]. На ранних стадиях внебольничной пневмонии выработка цитокинов и других медиаторов воспаления регулируется посредством сложной сети взаимодействий между врожденными иммунными клетками, «неиммунными» клетками (например, эпителиальными клетками, эндотелиальными клетками и фибробластами) и вторгающимися возбудителями [23].

Наиболее выраженную корреляцию с тяжестью ВП имели IFN λ 2 (IL-28A), IFN λ 3 (IL-28B) и MCP-1, которые имели более высокие показатели в сыворотке крови по сравнению с другими цитокинами.

Интерфероны III типа вырабатываются эпителиальными клетками дыхательных путей и имеют важное значение в их защите, обеспечивая противовирусный ответ, а также путем регуляции самого эпителия, контроля и поддержания адаптивных иммунных реакций и целостности эпителиального барьера. Важная растущая концепция в области интерферонов III типа заключается в том, что этот цитокин не только имеет решающее значение для контроля, очистки и предотвращения патогенной инфекции на уровне эпителия, но также играет роль в обеспечении долгосрочного иммунитета путем стимулирования адаптивного иммунитета [25]. Учитывая тот факт, что пневмония является инфекционным заболеванием, этиология которого у детей является вирусно-бактериальной, доказанная роль IFN λ при SARS-CoV-2 имеет значение и при пневмонии. В исследовании, проведенном у пациентов с COVID-19, было показано, что высокая вирусная нагрузка SARS-CoV-2 индуцирует эффективную выработку IFN-III не только в верхних дыхательных путях у более молодых пациентов или пациентов с легкой степенью тяжести, но и то, что тяжелые пациенты характеризуются самыми высокими уровнями IFN λ в нижних дыхательных путях [24]. В экспериментальном исследовании 2022 года Zhenlu Chong и соавт. при назальном введении IFN λ мышам, зараженных вирусом SARS-CoV-2, ограничивалось поражение верхних и нижних дыхательных путей, не вы-

ТАБЛИЦА 1. НАГРУЗКИ ПОКАЗАТЕЛЕЙ НА НЕЛИНЕЙНЫЕ ГЛАВНЫЕ КОМПОНЕНТЫ В АНАЛИЗЕ ГРУПП ЗДОРОВЫХ ДЕТЕЙ И ДЕТЕЙ С ВНЕБОЛЬНИЧНОЙ ПНЕВМОНИЕЙ

TABLE 1. LOADINGS OF VARIABLES ON NONLINEAR PRINCIPAL COMPONENTS IN THE HEALTHY CHILDREN AND CHILDREN WITH COMMUNITY-ACQUIRED PNEUMONIA GROUPS' ANALYSIS

Показатели Variables	Главная компонента Principal component			
	1	2	3	4
Группа Group	0,671	0,284	-0,206	0,170
Возраст Age	-0,057	-0,220	0,571	0,566
Пол Gender	0,075	-0,194	-0,081	0,382
IL-1 β	0,381	-0,092	0,525	0,240
IL-2	0,480	0,539	0,165	-0,372
IL-4	0,516	0,405	0,114	0,109
IL-6	-0,003	0,781	-0,109	0,444
IL-8	0,632	-0,336	-0,463	-0,032
IL-10	0,388	0,528	0,270	-0,329
IL-17A/F	0,545	-0,344	-0,353	0,343
IL-28A	0,849	-0,096	-0,117	0,022
IL-28B	0,823	-0,128	0,076	0,056
TNF α	0,617	0,287	-0,039	-0,034
GM-CSF	0,479	-0,141	0,625	-0,002
IFN γ	-0,091	0,777	-0,303	0,424
MCP-1	0,842	-0,101	-0,219	-0,008
Объясненная дисперсия, % Explained variance, %	28,2	16,1	10,8	8,5

Примечание. Выделены нагрузки > |0,3|.

Note. Loadings > |0.3| are highlighted in bold.

зывая чрезмерного воспаления. Примечательно, что эквивалентные дозы IFN λ 2, доставляемые назальным, но не системным путем, ограничивали инфекцию SARS-CoV-2 [5]. В сравнительном исследовании 2023 года у детей и взрослых, зараженных вирусом SARS-CoV-2, уровни IFN λ 2/3 в сыворотке крови были значительно выше в группе детей с нетяжелым течением, чем в группах взрослых с нетяжелым и тяжелым течением, что, возможно, отражает особенности выработки IFN λ у детей в отличие от взрослых [10].

MCP-1, показавший в нашем анализе корреляцию с тяжестью ВП у детей, относится к семейству хемокинов и может продуцироваться различными клетками, включая моноциты, макрофаги, лимфоциты и эпителиальные клетки дыхательных путей, однако моноциты/макрофа-

ги являются его основным источником. Во время воспалительного процесса моноциты/макрофаги фагоцитируют и удаляют патогенные микроорганизмы из пораженной ткани. Таким образом, MCP-1 играет важную роль в рутинном иммунном надзоре и модуляции, а также в устранении острой бактериальной нагрузки [13, 18]. У взрослых пациентов с COVID-19 было выявлено, что уровень MCP-1 в сыворотке крови был значительно выше, чем у пациентов без инфекции и гораздо выше у пациентов отделения интенсивной терапии, что может рассматриваться независимым предиктором тяжести заболевания [4, 15]. В исследовании Yia-Ting Li и соавт. 2019 года у взрослых пациентов с пневмонией MCP-1 в плазме крови был значительно повышен на острой стадии, при этом концентрация MCP-1 в

плазме крови положительно коррелировала с показателями легочной и органной дисфункции и концентрация MCP-1 в плазме была биомаркером полиорганной недостаточности и потенциально могла предсказать неблагоприятный исход у пациентов с пневмонией [13]. В 2016 году в исследовании Yong K.K. и соавт. была также подтверждена корреляция уровня MCP-1 в плазме крови с тяжестью внебольничной пневмонии у взрослых [27], что подтверждается и проведенным нами исследованием у детей.

Таким образом, IFN λ 2 (IL-28A), IFN λ 3 (IL-28B) и MCP-1 могут рассматриваться независимыми биомаркерами тяжести внебольничной пневмонии.

При анализе уровня цитокинов в зависимости от возраста детей была отмечена тенденция к повышению в сыворотке крови GM-CSF, IL-1 β с возрастом, тогда как уровни IL-8, IL-17A/F, IFN γ снижались, что, возможно, связано с возрастными периодами развития иммунной системы [11].

Анализ уровня цитокинов в сыворотке крови у здоровых детей показал высокую вариабельность в различные возрастные периоды, что согласуется с некоторыми исследованиями, при которых определялись уровни цитокинов в сыворотке

крови у здоровых детей [11]. Так, в нашем исследовании в возрастной группе 9-15 лет все цитокины, кроме IFN γ и IL-6, были значительно повышены, что вероятно, вызвано физиологическими изменениями, происходящими в подростковом возрасте. Напротив, дети в возрасте 4-5 лет имели минимальные концентрации исследованных цитокинов, что, возможно, связано с изменениями в иммунной системе в данной возрастной группе [1, 8, 11].

Выводы

Таким образом, проведенный анализ позволил обнаружить согласованное увеличение в сыворотке крови у детей с ВП IL-1 β , IL-4, IL-10, IL-2, TNF α , IFN λ 2 (IL-28A), IFN λ 3 (IL-28B), IL-8, MCP-1, IL-17AF, GM-CSF, причем наибольшую корреляцию с тяжестью показали IFN λ 2 (IL-28A), IFN λ 3 (IL-28B) и MCP-1, которые могут рассматриваться дополнительными биомаркерами тяжести внебольничной пневмонии. Также была обнаружена существенная вариабельность цитокинового профиля у здоровых детей и ее существенное сужение при пневмониях, особенно тяжелой.

Список литературы / References

1. Зайцева О.В. Формирование иммунитета: актуальные вопросы педиатрии // Аллергология и иммунология в педиатрии, 2014. Т. 2, № 37. С. 12-22. [Zaitseva O.V. Formation of immunity: topical issues of pediatrics. *Allergologiya i immunologiya v pediatrii = Allergology and Immunology in Pediatrics*, 2014, Vol. 2, no. 37, pp. 12-22. (In Russ.)]
2. Изюрова Н.В., Савочкина А.Ю., Узунова А.Н., Нохрин Д.Ю. Цитокиновый профиль при внебольничной пневмонии у детей // Медицинская иммунология, 2022. Т. 24, № 5. С. 943-954. [Izyurova N.V., Savochkina A.Yu., Uzunova A.N., Nokhrin D.Yu. Cytokine profile in community-acquired pneumonia in children. *Meditinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2022, Vol. 24, no. 5, pp. 943-954. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-CPI-2538.
3. Пневмония (внебольничная). Оригинал-макет, 2022. 82 с. [Pneumonia (community-acquired)]. Original layout, 2022. 82 p.
4. Chen Y., Wang J., Liu C., Su L., Zhang D., Fan J., Yang Y., Xiao M., Xie J., Xu Y., Li Y., Zhang S. IP-10 and MCP-1 as biomarkers associated with disease severity of COVID-19. *Mol. Med.*, 2020, Vol. 26, no. 1, 97. doi: 10.1186/s10020-020-00230-x.
5. Chong Z., Karl C.E., Halfmann P.J., Kawaoka Y., Winkler E.S., Keeler S.P., Holtzman M.J., Yu J., Diamond M.S. Nasally delivered interferon- λ protects mice against infection by SARS-CoV-2 variants including Omicron. *Cell Rep.*, 2022, Vol. 39, no. 6, 110799. doi: 10.1016/j.celrep.2022.110799.
6. Gifi A. *Nonlinear Multivariate Analysis*. N.Y.: John Wiley & Sons, 1990. 579 p.
7. Hammer O., Harper D.A.T., Ryan P.D. PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. *Palaeontol. Electron.*, 2001, Vol. 4, Iss. 1, 4. Available at: http://palaeo-electronica.org/2001_1/past/issue1_01.htm.
8. Härtel C., Adam N., Strunk T., Temming P., Müller-Steinhardt M., Schultz C. Cytokine responses correlate differentially with age in infancy and early childhood. *Clin. Exp. Immunol.*, 2005, Vol. 142, no. 3, pp. 446-453.
9. Haugen J., Chandyo R.K., Brokstad K.A., Mathisen M., Ulak M., Basnet S., Valentiner-Branth P., Strand T.A. Cytokine concentrations in plasma from children with severe and non-severe community acquired pneumonia. *PLoS One*, 2015, Vol. 10, no. 9, e0138978. doi: 10.1371/journal.pone.0138978.
10. Jeong S.D., Lee H., Chang J.Y., Lee S.Y., Choi J.E., Yang E., Jeong H.W., Choi J.P., Han M.S., Shin E.C. Increased type III interferons and NK cell functions in SARS-CoV-2-infected children. *Signal Transduct. Target Ther.*, 2023, Vol. 8, no. 1, 54. doi: 10.1038/s41392-023-01340-8.
11. Kleiner G., Marcuzzi A., Zanin V., Monasta L., Zauli G. Cytokine levels in the serum of healthy subjects. *Mediators Inflamm.*, 2013, Vol. 2013, 434010. doi: 10.1155/2013/434010.
12. le Roux D.M., Zar H.J. Community-acquired pneumonia in children – a changing spectrum of disease. *Pediatr. Radiol.*, 2017, Vol. 47, no. 11, pp. 1392-1398.

13. Li Y.T., Wang Y.C., Lee H.L., Tsao S.C., Lu M.C., Yang S.F. Monocyte chemoattractant protein-1, a possible biomarker of multiorgan failure and mortality in ventilator-associated pneumonia. *Int. J. Mol. Sci.*, 2019, Vol. 20, no. 9, 2218. doi: 10.3390/ijms20092218.
14. Linting M., Meulman J.J., Groenen P.J., van der Kooij A.J. Nonlinear principal components analysis: introduction and application. *Psychol. Methods*, 2007, Vol. 12, no. 3, pp. 336-358.
15. Lu Q., Zhu Z., Tan C., Zhou H., Hu Y., Shen G., Zhu P., Yang G., Xie X. Changes of serum IL-10, IL-1 β , IL-6, MCP-1, TNF- α , IP-10 and IL-4 in COVID-19 patients. *Int. J. Clin. Pract.*, 2021, Vol. 75, no. 9, e14462. doi: 10.1111/ijcp.14462.
16. McGuinness D., Bennett S., Riley E. Statistical analysis of highly skewed immune response data. *J. Immunol. Methods*, 1997, Vol. 201, no. 1, pp. 99-114.
17. Michailidis G., de Leeuw J. The gift system of descriptive multivariate analysis. *Stat. Sci.*, 1998, Vol. 13, no. 4, pp. 307-336.
18. Nandi A., Bishayi B. Murine macrophage response from peritoneal cavity requires signals mediated by chemokine receptor CCR-2 during *Staphylococcus aureus* infection. *Immunol. Res.*, 2016, Vol. 64, no. 1, pp. 213-232.
19. Nascimento-Carvalho E.C., Vasconcellos A.G., Clarêncio J., Andrade D., Barral A., Barral-Netto M., Nascimento-Carvalho C.M. Evolution of cytokines/chemokines in cases with community-acquired pneumonia and distinct etiologies. *Pediatr. Pulmonol.*, 2020, Vol. 55, no. 1, pp. 169-176.
20. Raman D., Sobolik-Delmaire T., Richmond A. Chemokines in health and disease. *Exp. Cell Res.*, 2011, Vol. 317, no. 5, pp. 575-589.
21. Rendon A., Rendon-Ramirez E.J., Rosas-Taraco A.G. Relevant cytokines in the management of community-acquired pneumonia. *Curr. Infect. Dis. Rep.*, 2016, Vol. 18, no. 3, 10. doi: 10.1007/s11908-016-0516-y.
22. Reverberi R. The statistical analysis of immunohaematological data. *Blood Transfus.*, 2008, Vol. 6, no. 1, pp. 37-45.
23. Siljan W.W., Holter J.C., Nymo S.H., Husebye E., Ueland T., Aukrust P., Mollnes T.E., Heggelund L. Cytokine responses, microbial aetiology and short-term outcome in community-acquired pneumonia. *Eur. J. Clin. Invest.*, 2018, Vol. 48, no. 1, e12865. doi: 10.1111/eci.12865.
24. Sposito B., Broggi A., Pandolfi L., Crotta S., Clementi N., Ferrarese R., Sisti S., Criscuolo E., Spreafico R., Long J.M., Ambrosi A., Liu E., Frangipane V., Saracino L., Bozzini S., Marongiu L., Facchini F.A., Bottazzi A., Fossali T., Colombo R., Clementi M., Tagliabue E., Chou J., Pontiroli A.E., Meloni F., Wack A., Mancini N., Zanoni I. The interferon landscape along the respiratory tract impacts the severity of COVID-19. *Cell*, 2021, Vol. 184, no. 19, pp. 4953-4968.e16.
25. Stanifer M.L., Guo C., Doldan P., Boulant S. Importance of Type I and III interferons at respiratory and intestinal barrier surfaces. *Front. Immunol.*, 2020, Vol. 11, 608645. doi: 10.3389/fimmu.2020.608645.
26. Vasconcellos A.G., Clarêncio J., Andrade D., Araújo-Neto C.A., Barral A., Nascimento-Carvalho C.M. Systemic cytokines/chemokines associated to radiographic abnormalities in pneumonia in children. *Cytokine*, 2020, Vol. 135, 155191. doi: 10.1016/j.cyto.2020.155191.
27. Yong K.K., Chang J.H., Chien M.H., Tsao S.M., Yu M.C., Bai K.J., Tsao T.C., Yang S.F. Plasma monocyte chemoattractant protein-1 level as a predictor of the severity of community-acquired pneumonia. *Int. J. Mol. Sci.*, 2016, Vol. 17, no. 2, 179. doi: 10.3390/ijms17020179.

Авторы:

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

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

Савочкина А.Ю. — д.м.н., профессор кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Челябинск, Россия

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

Authors:

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

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

Savochkina A. Yu., PhD, MD (Medicine), Professor, Department of Microbiology, Virology and Immunology, South Ural Medical State University, Chelyabinsk, Russian Federation

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

Поступила 22.03.2023

Отправлена на доработку 28.03.2023

Принята к печати 07.05.2023

Received 22.03.2023

Revision received 28.03.2023

Accepted 07.05.2023

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА КЛЕТОЧНОГО ИММУННОГО ОТВЕТА НА SARS-CoV-2 ПРИ ИНФЕКЦИИ И ВАКЦИНАЦИИ

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

ФКУН «Российский противочумный институт “Микроб” Роспотребнадзора», г. Саратов, Россия

Резюме. Важной областью исследований является мониторинг параметров иммунного ответа на инфекцию SARS-CoV-2 и их анализ в сравнении с характеристиками вакцинно-опосредованной иммунной защиты с целью определения детерминант клеточного ответа. Цель работы – сравнить по ряду характеристик состояние клеточного иммунного ответа у пациентов, перенесших COVID-19, и у лиц, привитых препаратом пептидной вакцины. В исследовании приняли участие добровольцы, перенесшие COVID-19 различной степени тяжести (30 человек), а также лица, прошедшие полный курс вакцинации препаратом пептидной вакцины (27 человек). Для сравнения использовали кровь добровольцев, взятую перед вакцинацией. Иммунофенотипирование лейкоцитов проводили с помощью процедуры Lyse/No-Wash (BD Bioscience, США) и реагентов моноклональных антител Cyto-Stat (CD45-FITC, CD4-PE, CD8-ECD, CD3-PC5), CD45RA-PC7, CD45RO-PE (Beckman Coulter, США) и анализировали на проточном цитометре DakoCytomation (Дания). Определение внутриклеточного $IFN\gamma$ ($CD4^+IFN\gamma^+$) проводили согласно стандартной методике. Продукцию цитокинов определяли с помощью наборов для выявления $IFN\gamma$, $TNF\alpha$, $IL-4$, $IL-8$, $IL-10$ (АО «Вектор-Бест», Россия) на автоматическом иммуноферментном анализаторе LAZURIT (Dyupex Technologies, США). По результатам исследования показано, что после вакцинации и перенесенной инфекции COVID-19 формируется клеточный иммунитет. Однако наиболее выраженный иммунный ответ регистрировали у переболевших COVID-19, при котором в более 60% случаев наблюдали увеличение количества $CD4^+$ T-хелперов памяти (8,7 (0,5-12,1) % против 0,3 (0,1-0,5) % в группе сравнения, $p < 0,05$) и доли $CD4^+IFN\gamma^+$ T-лимфоцитов (4,2 (1,8-4,3) % против 0,4 (0-0,8) % в группе сравнения, $p < 0,05$), а также повышался функциональный резерв клеток по продукции цитокинов $TNF\alpha$, $IL-8$, $IL-10$. У привитых пептидной вакциной добровольцев через месяц после вакцинации в общем пуле T-лимфоцитов памяти преобладали, по-видимому, $CD8^+$ T-клетки памяти ($CD45^+CD8^+CD45RA^-CD45RO^+$). Общим для переболевших и вакцинированных лиц являлось значимое повышение (в среднем в 8,2 раза) $CD4^+IFN\gamma^+$ активированных клеток, а также значений Кона-индуцированной продукции $IL-4$ (3,3 (1,1-4,5) пг/мл и 2,8 (1,7-3,9) пг/мл соответственно против 1,3 (0,1-2,4) пг/мл в группе сравнения, $p < 0,05$). Получен-

Адрес для переписки:

Клюева Светлана Николаевна
ФКУН «Российский противочумный институт
“Микроб” Роспотребнадзора
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 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:

С.Н. Клюева, С.А. Бугоркова, А.Л. Кравцов,
Т.Н. Каштанова, В.А. Кожевников «Сравнительная
характеристика клеточного иммунного ответа
на SARS-CoV-2 при инфекции и вакцинации»
// Медицинская иммунология, 2024. Т. 26, № 2.
С. 345-354. doi: 10.15789/1563-0625-CCO-2690

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

For citation:

S.N. Klyueva, S.A. Bugorkova, A.L. Kravtsov,
T.N. Kashtanova, V.A. Kozhevnikov “Comparative
characteristics of the cellular immune response to SARS-CoV-2
during infection and post-vaccination”, *Medical Immunology
(Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2024, Vol. 26, no. 2,
pp. 345-354. doi: 10.15789/1563-0625-CCO-2690

© Klyueva S.N. et al., 2024
The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License
DOI: 10.15789/1563-0625-CCO-2690

ные данные дополняют имеющиеся в литературе сведения относительно формирования реакций клеточного иммунного ответа на SARS-CoV-2, формирующегося в результате перенесенного заболевания или проведения мероприятий по специфической профилактике COVID-19. Дальнейший поиск клеточных коррелятов защиты от новой коронавирусной инфекции позволит пересмотреть текущую стратегию вакцинации и выработать оптимальный подход к профилактике COVID-19.

Ключевые слова: SARS-CoV-2, COVID-19, S белок SARS-CoV-2, пептидная вакцина, Т-клетки памяти, цитокины

COMPARATIVE CHARACTERISTICS OF THE CELLULAR IMMUNE RESPONSE TO SARS-CoV-2 DURING INFECTION AND POST-VACCINATION

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

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

Abstract. An important area of research concerns monitoring of immune response features in patients with SARS-CoV-2 infection as well as their analysis, as compared with characteristics of vaccine-mediated protection, in order to specify the determinants of cellular immune response. The aim of our work was to compare the state of cellular immune response in patients who underwent COVID-19, and in persons vaccinated with a peptide vaccine preparation. The study involved volunteers who suffered with COVID-19 of varying severity ($n = 30$), as well as persons who completed the full course of vaccination with the peptide vaccine ($n = 27$). For comparison, we took blood specimens from the volunteers before vaccination. Immunophenotyping of leukocytes was performed by the Lyse/No-Wash procedure (BD Bioscience, USA), and Cyto-Stat monoclonal antibodies (CD45-FITC, CD4-PE, CD8-ECD, CD3-PC5), CD45RA-PC7, CD45RO-PE (Beckman Coulter, USA), and analyzed with a DakoCytomation flow cytometer (Denmark). Determination of intracellular IFN γ (CD4⁺IFN γ ⁺) was performed with the standard technique. Cytokine production was determined using reagent kits for detection of IFN γ , TNF α , IL-4, IL-8, IL-10 (Vector-Best JSC, Russia) with automatic enzyme immunoassay analyzer LAZURIT (Dynex Technologies, USA). As based on the results obtained, we have shown that cellular immunity was developed after vaccination and infection with COVID-19. However, the most pronounced immune response was recorded in the COVID-19 reconvalescents, i.e., more than 60% of these patients showed an increased number of CD4⁺T-memory helper cells (8.7 (0.5-12.1) % *versus* 0.3 (0.1-0.5) % in the comparison group, $p < 0.05$) as well as proportion of CD4⁺IFN γ ⁺T lymphocytes (4.2 (1.8-4.3) % *versus* 0.4 (0-0.8) % in the comparison group, $p < 0.05$). Moreover, we revealed an increased functional reserve of cells in terms of TNF α , IL-8, IL-10 production. One month after vaccination of volunteers with the peptide-based preparation, the total pool of memory T lymphocytes was apparently dominated by CD8⁺T memory cells (CD45⁺CD8⁺CD45RA⁻CD45RO⁺). A significant increase was found in the average levels of CD4⁺IFN γ ⁺ activated cells (8.2-fold), as well as in values of ConA-induced IL-4 production (3.3 (1.1-4.5) pg/mL, and 2.8 (1.7-3.9) pg/mL, respectively *versus* 1.3 (0.1-2.4) pg/mL in the control group, $p < 0.05$). The data obtained are in accordance with information available in the literature concerning development of cellular immune responses to SARS-CoV-2, which results from a past illness, or measures for the specific prevention of COVID-19. Further search for cellular correlates of protection against a new coronavirus infection will allow us to revise the current vaccination strategy and develop an optimal approach to COVID-19 prevention.

Keywords: COVID-19, SARS-CoV-2, S protein, peptide vaccine, memory T cells, cytokines

Введение

Пандемия, вызванная SARS-CoV-2, сохраняет статус чрезвычайной ситуации в области общественного здравоохранения, имеющей международное значение [21]. Только за первые 2 месяца текущего года в мире зарегистрирова-

но более 6,7 миллионов новых случаев заражения SARS-CoV-2 и более 64 000 смертей от COVID-19 [24]. Одной из эффективных мер противодействия этой инфекции стала вакцинация, но остается открытым вопрос относительно продолжительности защиты после прививки. Зная

особенности формирования иммунного ответа на инфекцию, можно предположить насколько эффективной будет реакция на вакцину. С одной стороны, многочисленные исследования свидетельствуют, что титры специфических антител коррелируют с защитой от COVID-19 на популяционном уровне, но в то же время защитные титры на индивидуальном уровне так и не установлены. Тем не менее снижение риска последующей симптоматической инфекции SARS-CoV-2 прямо связано с более высокими титрами антител [8, 9].

Известно, что для предотвращения заражения SARS-CoV-2 и ограничения риска развития тяжелого течения COVID-19 важны и другие иммунные механизмы, хотя прямая их корреляция с защитой от новой коронавирусной инфекции до конца не установлена. Так, на модели макаков адаптивный перенос плазмы с высокими титрами нейтрализующих антител обеспечивал защиту после заражения SARS-CoV-2 только в условиях адекватного функционирования CD8⁺T-клеток [14]. Дальнейший анализ гуморального ответа и реакции В- и Т-клеток у остро инфицированных и выздоравливающих людей показал, что защита зависит от координации всех трех компонентов иммунного ответа [20].

Специфические для SARS-CoV-2 В- и Т-клетки памяти регистрируют уже в течение первого месяца после перенесенного заболевания [7] на фоне практически 90%-ной сероконверсии, а Т-клетки с фенотипом CD8⁺ (IFN γ ⁺) и CD4⁺ (IL-2⁺ IFN γ или IL-2⁺ IFN γ ⁻) выявляют в течение 12 месяцев после выздоровления [15]. При вакцинации защитный эффект иммунитета поддерживается более долгосрочными компонентами гуморального ответа – В-клетками памяти и CD4⁺ и CD8⁺T-клетками, которые остаются на относительно стабильном уровне до 6-8 месяцев после прививки [6]. Исследования реакции В- и Т-клеточного ответа макроорганизма в основном касались изучения реакции на мРНК и векторные вакцины [11, 16, 19], в то время как в проспективных исследованиях по оценке эффективности пептидной вакцины, применяемой для специфической профилактики COVID-19 в Российской Федерации, оценивался преимущественно специфический гуморальный иммунный ответ [4], а также роль В-клеток в формировании иммунологической памяти в ответ на пептидную вакцину «ЭпиВакКорона» лицам, ранее перенесшим COVID-19 [5], а вот состояние Т-лимфоцитов памяти и изменение уровня секреции ими цитокинов в ответ на этот препарат ранее не оценивали.

Цель представленной работы – сравнить по ряду характеристик состояние клеточного иммунного

ответа у пациентов, перенесших COVID-19, и у лиц, привитых препаратом пептидной вакцины.

Материалы и методы

Анализ проведен по результатам наблюдательного исследования, проводимого на базе отдела иммунологии ФКУН «Российский противочумный институт “Микроб” Роспотребнадзора». Протокол исследования одобрен Этическим комитетом ФКУН «Российский противочумный институт “Микроб” Роспотребнадзора» (протокол № 9 от 21.10.2020). В исследовании приняли участие 57 добровольцев (39 женщин и 18 мужчин) в возрасте от 25 до 65 лет, согласившиеся на участие в исследовании на основании подписанного добровольного информированного согласия. В исследовании приняли участие добровольцы, перенесшие COVID-19 различной степени тяжести, а также лица, прошедшие полный курс вакцинации препаратом пептидной вакцины для профилактики новой коронавирусной инфекции (препарат «ЭпиВакКорона», производства ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии “Вектор” Роспотребнадзора», серия № КО7-11.20). Факт перенесенного COVID-19 у добровольцев (I группа, 30 человек) был подтвержден медицинской документацией и выделением РНК вируса SARS-CoV-2 в биологическом материале из носоглотки методом ПЦР при поступлении в стационар и обращении в медицинскую организацию. Тяжесть перенесенной инфекции оценивалась на основании критериев тяжести и терапии, согласно Временным методическим рекомендациям «Профилактика, диагностика и лечение новой коронавирусной инфекции COVID-19» [1]. Добровольцы II группы (27 человек) получили полный курс вакцинации препаратом пептидной вакцины. Для сравнения использовали кровь добровольцев, взятую перед прививкой (III группа). Биологический материал (кровь) забирали из локтевой вены в утренние часы через 1 месяц после окончания полного курса вакцинации или выздоровления в пробирки с гепарином.

Имунофенотипирование лейкоцитов проводили в микрообъемах цельной крови с помощью процедуры Lyse/No-Wash (BD Bioscience, США) [3] и реагентов меченых моноклональных антител Cyto-Stat (CD45-FITC, CD4-PE, CD8-ECD, CD3-PC5), CD45RA-PC7, CD45RO-PE (Beckman Coulter, США).

Выделение мононуклеаров периферической крови (МПК) проводили в стерильных условиях на градиенте плотности ($\rho = 1,077$; ООО «ПанЭко», РФ). Определение внутриклеточного IFN γ (CD4⁺IFN γ ⁺) выполняли по методике

Yang L.-T. [25]: МПК стимулировали рекомбинантным SARS-CoV-2 белком S1 (2019-nCoV) (AtaGenix Laboratories, Китай) в концентрации 1 мкг/мл в присутствии моноклональных антител CD28 и CD49d (BD FastImmune, США). Клетки инкубировали в течение 1 часа при 37 °С в 5% CO₂, затем вносили брефелдин А (BD Biosciences, США) и продолжали инкубацию еще в течение 5 часов. После этого клетки промывали, фиксировали, пермеабелизировали, окрашивали антителами CD4-FITC, анти-IFN γ PE (Beckman Coulter, США) и анализировали на проточном цитометре DakoCytomation (Дания) с программным обеспечением Summit v.4.3 Built 2445.

Для определения продукции цитокинов венозную кровь с гепарином разводили в соотношении 1:5 средой RPMI 1640 («ПанЭко», Россия), содержащей 100 мкг/мл гентамицина (ОАО «Мосхимфармпрепараты» им. Н.А. Семашко). Функциональный потенциал клеток оценивали по изменению уровня спонтанной, индуцированной продукции цитокинов и коэффициенту стимуляции (КС) по формуле:

$$КС = (И - С) / С \times 100\%$$

где И – значение концентрации цитокина в Кона-индуцированной пробе, С – значение концентрации цитокина в спонтанной пробе [2]. В качестве индуктора использовали стандартный Т-клеточный митоген конканавалин А (Кона) («ПанЭко», Россия) в концентрации 15 мкг. Продукцию цитокинов определяли методом твердофазного иммуоферментного анализа с помощью коммерческих наборов для выявления IFN γ , TNF α , IL-4, IL-8, IL-10 (АО «Вектор-Бест», Россия) на автоматическом иммуоферментном анализаторе LAZURIT (Dyplex Technologies, США).

Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием стандартного пакета программ Microsoft Office Excel 2016, Statistica 10.0 (StatSoft Inc., 2010). Полученные данные представляли в виде медианы (Me) и квартильных отклонений (Q_{0,25}-Q_{0,75}). Для расчета межгрупповых ассоциаций использовали U-критерий Манна–Уитни. Ранговый корреляционный анализ по Пирсону применяли для оценки степени корреляции между исследуемыми параметрами.

Результаты

По экспрессии на клеточной поверхности различных изоформ молекулы CD45 выделяли три субпопуляции Т-лимфоцитов-хелперов CD45⁺CD4⁺: наивные CD45⁺CD4⁺CD45RA⁺CD45RO⁻, активированные CD45⁺CD4⁺CD45RA⁺CD45RO⁺ и Т-хелперы памяти CD45⁺CD4⁺CD45RA⁻CD45RO⁺ (рис. 1). В результате цитометрического анали-

за установлено (табл. 1), что через 1 месяц после перенесенной инфекции COVID-19 значительно повышался уровень содержания Т-хелперов памяти (CD45⁺CD4⁺CD45RA⁻CD45RO⁺) относительно показателей у вакцинированных лиц и лиц группы сравнения (p < 0,05). Следует отметить, что на долю Т-хелперов памяти у перенесших COVID-19 приходилось значительное большинство в общем пуле лимфоцитов с фенотипом CD45RA⁻CD45RO⁺ (рис. 1С, Е; табл. 1). Наоборот, у вакцинированных лиц доля Т-хелперов памяти составляла меньшую часть от общего пула лимфоцитов с фенотипом CD45RA⁻CD45RO⁺ (табл. 1). Выявлено увеличение относительного содержания цитотоксических Т-клеток (CD45⁺CD3⁺CD8⁺) у вакцинированных лиц относительно группы сравнения (p < 0,05).

С помощью метода внутриклеточного окрашивания цитокинов и проточной цитометрии оценивали процент стимулированных S-белком IFN γ -продуцирующих CD4⁺Т-лимфоцитов. Анализ показал наличие CD4⁺IFN γ ⁺ активированных клеток в 55,5% случаев у вакцинированных и в 63,2% случаев у переболевших COVID-19, в среднем в 8,2 раза превышающих диапазон в группе сравнения (p < 0,05). При этом количество S-активированных CD4⁺IFN γ ⁺ лимфоцитов у переболевших в 2 раза было выше, чем у вакцинированных (p < 0,05) (табл. 1).

Далее методом ИФА оценивали продукцию цитокинов МПК в ответ на специфическую стимуляцию S-белком (табл. 2). В группах вакцинированных (44,4%) и переболевших COVID-19 (65,1%) лиц выявлено существенное повышение S1-индуцированной продукции IFN γ и TNF α относительно группы сравнения (p < 0,05). Также значительно повышался (p < 0,05) уровень IL-4 в S1-индуцированных пробах переболевших COVID-19 относительно группы сравнения.

Результаты анализа IFN γ методом ИФА подтверждают данные проточной цитометрии, о чем свидетельствует наличие прямой высокой корреляционной связи между количеством клеток с внутриклеточной формой IFN γ (CD4⁺IFN γ ⁺) и S1-индуцированной продукцией IFN γ МПК в группах вакцинированных (r = 0,94; p = 0,04) и переболевших COVID-19 лиц (r = 0,86; p = 0,04).

При сравнительном анализе иммуоферментного определения цитокинов в супернатантах крови (табл. 3) установлено повышение уровня Кона-индуцированной продукции IL-8 и IL-10 у переболевших COVID-19 пг/мл относительно вакцинированных лиц и лиц группы сравнения (p < 0,05). Кроме того, у переболевших COVID-19 зарегистрировано существенное повышение уровня Кона-индуцированной продукции TNF α по сравнению с привитыми добро-

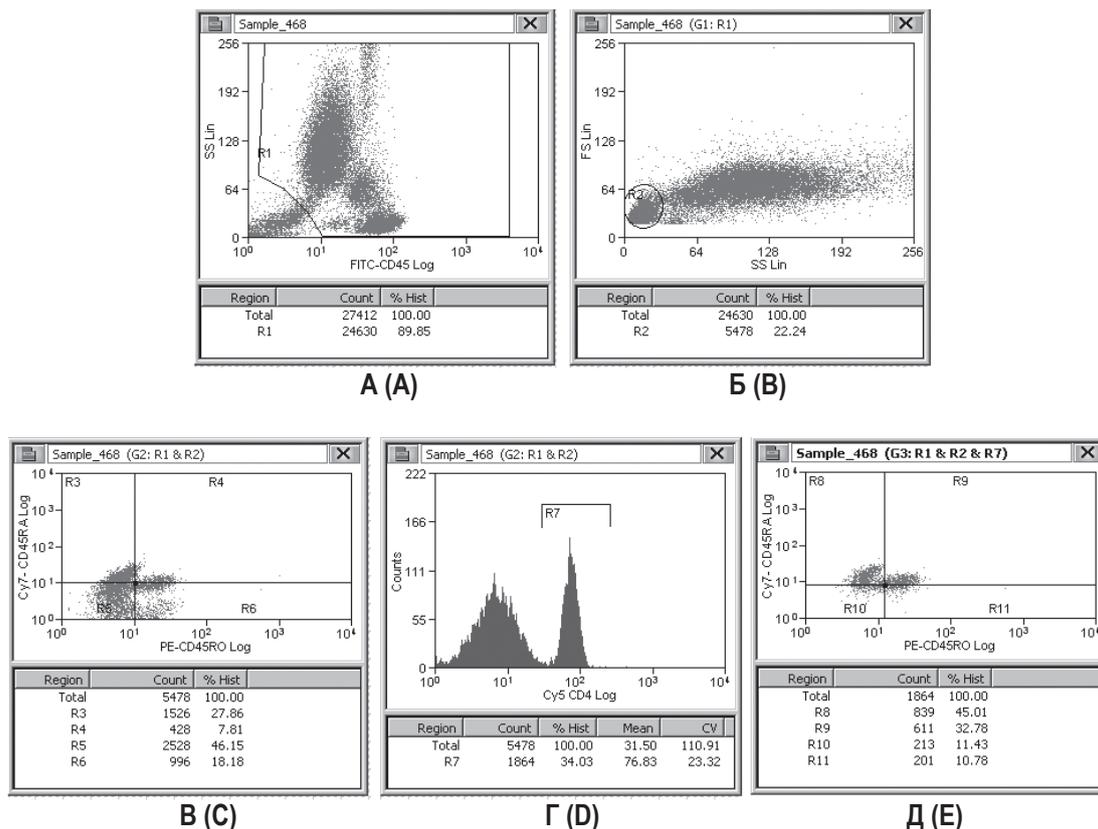


Рисунок 1. Протокол поэтапного гейтирования, применявшийся для выявления Т-клеток памяти в крови переболевшего COVID-19 добровольца

Примечание. На цитограмме А: по оси абсцисс – плотность экспрессии на поверхности клеток общего лейкоцитарного антигена CD45; по оси ординат – степень клеточной гранулярности (интенсивность бокового светорассеяния – SS), по которой лимфоциты крови отделялись от моноцитов и гранулоцитов. R1 – область цитограммы А, за пределами которой учитывались сигналы от разрушенных лейкоцитов (клеточный дебрис). Путем гейтирования по R1 (G1:R1) из анализа исключался дебрис для выделения на цитограмме Б, соответствующей лимфоцитам области R2. Во фракции лимфоцитов (в гейте G2:R1&R2) идентифицировали по интенсивности флуоресценции CD4⁺Т-хелперы (в регионе R7 на гистограмме Г), а также определяли Т-хелперы памяти CD45⁺CD4⁺CD45RA⁻CD45RO⁺ (10,78% клеток в регионе R11 на цитограмме Д) после гейтирования G3:R1&R2&R7. Общее число лимфоцитов с фенотипом Т-клеток памяти (18,18% клеток в регионе R6 на гистограмме В) определяли в гейте G2, без гейтирования по R7.

Figure 1. Stepwise gating protocol used to detect memory T cells in the blood of a volunteer who has recovered from COVID-19
Note. On the cytogram A: along the abscissa, the density of expression on the cell surface of the common leukocyte antigen CD45; along the y-axis, the degree of cellular granularity (side scatter intensity – SS), along which blood lymphocytes were separated from monocytes and granulocytes. R1 is the area of cytogram A, beyond which signals from destroyed leukocytes (cell debris) were taken into account. Debris was excluded from the analysis by gating at R1 (G1:R1) for isolation on the cytogram B of the R2 region corresponding to lymphocytes. In the lymphocyte fraction (in gate G2:R1&R2), CD4⁺T helpers were identified by fluorescence intensity (in the R7 region on histogram D), and memory T helpers CD45⁺CD4⁺CD45RA⁻CD45RO⁺ (10.78% of cells in region R11 in cytogram E) after gated G3:R1&R2&R7. The total number of lymphocytes with the memory T cell phenotype (18.18% of cells in the R6 region in histogram C) was determined in the G2 gate, without gated in R7.

вольцами ($p < 0,05$). В группах переболевших и вакцинированных лиц значения КонА-индуцированной продукции IL-4 значимо превосходили аналогичный показатель в группе сравнения ($p < 0,05$).

Для характеристики функциональной активности клеток, продуцирующих исследуемые цитокины, рассчитывали КС. Зарегистрировано достоверное повышение КС для IL-10, как для привитых, так и переболевших COVID-19

добровольцев (80,1 (76,4-86,3 и 92,5 (90,2-94,7) соответственно) относительно группы сравнения (67,9 (66,7-69,1), $p < 0,05$). Однако в группе вакцинированных лиц существенно снижался КС для IL-4 (57,1 (50,3-63,6) по сравнению с аналогичным показателем для лиц, перенесших COVID-19 (94,9 (90,6-97,2), $p < 0,05$), что, косвенно свидетельствует о более выраженной реакции со стороны клеточного иммунного ответа на SARS-CoV-2, заключающейся в активации ре-

ТАБЛИЦА 1. ПОКАЗАТЕЛИ КЛЕТОЧНОГО ИММУНИТЕТА В ПОСТВАКЦИНАЛЬНЫЙ И ПОСТИНФЕКЦИОННЫЙ ПЕРИОД COVID-19, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

TABLE 1. INDICATORS OF CELLULAR IMMUNITY IN THE POST-VACCINATION AND POST-INFECTION PERIOD OF COVID-19, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

Группы Groups		
I n = 30	II n = 27	III n = 27
Т-хелперы (CD45⁺CD3⁺CD4⁺), % T helpers (CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD4 ⁺), %		
47,8 (41,5-50,0)	45 (34,2-49,7)	43,9 (40,0-54,5)
Цитотоксические Т-клетки (CD45⁺CD3⁺CD8⁺), % Cytotoxic T cells (CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD8 ⁺), %		
22 (17,3-24,0)	23,7 (18,2-26,2)*	19,2 (15,1-21,0)
Общее количество лимфоцитов памяти с фенотипом CD45RA⁻CD45RO⁺, % Total number of memory lymphocytes with CD45RA ⁻ CD45RO ⁺ phenotype, %		
14,8 (5,0-22,3)*	4,6 (2,0-6,3)	3,8 (2,1-4,2)
Т-хелперы памяти CD45⁺CD4⁺CD45RA⁻CD45RO⁺, % Memory T helpers CD45 ⁺ CD4 ⁺ CD45RA ⁻ CD45RO ⁺ , %		
8,7 (0,5-12,1)**	0,5 (0,1-0,8)	0,3 (0,1-0,5)
CD4⁺Т-лимфоциты, синтезирующие IFNγ (CD4⁺IFNγ⁺) после стимуляции S-белком, % CD4 ⁺ T lymphocytes synthesizing IFN γ (CD4 ⁺ IFN γ ⁺) after stimulation with S protein, %		
4,2 (1,8-4,3)**	1,9 (0,8-3,7)*	0,4 (0,0-0,8)

Примечание.* – p < 0,05 различия с группой III; ** – p < 0,05 различия с группой II.

Note.*, p < 0.05 differences with group III; **, p < 0.05 differences with group II.

ТАБЛИЦА 2. ИНДУЦИРОВАННАЯ S-БЕЛКОМ SARS-CoV-2 ПРОДУКЦИЯ ЦИТОКИНОВ В ПОСТВАКЦИНАЛЬНЫЙ И ПОСТИНФЕКЦИОННЫЙ ПЕРИОД COVID-19, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

TABLE 2. CYTOKINE PRODUCTION INDUCED BY SARS-CoV-2 S PROTEIN IN THE POST-VACCINATION AND POST-INFECTION PERIOD OF COVID-19, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

Цитокин Cytokine	Группы Groups		
	I	II	III
IFNγ, пг/мл IFN γ , pg/mL	5,4 (3,5-7,5)*	6,7 (4,3-8,0)*	2,4 (1,3-4,0)
TNFα, пг/мл TNF α , pg/mL	259,1 (157,8-382,6)*	176,4 (68,8-250,1)*	114,5 (96,7-132,3)
IL-4, пг/мл IL-4, pg/mL	3,8 (3,1-4,4)*	2,5 (2,1-2,9)	2,1 (1,9-2,4)

Примечание.* – p < 0,05 различия с группой III.

Note.*, p < 0.05 differences with group III.

ТАБЛИЦА 3. ПРОДУКЦИЯ ЦИТОКИНОВ В ПОСТВАКЦИНАЛЬНЫЙ И ПОСТИНФЕКЦИОННЫЙ ПЕРИОД COVID-19, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

TABLE 3. PRODUCTION OF CYTOKINES IN THE POST-VACCINATION AND POST-INFECTION PERIOD OF COVID-19, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})

Цитокин Cytokine	Продукция спонтанная / индуцированная Products spontaneous / induced	Группы Groups		
		I	II	III
IFN γ , пг/мл IFN γ , pg/mL	спонтанная spontaneous	1,3 (0,7-6,1)*	1,2 (0,3-3,5)*	3,6 (0,8-14,7)
	индуцированная induced	480,2 (311,5-1102,3)	364,1 (208,9-630,4)	345,8 (174,2-1045,2)
TNF α , пг/мл TNF α , pg/mL	спонтанная spontaneous	0,3 (0,0-2,0)**	2,6 (1,9-3,9)*	0 (0-0)
	индуцированная induced	291,4 (253,0-374,5)**	171,3 (67,53-273,20)	382,6 (369,0-413,2)
IL-4, пг/мл IL-4, pg/mL	спонтанная spontaneous	0,2 (0,01-0,60)	1,2 (0,8-1,5)	0 (0,00-0,14)
	индуцированная induced	3,3 (1,1-4,5)*	2,8 (1,7-3,9)*	1,3 (0,1-2,4)
IL-8, пг/мл IL-8, pg/mL	спонтанная spontaneous	796,9 (374,2-1203,0)	77,8 (56,8-201,8)	598,6 (112,0-947,8)
	индуцированная induced	9296,4 (5474,6-11015,0)**	5829,4 (3625,4-7105,4)	4863 (3001-8367)
IL-10, пг/мл IL-10, pg/mL	спонтанная spontaneous	8,5 (3,7-29,1)	1,9 (0,94-6,40)	17,9 (2,1-22,6)
	индуцированная induced	38,8 (22,7-87,8)**	19,1 (12,7-34,8)	55,8 (40,9-94,5)

Примечание.* – p < 0,05 различия с группой III; ** – p < 0,05 различия с группой II.

Note. *, p < 0.05 differences with group III; **, p < 0.05 differences with group II.

зрелых функциональных возможностей клеток иммунной системы.

Обсуждение

Подобно инфекции, вакцины приводят к ранней выработке сывороточных IgA, IgM и IgG антител, а также индуцируют долговременные ответы В- и Т-клеток памяти [13, 23]. Установлено, что выявление более высоких титров антител коррелирует со снижением риска развития последующей симптоматической инфекции SARS-CoV-2. Другие иммунные механизмы также важны для предотвращения заражения SARS-CoV-2 и ограничения тяжести заболевания COVID-19, хотя их прямая корреляция с защитой в настоящее время менее определена. Как и в случае с инфекцией, защитный эффект иммунитета, вызванного вакциной, также поддерживается более

долгосрочными компонентами гуморального ответа, включая В-клетки памяти [22], индуцированные вакциной CD4⁺ и CD8⁺Т-клетки остаются относительно стабильными до 6-8 месяцев после вакцинации [6]. Наши данные свидетельствуют о формировании пула вирус-специфических Th1-клеток памяти на повторный контакт с антигеном (S белок) у переболевших и вакцинированных COVID-19, что согласуется с литературными данными [10, 17].

Несмотря на то, что инфекция, как и вакцинация, вызывают устойчивые врожденные и адаптивные иммунные реакции, в результате проведенного исследования установлен ряд качественных различий в изменении оцениваемых показателей. Наиболее выраженный клеточный иммунный ответ выявлен у лиц, перенесших в анамнезе COVID-19, так через месяц после перенесенного заболевания в более чем 60% случаев

регистровали увеличение количества CD4⁺T-хелперов памяти и CD4⁺IFN γ ⁺T-лимфоцитов, а также повышение функционального резерва клеток по продукции TNF α , IL-8, IL-10. Повышение уровня IL-4 может являться косвенным показателем активации гуморального ответа, и, следовательно, нарастания титров антител к SARS-CoV-2, так как известно, что у большинства реконвалесцентов с тяжелым течением COVID-19 титры специфических антител, включая вируснейтрализующие антитела остаются высокими в течение длительного времени (до 1 года) [13]. Кроме того, полученные данные согласуются с ранее установленным фактом выраженного усиления интерферонового ответа у пациентов с COVID-19, который в значительной степени ниже у привитых мРНК-вакциной [18]. Следовательно, повышенная передача сигналов интерферона, вероятно, способствует резкой активации цитотоксических генов в периферических Т-клетках и врожденных лимфоцитах у больных, перенесших COVID-19, но не у иммунизированных лиц. Хотя в нашем случае у привитых пептидной вакциной добровольцев через месяц после вакцинации в общем пуле Т-лимфоцитов памяти преобладали, по-видимому, CD8⁺T-

клетки памяти (CD45⁺CD8⁺CD45RA⁻CD45RO⁺). В пользу данного предположения свидетельствует увеличение относительного содержания цитотоксических Т-клеток (CD45⁺CD3⁺CD8⁺) у вакцинированных лиц. Накопленный опыт анализа репертуара рецепторов В- и Т-клеток свидетельствует, что, хотя большинство клональных В- и Т-клеток у пациентов с COVID-19 является эффекторными клетками, у вакцинированных лиц клональный репертуар клеток представлен в значительной степени циркулирующими клетками памяти [12].

Заключение

Полученные данные дополняют имеющиеся в литературе сведения относительно формирования реакций клеточного иммунного ответа на SARS-CoV-2, формирующегося в результате перенесенного заболевания или проведения мероприятий по специфической профилактике COVID-19. Дальнейший поиск клеточных коррелятов защиты от новой коронавирусной инфекции позволит пересмотреть текущую стратегию вакцинации и выработать оптимальный подход к профилактике COVID-19.

Список литературы / References

1. Временные методические рекомендации «Профилактика, диагностика и лечение новой коронавирусной инфекции (COVID-19)». Версия 11 (07.05.2021). 224 с. [Interim guidelines "Prevention, diagnosis and treatment of new coronavirus infection (COVID-19)". Version 11 (05/07/2021). 224 p. (In Russ.)]
2. Клюева С.Н., Бугоркова С.А., Гончарова А.Ю., Кравцов А.Л., Кудрявцева О.М., Санджиев Д.Н., Коношова С.В., Савченко С.П., Хасыкова Б.А., Агапов Б.Л., Щербаклова С.А. Комплексный анализ корреляционных взаимосвязей между показателями гуморального и клеточного иммунитета у лиц, вакцинированных против чумы // Инфекция и иммунитет, 2019. Т. 9, № 1. С. 135-146. [Klyueva S.N., Bugorkova S.A., Goncharova A.Yu., Kravtsov A.L., Sandzhiyev D.N., Konusheva S.V., Savchenko S.P., Khasykova B.A., Agapov B.L., Shcherbakova S.A. Complex analysis of correlation interrelations between indicators of humoral and cellular immunity in persons vaccinated against plague. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2019, Vol. 9, no. 1, pp. 135-146. (In Russ.)] doi: 10.15789/2220-7619-2019-1-135-146.
3. Кравцов А.Л., Бугоркова С.А., Клюева С.Н., Гончарова А.Ю., Кожевников В.А., Чумачкова Е.А., Портенко С.А., Щербаклова С.А. Оценка интенсивности дегрануляции и изменений фенотипа нейтрофилов по уровню экспрессии Fc γ RIIIb в крови больных COVID-19 и реконвалесцентов // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии, 2022. Т. 99, № 2. С. 172-184. [Kravtsov A.L., Bugorkova S.A., Klyueva S.N., Goncharova A.Yu., Kozhevnikov V.A., Chumachkova E.A., Portenko S.A., Shcherbakova S.A. Assessment of neutrophil degranulation intensity and changes in neutrophil phenotype by Fc γ RIIIb expression level in blood of patients with COVID-19 and convalescents. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*, 2022, Vol. 99, no. 2, pp. 172-184. (In Russ.)]
4. Намазова-Баранова Л.С., Федосеев М.В., Шахтахтинская Ф.Ч., Калужная Т.А., Солошенко М.А., Толстова С.В., Сельвян А.М., Привалова Т.Е., Тимошкова С.Д., Мельникова А.А., Горелов А.В., Плоскирева А.А., Мустафина И.З., Мелехина Е.В., Усенко Д.В., Понежева Ж.Б., Омарова Х.Г. Эффективность и безопасность иммунизации пептидной вакциной для профилактики инфекции, вызванной SARS-CoV-2: проспективное исследование среди медицинских работников // Вопросы современной педиатрии, 2022, Т. 21, № 2. С. 83-94. [Namazova-Baranova L.S., Fedoseenko M.V., Shakhtakhtinskaya F.C., Kaliuzhnaia T.A., Soloshenko M.A., Tolstova S.V., Selvyan A.M., Privalova T.E., Timoshkova S.D., Melnikova A.A., Gorelov A.V., Ploskireva A.A., Mustafina I.Z., Melekhina E.V., Usenko D.V., Ponezheva Z.B., Omarova K.G. Efficacy and Safety of Peptide Vaccine in Prevention of SARS-CoV-2 Infection: Prospective Study among Healthcare Professionals. *Voprosy sovremennoy pediatrii = Current Pediatrics*, 2022, Vol. 21, no. 2, pp. 83-94. (In Russ.)]

5. Сизякина Л.П., Андреева И.И., Харитоновна М.В., Зайцева Н.С., Любимов Д.С., Закурская В.Я., Тотолян Арег А. Механизмы формирования гибридного иммунитета у лиц, переболевших COVID-19 и вакцинированных пептидными антигенами SARS-CoV-2 // Медицинская иммунология, 2022. Т. 24, № 3. С. 629-640. [Sizyakina L.P., Andreeva I.I., Kharitonova M.V., Zaitseva N.S., Lyubimov D.S., Zakurskaya V.Ya., Totolian Areg A. Mechanisms of formation of hybrid immunity in people who recovered from COVID-19 and were vaccinated with SARS-CoV-2 peptide antigens. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2022, Vol. 24, no. 3, pp. 629-640. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-MOF-2490.
6. Barouch, D.H., Stephenson K.E., Sadoff J., Yu J., Chang A., Gebre M., McMahan K., Liu J., Chandrashekar A., Patel S., Gars M.L., de Groot A.M., Heerwegh D., Struyf F., Douoguih M., van Hoof J., Schuitemaker H. Durable humoral and cellular immune responses 8 months after Ad26.COV2.S Vaccination. *N. Engl. J. Med.*, 2021, Vol. 385, no. 10, pp. 951-953.
7. Dan J.M., Mateus J., Kato Y., Hastie K.M., Yu E.D., Faliti C.E., Grifoni A., Ramirez S.I., Haupt S., Frazier A., Nakao C., Rayaprolu V., Rawlings S.A., Peters B., Krammer F., Simon V., Saphire E.O., Smith D.M., Weiskopf D., Sette A., Crotty S. Immunological memory to SARS-CoV-2 assessed for up to 8 months after infection. *Science*, 2021, Vol. 371, no. 6529, eabf4063. doi: 10.1126/science.abf4063.
8. Frenck R.W., Klein N.P., Kitchin N., Gurtman A., Absalon J., Lockhart S., Perez J.L., Walter E.B., Senders S., Bailey R., Swanson K.A., Ma H., Xu X., Koury K., Kalina W.V., Cooper D., Jennings T., Brandon D.M., Thomas S.J., Türeci Ö., Tresnan D.B., Mather S., Dormitzer P.R., Şahin U., Jansen K.U., Grube W.C. Safety, immunogenicity, and efficacy of the BNT162b2 Covid-19 vaccine in adolescents. *N. Engl. J. Med.*, 2021, Vol. 385, no. 3, pp. 239-250.
9. Gilbert P.B., Montefiori D.C., McDermott A., Fong Y., Benkeser D., Deng W., Zhou H., Houchens C.R., Martins K., Jayashankar L., Castellino F., Flach B., Lin B.C., O'Connell S., McDanal C., Eaton A., Sarzotti-Kelsoe M., Lu Y., Yu C., Borate B., van der Laan L.W.P., Hejazi N., Huynh C., Miller J., Sahly H.M.E., Baden L.R., Baron M., De la Cruz L., Gay C., Kalams S., Kelley C.F., Kutner M., Andrasik M.P., Kublin J.G., Corey L., Neuzil K.M., Carpp L.N., Pajon R., Follmann D., Donis R.O., Koup R.A. Immune correlates analysis of the mRNA-1273 COVID-19 vaccine efficacy trial. *Science*, 2022, Vol. 375, no. 6576, pp. 43-50.
10. Guerrero G., Picozza M., D'Orso S., Placido R., Pirronello M., Verdiani A., Termine A., Fabrizio C., Giannessi F., Sambucci M., Balice M.P., Caltagirone C., Salvia A., Rossini A., Battistini L., Borsellino G. BNT162b2 vaccination induces durable SARS-CoV-2-specific T cells with a stem cell memory phenotype. *Sci. Immunol.*, 2021, Vol. 6, no. 66, eabl5344. doi: 10.1126/sciimmunol.abl5344.
11. Heitmann J.S., Bilich T., Tandler C., Nelde A., Maringer Y., Marconato M., Reusch J., Jäger S., Denk M., Richter M., Anton L., Weber L.M., Roerden M., Bauer J., Rieth J., Wacker M., Hörber S., Peter A., Meisner C., Fischer I., Löffler M.W., Karbach J., Jäger E., Klein R., Rammensee H.-G., Salih H.R., Walz J.S. A COVID-19 peptide vaccine for the induction of SARS-CoV-2 T cell immunity. *Nature*, 2022, Vol. 601, pp. 617-622.
12. Ivanova E.N., Devlin J.C., Buus T.B., Koide A., Cornelius A., Samanovic M.I., Herrera A., Mimitou E.P., Zhang C., Desvignes L., Odum N., Smibert P., Ulrich R., Mulligan M.J., Koide S., Ruggles K.V., Herati R.S., Koralov S.B. Discrete Immune Response Signature to SARS-CoV-2 mRNA Vaccination Versus Infection. *medRxiv*, 2021. doi:10.1101/2021.04.20.21255677.
13. Kamińska D., Deborska-Materkowska D., Kościńska-Kasprzak K., Mazanowska O., Remiorz A., Poznański P., Durlik M., Krajewska M. Immunity after COVID-19 recovery and vaccination: similarities and differences. *Vaccines*, 2022, Vol. 10, 1068. doi: 10.3390/vaccines10071068.
14. McMahan K., Yu J., Mercado N.B., Loos C., Tostanoski L.H., Chandrashekar A., Liu J., Peter L., Atyeo C., Zhu A., Bondzie E.A., Dagotto G., Gebre M.S., Jacob-Dolan C., Li Z., Nampanya F., Patel S., Pessaint L., van Ry A., Blade K., Yalley-Ogunro J., Cabus M., Brown R., Cook A., Teow E., Andersen H., Lewis M.G., Lauffenburger D.A., Alter G., Barouch D.H. Correlates of protection against SARS-CoV-2 in rhesus macaques. *Nature*, 2021, Vol. 590, no. 7847, pp. 630-634.
15. Moss P. The T cell immune response against SARS-CoV-2. *Nat. Immunol.*, 2022. Vol. 23, pp. 186-193.
16. Mudd P.A., Minervina A.A., Pogorelyy M.V., Turner J.S., Kim W., Kalaidina E., Petersen J., Schmitz A.J., Lei T., Haile A., Kirk A.M., Mettelman R.C., Crawford J.C., Nguyen T.H.O., Rowntree L.C., Rosati E., Richards K.A., Sant A.J., Klebert M.K., Suessen T., Middleton W.D., Wolf J., Teefey S.A., O'Halloran J.A., Presti R.M., Kedzierska K., Rossjohn J., Thomas P.G., Ellebedy A.H. SARS-CoV-2 mRNA vaccination elicits a robust and persistent T follicular helper cell response in humans. *Cell*, 2022, Vol. 185, no. 4, pp. 603-613.e15.
17. Neidleman J., Luo X., Frouard J., Xie G., Gill G., Stein E.S., McGregor M., Ma T., George A.F., Kusters A., Greene W.C., Vasquez J., Ghosn E., Lee S., Roan N.R. SARS-CoV-2-specific T cells exhibit phenotypic features of helper function, lack of terminal differentiation, and high proliferation potential. *Cell Rep. Med.*, 2020, Vol. 1, no. 6, 100081. doi: 10.1016/j.xcrm.2020.100081.
18. Qi F., Cao Y., Zhang S., Zhang Z. Single-cell analysis of the adaptive immune response to SARS-CoV-2 infection and vaccination. *Front. Immunol.*, 2022, Vol. 13, 964976. doi: 10.3389/fimmu.2022.964976.
19. Reinscheid M., Luxenburger H., Karl V., Graeser A., Giese S., Ciminski K., Reeg D.B., Oberhardt V., Roehlen N., Lang-Meli J., Heim K., Gross N., Baum C., Rieg S., Speer C., Emmerich F., Breisinger S., Steinmann D., Bengsch B., Boettler T., Kochs G., Schwemmler M., Thimme R., Neumann-Haefelin C., Hofmann M. COVID-19 mRNA booster vaccine induces transient CD8⁺ T effector cell responses while conserving the memory pool for subsequent reactivation. *Nat. Commun.*, 2022, Vol. 13, 4631. doi: 10.1038/s41467-022-32324-x.

20. Rydyznski Moderbacher C., Ramirez S.I., Dan J.M., Grifoni A., Hastie K.M., Weiskopf D., Belanger S., Abbott R.K., Kim C., Choi J., Kato Y., Crotty E.G., Kim C., Rawlings S.A., Mateus J., Tse L.P.V., Frazier A., Baric R., Peters B., Greenbaum J., Saphire E.O., Smith D.M., Sette A., Crotty S. Antigen-specific adaptive immunity to SARS-CoV-2 in acute COVID-19 and associations with age and disease severity. *Cell*, 2020, Vol. 183, no. 4, pp. 996-1012. e19.

21. Statement on the fourteenth meeting of the International Health Regulations (2005) Emergency Committee regarding the coronavirus disease (COVID-19) pandemic [Electronic resource]: WHO. Available at: <http://www.who.int> (Date of the application February 21, 2023).

22. Thomas S.J., Moreira E.D. Jr, Kitchin N., Absalon J., Gurtman A., Lockhart S., Perez J.L., Pérez M.G., Polack F.P., Zerbini C., Bailey R., Swanson K.A., Xu X., Roychoudhury S., Koury K., Bouguermouh S., Kalina W.V., Cooper D., Frenck R.W. Jr, Hammitt L.L., Türeci Ö., Nell H., Schaefer A., Ünal S., Yang Q., Liberator P., Tresnan D.B., Mather S., Dormitzer P.R., Şahin U., Gruber W.C., Jansen K.U.; C4591001 Clinical Trial Group. Safety and efficacy of the BNT162b2 mRNA Covid-19 vaccine through 6 Months. *N. Engl. J. Med.*, 2021, Vol. 385, no. 19, pp.1761-1773.

23. Wang Z., Schmidt F., Weisblum Y., Muecksch F., Barnes C.O., Finkin S., Schaefer-Babajew D., Cipolla M., Gaebler C., Lieberman J.A., Oliveira T.Y., Yang Z., Abernathy M.E., Huey-Tubman K.E., Hurley A., Turroja M., West K.A., Gordon K., Millard K.G., Ramos V., Da Silva J., Xu J., Colbert R.A., Patel R., Dizon J., Unson-O'Brien C., Shimeliovich I., Gazumyan A., Caskey M., Bjorkman P.J., Casellas R., Hatzioannou T., Bieniasz P.D., Nussenzweig M.C. mRNA vaccine-elicited antibodies to SARS-CoV-2 and circulating variants. *Nature*, 2021, Vol. 592, no. 7855, pp. 616-622.

24. Weekly epidemiological update on COVID-19 – 15 February 2023 [Electronic resource]: WHO. Available at: <https://www.who.int/publications/m/item/weekly-epidemiological-update-on-covid-1> (Date of the application February 21, 2023).

25. Yang L.-T., Peng H., Zhua Z.-L., Li G., Huang Z.-T., Zhao Z.-X., Koup R.A., Bailer R.T., Wu C.-Y. Long-lived effector/central memory T-cell responses to severe acute respiratory syndrome coronavirus (SARS-CoV) S antigen in recovered SARS patients. *Clin. Immunol.*, 2006, Vol. 120, pp. 171-178.

Авторы:

Клюева С.Н. – к.б.н., научный сотрудник отдела иммунологии ФКУН «Российский противочумный институт “Микроб” Роспотребнадзора», г. Саратов, Россия

Бугоркова С.А. – д.м.н., и. о. заведующего отделом иммунологии ФКУН «Российский противочумный институт “Микроб” Роспотребнадзора», г. Саратов, Россия

Кравцов А.Л. – д.б.н., ведущий научный сотрудник отдела иммунологии ФКУН «Российский противочумный институт “Микроб” Роспотребнадзора», г. Саратов, Россия

Каштанова Т.Н. – младший научный сотрудник отдела иммунологии ФКУН «Российский противочумный институт “Микроб” Роспотребнадзора», г. Саратов, Россия

Кожевников В.А. – младший научный сотрудник отдела иммунологии ФКУН «Российский противочумный институт “Микроб” Роспотребнадзора», г. Саратов, Россия

Authors:

Klyueva S.N., PhD (Biology), Research Associate, Department of Immunology, Russian Anti-Plague Institute “Microbe”, Saratov, Russian Federation

Bugorkova S.A., PhD, MD (Medicine), Head, Department of Immunology, Russian Anti-Plague Institute “Microbe”, Saratov, Russian Federation

Kravtsov A.L., PhD, MD (Biology), Leading Research Associate, Department of Immunology, Russian Anti-Plague Institute “Microbe”, Saratov, Russian Federation

Kashtanova T.N., Junior Research Associate, Department of Immunology, Russian Anti-Plague Institute “Microbe”, Saratov, Russian Federation

Kozhevnikov V.A., Junior Research Associate, Department of Immunology, Russian Anti-Plague Institute “Microbe”, Saratov, Russian Federation

КОРРЕКЦИЯ ИММУННОГО СТАТУСА У ГОСПИТАЛИЗИРОВАННЫХ ПАЦИЕНТОВ С COVID-19 ИММУНОТРОПНЫМ ПРЕПАРАТОМ НА ФОНЕ БАЗИСНОЙ ТЕРАПИИ

Хромова Е.А.¹, Костинов М.П.^{1,2}, Сходова С.А.¹, Осипцов В.Н.³,
Бишева И.В.¹, Пахомов Д.В.¹, Курбатова Е.А.¹, Хасанова А.А.⁴,
Крюкова Н.О.⁵, Шатохин М.Н.⁶

¹ ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова», Москва, Россия

² ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Министерства здравоохранения РФ (Сеченовский университет), Москва, Россия

³ ФГКУЗ «Главный военный клинический госпиталь войск национальной гвардии Российской Федерации», г. Балашиха, Россия

⁴ ФГБОУ ВО «Ульяновский государственный университет», г. Ульяновск, Россия

⁵ ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

⁶ ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования», Москва, Россия

Резюме. Клеточный иммунитет играет важную роль в контроле над SARS-CoV-2. Лимфопения и снижение функциональной активности клеток может быть одной из основных причин ухудшения клинических исходов заболевания у пациентов. Применение бактериальной терапевтической вакцины «Иммуновак-ВП-4» в фазе активного воспаления может иметь перспективное значение для иммуномодуляции клеточного звена иммунитета. Целью исследования явилось изучение динамики субпопуляционной структуры лимфоцитов у госпитализированных пациентов с COVID-19 при комбинации базисной терапии с иммунотропным препаратом из антигенов условно-патогенных бактерий. В исследование вошли 45 пациентов (18-70 лет), находившиеся в стационаре с подтвержденным диагнозом «коронавирусная инфекция, вызванная вирусом COVID-19», среднетяжелой/тяжелой степени тяжести. Из них 33 человека дополнительно к базисной терапии получали препарат «Иммуновак-ВП-4» комбинированным назально-пероральным методом. Субпопуляционную структуру лимфоцитов периферической крови у пациентов в динамике (исходно, на 14-й и 30-й день после госпитализации) исследовали методом проточной цитофлуориметрии на приборе FC-500 (Beckman

Адрес для переписки:

Хромова Екатерина Александровна
ФГБНУ «Научно-исследовательский институт
вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова»
105064, Россия, Москва, Малый Казенный пер., 5а.
Тел: +7 (495) 917-41-49.
E-mail: kate.khromova@mail.ru

Address for correspondence:

Ekaterina A. Khromova
I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera
5a Maly Kazenny Lane
Moscow
105064 Russian Federation
Phone: +7 (495) 917-41-49.
E-mail: kate.khromova@mail.ru

Образец цитирования:

Е.А. Хромова, М.П. Костинов, С.А. Сходова,
В.Н. Осипцов, И.В. Бишева, Д.В. Пахомов,
Е.А. Курбатова, А.А. Хасанова, Н.О. Крюкова,
М.Н. Шатохин «Коррекция иммунного статуса
у госпитализированных пациентов с COVID-19
иммунотропным препаратом на фоне базисной
терапии» // Медицинская иммунология, 2024. Т. 26,
№ 2. С. 355-366.
doi: 10.15789/1563-0625-COI-2852

doi: 10.15789/1563-0625-COI-2852

© Хромова Е.А. и соавт., 2024

Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

E.A. Khromova, M.P. Kostinov, S.A. Skhodova,
V.N. Osiptsov, I.V. Bisheva, D.V. Pachomov, E.A. Kurbatova,
A.A. Khasanova, N.O. Kryukova, M.N. Shatokhin "Correction
of immune status from hospitalized COVID-19-patients with
immunotropic drug added to the basic treatment", *Medical
Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2024,
Vol. 26, no. 2, pp. 355-366.
doi: 10.15789/1563-0625-COI-2852

© Khromova E.A. et al., 2024

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

DOI: 10.15789/1563-0625-COI-2852

Coulter, США) с использованием моноклональных антител (мАТ) (Immunotech, Франция). В группе получавших только стандартную терапию относительно исходных параметров при поступлении отмечалось нарастание количества Т-лимфоцитов (на 14-й день – 79,9 (75,5-81,6)) ($p = 0,00252$), на 30-й день от начала лечения 78,4 (74,25-79,2) ($p = 0,03662$) и снижение В-лимфоцитов (на 14-й день – 10,6 (7,78-11,63) ($p = 0,03236$), на 30-й день – 7,85 (6,25-11,1) ($p = 0,01352$)). В группе «Иммуновак-ВП-4» выявлены более выраженные изменения показателей клеточного звена иммунитета относительно исходных параметров при поступлении – рост численности Т-лимфоцитов (на 14-й (80,1 (73,8-84,2)) ($p = 0,00018$) и 30-й день от начала лечения (80,2 (76-81,9)), Т-хелперов (через 14-й дней после лечения (50,2 (43-57)) ($p = 0,00694$)), цитотоксических Т-клеток (на 30-й день терапии 26,35 (24-29,4) ($p = 0,0114$)), снижение В-лимфоцитов (на 14-й день – 13,1 (8,2-16,9) ($p = 0,00158$), на 30-й день от начала лечения – 8,2 (7,6-9,7) $p < 0,00001$) и транзиторное снижение НК-клеток на 14-й день (3,7 (2,1-6,3) ($p = 0,00308$) с их восстановлением на 30-й день наблюдения 8,6 (6-12,5). Показатели 14-го и 30-го дня достоверно различались между собой ($p = 0,00022$)). Модуляция клеточного иммунитета может иметь важное значение для элиминации вируса.

Ключевые слова: клеточный иммунитет, COVID-19, бактериальная терапевтическая вакцина, иммунный статус, лимфопения, иммуномодулятор

CORRECTION OF IMMUNE STATUS FROM HOSPITALIZED COVID-19-PATIENTS WITH IMMUNOTROPIC DRUG ADDED TO THE BASIC TREATMENT

Khromova E.A.^a, Kostinov M.P.^{a, b}, Skhodova S.A.^a, Osiptsov V.N.^c,
Bisheva I.V.^a, Pachomov D.V.^a, Kurbatova E.A.^a, Khasanova A.A.^d,
Kryukova N.O.^e, Shatokhin M.N.^f

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

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

^c Main Military Clinical Hospital of the Russian National Guard, Balashikha, Russian Federation

^d Ulyanovsk State University, Ulyanovsk, Russian Federation

^e N. Pirogov Russian National Medical University, Moscow, Russian Federation

^f Russian Medical Academy of Continuous Professional Education, Moscow, Russian Federation

Abstract. Cellular immunity plays an important role in the control of SARS-CoV-2. Lymphopenia and a decrease in the functional activity of cells may be among the main reasons for deterioration of clinical outcomes of the disease. Usage of the bacterial therapeutic vaccine Immunovac-VP-4 during the inflammation phase may be promising for immunomodulation of the cellular immunity. The aim of our study was to evaluate the dynamics of lymphocyte subpopulations in hospitalized patients with COVID-19 upon combining the basic therapy with immunotropic drug based on the antigens from opportunistic pathogens. The study included 45 patients (18-70 years old) admitted with a confirmed diagnosis of moderate/severe infection caused by the COVID-19 virus. In addition to basic therapy, 33 persons of this group received Immunovac-VP-4 by a combined nasal-oral method. Subpopulation activity of peripheral blood lymphocytes in patients over time (at baseline, on the 14th and 30th day after hospitalization) was studied by flow cytometry by means of FC-500 Cytomics (Beckman Coulter, USA) using monoclonal antibodies (mAb) (Immunotech, France). In the group receiving only standard therapy, an increased number of T lymphocytes was detected on day 14 (79.9 (75.5-81.6), $p = 0.00252$), on day 30 from the start of treatment (78.4 (74.25-79.2), $p = 0.03662$), and a decrease in B lymphocytes on day 14 (10.6 (7.78-11.63), $p = 0.03236$), on day 30 (7.85 (6.25-11.1), $p = 0.01352$) relative to baseline parameters upon admission. We revealed more pronounced changes in the parameters of cellular immunity relative to the initial parameters, i.e., an increased proportion of T lymphocytes on the 14th day (80.1 (73.8-84.2), $p = 0.00018$), and 30th day from starting the treatment (80.2 (76-81.9)), T helpers at 14 days after treatment (50.2 (43-57), $p = 0.00694$), cytotoxic T cells by 30th day of therapy (26.35 (24-29.4), $p = 0.0114$), decrease in B lymphocytes on day 14 (13.1 (8.2-16.9), $p = 0.00158$), on the 30th day from the start of treatment (8.2 (7.6-9.7), $p < 0.00001$), and a transient decrease in NK cells on the 14th day (3.7 (2.1-6.3), $p = 0.00308$), with their recovery on the 30th day of observation to 8.6 (6-12.5) in the Immunovac-VP-4 group. Modulation of cellular immunity may be important for the virus clearance.

Keywords: cellular immunity, COVID-19, bacterial therapeutic vaccine, immune status, lymphopenia, immunomodulator

Введение

Накопленные до настоящего времени знания о патогенезе COVID-19 не оставляют сомнений, что тяжесть течения этого заболевания определяется состоянием иммунной системы организма [23, 34, 39, 59].

Для большинства пациентов с COVID-19 характерно легкое течение заболевания (нетяжелые симптомы с минимальными неспецифическими проявлениями) или средней степени тяжести, однако в 5-10% случаев отмечают тяжелое и крайне тяжелое течение заболевания с диффузным поражением легочной ткани, приводящим к формированию острой дыхательной и полиорганной недостаточности [1, 24, 27, 34, 54].

Также у некоторых пациентов процесс может перейти в хроническое системное воспаление низкой интенсивности, при этом не исключено проявления скрытых признаков аутоиммунного процесса [31].

Вероятность последнего процесса увеличивается с возрастом, особенно у лиц с метаболическим синдромом, сахарным диабетом 2 типа и некоторыми другими тяжелыми хроническими заболеваниями [19, 21, 28, 30, 33].

Величина исходной вирусной нагрузки [46], эффективность врожденного иммунного ответа, особенно опосредованного интерферонами типа I [16, 32], имеют важное значение для активации адаптивного иммунитета, что отражается на клиническом результате течения вирусной инфекции.

Эффективный клинический контроль первичной инфекции SARS-CoV-2 связан с ранним и сильным выбросом интерферонов и активным включением адаптивного иммунитета [14, 36, 44, 62].

Известно, что неблагоприятные клинические исходы заболевания характеризуются медленным снижением вирусной нагрузки, ранним и устойчивым воспалением с повышенным уровнем интерферонов (IFN α , IFN γ) и фактора некроза опухоли (TNF) [42].

Отсроченный, неадекватный и вялотекущий выброс интерферонов, по-видимому, связан с замедленной активацией дендритных клеток лимфоидного ряда и отсроченным вовлечением в иммунный процесс клеток адаптивного иммунитета [14, 36, 44, 58].

Накопленные к настоящему времени данные указывают, что клеточный иммунитет играет решающую роль в защите от SARS-CoV-2.

Выявлена связь сниженного содержания лимфоцитов крови с тяжестью заболевания [22, 44, 47, 57, 60].

Снижение содержания лимфоцитов и избыточное высвобождение цитокинов приводит к

воспалению и повреждению тканей у пациентов с коронавирусной инфекцией [49, 64].

В крови пациентов отмечают снижение абсолютного и относительного количества Т- и В-лимфоцитов [26, 32, 60].

Снижение содержания лимфоцитов также связано с истощением их функциональной активности [26, 65]. Выявлена обратная корреляционная связь с сывороточной концентрацией IL-6, IL-10, TNF [26, 32].

От слаженности работы иммунной системы зависит успех исхода коронавирусной инфекции. Применение иммуномодулирующих агентов в фазе активного воспаления, когда SARS-CoV-2 начинает системно распространяться, может иметь перспективное значение, регулируя иммунные реакции и направляя активацию иммунной системы в нужное русло.

Важное место в регуляции работы иммунной системы занимают терапевтические бактериальные вакцины, содержащие в своем составе антигены условно патогенных микроорганизмов. Терапевтические вакцины активируют врожденный и адаптивный иммунитет, индуцируя образование антител к бактериальным антигенам, входящим в их состав, обладая при этом выраженным иммуномодулирующим действием. Иммуномодулирующий эффект терапевтических бактериальных вакцин проявляется в усилении иммунного ответа при его недостаточности и подавлении иммунных реакций при их избыточности [5].

Российская бактериальная терапевтическая поликомпонентная вакцина «Иммуновак-ВП-4» содержит в своем составе патогенассоциированные образы (PAMPs – pathogen-associated-molecular-patterns), представленные липополисахаридом, пептидогликаном, тейхоевой кислотой и белками наружной мембраны четырех видов условно патогенных микроорганизмов (*Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus vulgaris*, *Escherichia coli*). При введении антигенов вакцины в организм человека происходит распознавание PAMPs сигнальными Toll-подобными рецепторами клеток системы врожденного иммунитета, что приводит к выработке провоспалительных цитокинов и запуску начальных этапов иммунного ответа. Показано, что «Иммуновак-ВП-4» активирует TLR1/2, TLR4, TLR5, TLR9 [4, 13], направляет дифференцировку Т-лимфоцитов по Th1-типу [9], восстанавливает фагоцитарную активность моноцитов и нейтрофилов крови [10], а также нормализует количество лимфоцитов с маркерами CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD72⁺, CD16⁺ [3, 6, 9]. Доказан высокий терапевтический эффект применения «Иммуновак-ВП-4» при различных инфекцион-

ных [2, 10, 12] и неинфекционных [3, 8] заболеваний человека.

Таким образом, целью настоящего исследования стало изучение динамики субпопуляционной структуры лимфоцитов у госпитализированных пациентов с COVID-19 при проведении иммунотерапии «Иммуновак-ВП-4» на фоне базисной терапии.

Материалы и методы

В группу исследования вошли 45 пациентов (18-70 лет), находившихся в стационаре с подтвержденным диагнозом «коронавирусная инфекция, вызванная вирусом SARS-CoV-2», протекающей в среднетяжелой/тяжелой степени тяжести. Пациенты соответствовали критериям включения и исключения.

Критерии включения: госпитализированные пациенты с подтвержденным диагнозом «коронавирусная инфекция, вызванная вирусом SARS-CoV-2» (мазок на РНК вируса SARS-CoV-2 из верхних дыхательных путей методом ПЦР и/или клинико-рентгенологически – наличие характерной клинической картины и характерных признаков вирусного поражения легких); температура тела в начале заболевания $> 38^{\circ}\text{C}$, изменения по данным КТ легких, типичные для вирусного поражения (КТ 2-й степени, объем поражения средней тяжести (25-50%); наличие датированного подписанного информированного согласия.

Критерии невключения: гнойные заболевания легких, декомпенсированных хронические заболевания, онкологические заболевания в стадии ремиссии менее 5 лет, ИДС, ВИЧ, гепатит В и С, пациенты, перенесшие трансфузию крови и СЗП, аутоиммунные заболевания соединительной ткани, беременность, лактация, наличие вакцинации против новой коронавирусной инфекции.

Больные получали базисную терапию согласно тяжести течения заболевания, указанной во «Временных методических рекомендациях – профилактика, диагностика и лечение новой коронавирусной инфекции (COVID-19)» в РФ: противовирусные, антикоагулянты, глюкокортикостероидные препараты, препараты ГИБП.

33 пациента получали помимо базисной терапии дополнительно иммуностимулирующий препарат бактериального происхождения – вакцина «Иммуновак-ВП-4» комбинированным способом – интраназально и *per os*.

Исследуемый препарат и схема его введения

Поликомпонентная вакцина «Иммуновак-ВП-4» имеет в своем составе антигены условно-патогенных микроорганизмов (смесь водорастворимых антигенов микробных клеток *S. aureus*,

K. pneumoniae, *P. vulgaris*, *E. coli*). Препарат разрешен к применению для подкожного введения (регистрационное удостоверение МЗ РФ номер ЛСР-001294/10 от 24.02.2010) и назально-перорального введения (ЛСР-001293/10 от 24.02.2010). Производство вакцины ФГУП «НПО «Микроген» (г. Уфа).

Препарат вводят по комбинированной схеме: интраназально по 1 мг (2 кап), затем внутрь (*per os*) по 20 мг (2 мл) с 1-го по 10-й день нахождения в стационаре.

Взятие биоматериала

У пациентов забор биоматериала (кровь в пробирку) осуществляли в 1-й день исследования до начала терапии, на 14-й день исследования перед выпиской из стационара и через 30 дней от начала терапии.

Имунофенотипирование лимфоцитов периферической крови у пациентов проводили методом проточной цитофлуориметрии (прибор FC-500 Beckman Coulter, США) с использованием моноклональных антител (МАТ) к CD3-FITC/CD8-PE, HLA-DR-FITC/CD8-PE, CD3-FITC/CD16/56-PE, CD3-FITC/CD20-PE, CD45-FITC/CD3-PE/CD4-PC5, CD45-FITC/CD3-PE/CD8-PC5, CD45-FITC/CD3-PE/HLA-DR-PC5, CD45-FITC/CD3-PE/CD25-ECD/CD4-PC5, CD45-FITC/CD3-PE/CD25ECD/CD4PC5/CD20-PC7, Foxp3-FITC/CD25-ECD/CD4-PC5 (Immunotech, Франция) в лицензированной лаборатории ФГБНУ «НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова».

Статистика

Анализ данных проведен с использованием пакета прикладных программ Statistica for Windows, ver. 7.0 (StatSoft, Inc). Для определения статистической значимости различий количественных признаков при межгрупповом сравнении и в динамике применяли U-критерий Манна–Уитни. Средние выборочные значения количественных признаков приведены в тексте в виде $Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})$, где Me – медиана, $Q_{0,25}$ – нижний квартиль, $Q_{0,75}$ – верхний квартиль. Во всех процедурах статистического анализа уровень значимости p принимался равным $< 0,05$.

Юридические и этические аспекты исследования

Протокол исследования утвержден 26 ноября 2020 г. локальным Этическим комитетом ФГБНУ «НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова» (Россия). Работу проводили в соответствии с Хельсинкской декларацией, Руководством Международного совета по гармонизации для надлежащей клинической практики и Российскими нормативными требованиями. Письменное ин-

формированное согласие получено от пациентов до зачисления их в исследование.

Результаты

Анализ проведенных исследований показал, что на момент поступления в стационар пациенты из обеих групп имели исходные показатели по численности Т-лимфоцитов (CD45/CD3⁺) в пределах нормальных значений (60-76) и не различались между собой статистически ($p = 0,5552$) (табл. 1).

В группе дополнительно получавших иммуномодулирующую терапию было выявлено нарастание процента Т-лимфоцитов на 14-й (80,1 (73,8-84,2)) ($p = 0,00018$) и 30-й день от начала лечения (80,2 (76-81,9)) ($p = 0,00001$) в сравнении исходными показателями (71,2 (61-76,6)).

В группе сравнения (базисная терапия) был также отмечен рост численности Т-лимфоцитов (CD45/CD3⁺) на 14-й день (79,9 (75,5-81,6)) ($p = 0,00252$) и на 30-й день от начала лечения (78,4 (74,25-79,2)) ($p = 0,03662$) в сравнении исходными параметрами (71,7 (67,85-71,7)).

В группе «Иммуновак-ВП-4» изначально % В-лимфоцитов был повышен, а в группе контроля в пределах нормальных значений (норма 11-16). Между группами достоверных различий не было ($p = 0,18684$).

Содержание В-клеток (CD45/CD20⁺) у пациентов из группы «Иммуновак-ВП-4» через 14 дней – 13,1 (8,2-16,9) и через 30 дней от начала лечения – 8,2 (7,6-9,7) уменьшалось относительно исходного их уровня 20,4 (12,5-24,3) ($p = 0,00158$; $p < 0,00001$, соответственно). Различия параметров 2-го и 3-го визитов между собой достоверны ($p = 0,01314$).

Снижение процента содержания В-лимфоцитов относительно исходных параметров отмечали и в группе контроля: на втором 10,6 (7,78-11,63) ($p = 0,03236$) и на третьем визите 7,85 (6,25-11,1) ($p = 0,01352$) относительно исходных параметров 14,1 (12,05-20,3).

Исходно в обеих группах выявлен нормальный процент (норма 38-46) содержания Т-хелперных клеток, различия между группами не достоверны ($p = 0,4777$).

Анализ выявил разницу распределения процента Т-хелперных клеток в группе «Иммуновак-ВП-4» через 14 дней после лечения (50,2 (43-57)) против исходных показателей 44,2 (37,9-49,8) ($p = 0,00694$).

При поступлении в обеих группах отмечалось снижение % содержания цитотоксических клеток (норма 31-40%), различий между группами не было ($p = 0,05876$).

В группе получавших препарат на основе бактериальных лигандов выявлены статистически значимые различия в проценте содержания цитотоксических клеток (CD45⁺CD3⁺CD8⁺) относительно исходных параметров 22,8 (17,8-26,4) на 30-й день терапии 26,35 (24-29,4) ($p = 0,0114$).

В группе контроля изначально показатель % НК-клеток был в пределах нормальных значений (10-19) и статистически выше параметров группы «Иммуновак-ВП-4» ($p = 0,0088$).

В группе получавших дополнительно иммуномодулирующий препарат отмечено снижение численности НК-клеток на втором визите 3,7 (2,1-6,3) ($p = 0,00308$) относительно исходных показателей 7,2 (4,5-15,1) с их восстановлением на 30-й день наблюдения 8,6 (6-12,5). Показатели 2-го и 3-го визитов достоверно различались между собой ($p = 0,00022$).

В группе контроля достоверных изменений в динамике показателей Т-хелперных, цитотоксических и НК-клеток выявлено не было.

Обсуждение

При нормальной работе иммунной системы альвеолярные макрофаги с помощью механизма опсонифагоцитоза распознают и элиминируют комплексы вирус-антитело, а также клетки, подвергшиеся апоптозу. Вирус-специфические Т-лимфоциты также поступают в очаг воспаления в самом начале инфекционного процесса, препятствуя диссеминации вируса в организме. В этом случае элиминация вируса происходит при минимальном повреждении легких, а воспалительный процесс ограничивается первой или второй фазой течения COVID-19 (легкая или средняя степень тяжести), завершаясь полным выздоровлением [52, 56].

При исходно нарушенном иммунном ответе коронавирусная инфекция быстро переходит в третью фазу, сопровождаясь «цитокиновым штормом». При этом клетки иммунной системы продолжают поступать в легкие, приводя к повреждению легочной ткани. Гиперпродукция провоспалительных цитокинов приводит к полиорганной недостаточности [39, 52, 56].

Для третьей фазы COVID-19 характерно снижение количества и функциональной активности Т-лимфоцитов, что является главной движущей силой большинства синдромов «цитокинового шторма» [17, 20, 24].

В литературе обсуждают несколько возможных причин снижения уровня и функциональной активности Т-лимфоцитов при коронавирусной инфекции. Наиболее вероятным сценарием является прямое инфицирование Т-лимфоцитов SARS-CoV-2, которое вызывает

ТАБЛИЦА 1. СУБПОПУЛЯЦИОННАЯ СТРУКТУРА ЛИМФОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ПАЦИЕНТОВ, ПОЛУЧАВШИХ СТАНДАРТНУЮ ТЕРАПИЮ + ИММУНОМОДУЛИРУЮЩИЙ ПРЕПАРАТ (ГРУППА «ИММУНОВАК-ВП-4») / ПАЦИЕНТОВ, ПОЛУЧАВШИХ СТАНДАРТНУЮ ТЕРАПИЮ (КОНТРОЛЬНАЯ ГРУППА) В ДИНАМИКЕ

TABLE 1. DISTRIBUTION PATTERN OF PERIPHERAL BLOOD LYMPHOCYTES SUBPOPULATIONS IN PATIENTS RECEIVING STANDARD THERAPY + IMMUNOMODULATORY DRUG (IMMUNOVAC-VP-4 GROUP) / PATIENTS RECEIVING STANDARD THERAPY (CONTROL GROUP) IN DYNAMYC

Субпопуляции лимфоцитов Lymphocyte subpopulations	Содержание клеток в группах сравнения, % Ме (Q _{0,25} -Q _{0,75}) % in comparison groups – Me (Q _{0,25} -Q _{0,75})					
	группа «Иммуновак-ВП-4» group Immunovac-VP-4			контрольная группа control group		
	1-й визит Visit 1 (n = 33)	2-й визит Visit 2 (n = 27)	3-й визит Visit 3 (n = 24)	1-й визит Visit 1 (n = 12)	2-й визит Visit 2 (n = 10)	3-й визит Visit 3 (n = 8)
Т-лимфоциты (CD45/CD3⁺) T lymphocytes (CD45/CD3 ⁺)	71,2 (61,0-76,5)	80,1* (73,8-84,2)	80,2* (76,0-81,9)	71,7 (66,7-74,2)	79,9* (75,5-81,6)	78,4* (74,2-79,2)
Т-хелперы (CD45/CD3/CD4⁺) Helper T cells (CD45/CD3/CD4 ⁺)	44,2 (37,9-49,9)	50,2* (43-57)	49,6 (43,6-52,9)	39,1 (34,1-48,2)	44,6 (39,1-51,7)	39,6 (35,0-44,9)
Цитотоксические Т-лимфоциты, CTL (CD45/CD3/CD8⁺) Cytotoxic T lymphocytes, CTL (CD45/CD3/CD8 ⁺)	22,8 (17,8-26,4)	24,2 (21,0-30,9)	26,3* (24,0-29,4)	27,5 (24,3-31,0)	30,9 (21,9-37,4)	33 (27,9-36,4)
Естественные киллеры, НК-клетки (CD3-CD16/56⁺) Natural killer cells, NK cells (CD3-CD16/56 ⁺)	7,2^ (4,5-15,1)	3,7* (2,1-6,3)	8,6* # (6,0-12,5)	14,6^ (10,3-18,2)	10,7 (9,2-12,1)	12,8 (7,7-17,3)
Естественные киллерные Т-лимфоциты, НКТ (CD3/CD16/56⁺) Natural killer T cells, NKT (CD3/CD16/56 ⁺)	0,7 (0,6-1,2)	0,9 (0,38-1,20)	0,7 (0,4-1,7)	1,4 (0,7-1,6)	2,1 (0,3-4,1)	1 (0,3-1,2)
В-клетки (CD45/CD20⁺) B lymphocytes (CD45/CD20 ⁺)	20,4 (12,5-24,3)	13,1* (8,2-16,9)	8,2* # (7,6-9,7)	14,1 (12,05-20,30)	10,6* (7,8-11,6)	7,8* (6,2-11,1)
ИРИ (CD4/CD8) Immunoregulatory index, IRI (CD4/CD8)	1,91 (1,40-2,46)	1,86 (1,52-2,35)	1,89 (1,50-2,21)	1,41 (1,10-1,94)	1,46 (1,05-2,67)	1,47 (1,0-1,6)

Примечание. Ме – медиана значений; Q_{0,25}-Q_{0,75} – нижний и верхний квартили; N – объем выборки; * – достоверные различия (p ≤ 0,05) с 1 визитом в своей группе; # – достоверные различия (p ≤ 0,05) с 2 визитом в своей группе; ^ – достоверные различия (p ≤ 0,05) между группой «Иммуновак-ВП-4» и контрольной группой.

Note. Me, median of values; Q_{0,25}-Q_{0,75}, lower and upper quartiles; N, sample size; *, significant differences (p ≤ 0.05) with 1 visit in their group; #, significant differences (p ≤ 0.05) with 2 visit in their group; ^, significant differences (p ≤ 0.05) between the Immunovac-VP-4 group and the control group.

цитопатический эффект, приводящий к апоптозу Т-лимфоцитов [55, 63].

Наряду с этим рассматривают вариант гиперпродукции провоспалительных цитокинов (TNF) инфицированными легочными макрофагами или эпителиальными клетками, которые приводят к апоптозу Т-клеток, блокируется их пролиферация (IL-10) и рециркуляция (IFN- γ) [26, 36, 43].

Еще один механизм развития лимфопении — подавление костномозгового кроветворения при «цитокиновом шторме» и секвестрация лимфоцитов в легких [14].

В нашем исследовании наблюдалось нарастание численности Т-клеток как в группе контроля (базисная терапия), так и в группе дополнительно получавших иммуномодулирующий препарат через 14 и 30 дней от начала наблюдения, что может характеризовать стабилизацию инфекционного процесса и отражать положительную динамику заболевания. И действительно, все пациенты, включенные в исследование, имели благоприятный исход.

Было отмечено снижение процента содержания В-лимфоцитов относительно исходных параметров как в группе контроля, так и в группе с добавлением в терапию препарата «Иммуновак-ВП-4». Это может отражать вовлеченность В-лимфоцитов в иммунный процесс, их истощение после активной продукции вируснейтрализующих антител.

Есть данные, что тяжелая инфекция SARS-CoV-2 связана с повышенным уровнем антител и ответом В-клеток памяти по сравнению с более легкой формой течения инфекции [25, 38, 41]. Это может быть объяснено тем фактом, что у тяжелобольных индивидуумов возникает сильный внефолликулярный В-клеточный ответ, который коррелирует с увеличением уровней провоспалительных цитокинов и титров нейтрализующих антител [61].

Процент Т-хелперных клеток в группе получавших препарат на основе бактериальных лигандов через 14 дней после лечения увеличился относительно исходных значений. Исходя из знаний о действии вакцины «Иммуновак-ВП-4», предполагается усиление программирование дифференцировки Т-лимфоцитов по Th1-типу, что можно расценивать как положительный эффект. Известно, что эффективный вирусный контроль связан с фенотипом CD4⁺ типа 1, а про-

филь типа 2 часто наблюдается у пациентов с тяжелым течением заболевания [21, 35, 45].

Известно, НК-клетки отвечают за непосредственное уничтожение инфицированных вирусом клеток посредством дегрануляции и через рецепторы апоптоза, а также они участвуют в регуляции врожденного и приобретенного иммунных ответов [15, 48].

Обратное развитие и разрешение воспалительного процесса также зависит от элиминации активированных лимфоцитов натуральными киллерными клетками [1].

В группе «Иммуновак-ВП-4» было отмечено транзитное снижение численности НК-клеток на 14-й день от начала исследования, что, вероятно, можно объяснить их ролью в нейтрализации вируса COVID-19 с восстановлением их процента к 30-му дню от начала исследования, достоверно не отличавшимся от исходных параметров.

Есть данные, что вакцина «Иммуновак-ВП-4» усиливает пролиферацию и цитотоксическое действие НК-клеток [7].

В группе с иммуномодулирующим препаратом было отмечено статистически значимое нарастание процента содержания цитотоксических клеток.

Состояние иммунодефицита у пациентов с COVID-19 возникает не только вследствие снижения количества лимфоцитов, а также из-за дефектов цитолитической функции натуральных киллерных клеток и цитотоксических Т-лимфоцитов, которые теряют способность уничтожать пораженные вирусом клетки-мишени [37, 40, 50, 51, 53].

Включение в терапию дополнительно иммуномодулирующего препарата может усилить не только количественный прирост численности цитотоксических и НК-клеток, но и их функциональную активность.

Заключение

В группе пациентов с включением в терапию иммуномодулирующего препарата выявлены более явные достоверные динамические изменения показателей клеточного иммунитета, а именно рост численности Т-лимфоцитов, Т-хелперов, цитотоксических Т-клеток, снижение В-лимфоцитов и транзитное снижение НК-клеток с восстановлением их количества к 30-му дню, что может иметь важное значение для элиминации вируса.

Список литературы / References

1. Алексеева Е.И., Тепаев Р.Ф., Шилькрот И.Ю., Дворяковская Т.М., Сурков А.Г., Криулин И.А. COVID-19-ассоциированный вторичный гемофагоцитарный лимфогистиоцитоз (синдром «цитокинового шторма») // Вестник Российской академии медицинских наук, 2021. Т. 76, № 1. С. 51-66. [Alexeeva E.I., Tepaev R.F., Shilkrot I.Y., Dvoryakovskaya T.M., Surkov A.G., Kriulin I.A. COVID-19-associated secondary

hemophagocytic lymphohistiocytosis (cytokine storm syndrome). *Vestnik Rossiyskoy akademii meditsinskikh nauk = Annals of the Russian Academy of Medical Sciences*, 2021, Vol. 76, no. 1, pp. 51-66. (In Russ.)]

2. Балаболкин И.И., Булгакова В.А., Краснопрошина Л.И., Курбатова Е.А. Опыт применения вакцины Иммуновак ВП-4 при бронхиальной астме у детей // Педиатрия им. Г.Н. Сперанского, 2007. Т.86, № 6. С. 86-89. [Balabolkin I.I., Bulgakova V.A., Krasnoproshina L.I., Kurbatova E.A. *Pediatriya im. G.N. Speranskogo = Pediatrics Journal n. a. G.N. Speransky*, 2007, Vol. 86, no.6, pp. 86-89. (In Russ.)]

3. Егорова Н.Б., Курбатова Е.А. Иммунотерапевтическая концепция использования микробных антигенов при атопии и патологии, ассоциированной с условно-патогенной микрофлорой (на примере поликомпонентной вакцины Иммуновак ВП-4) // Медицинская иммунология, 2008. Т. 10, № 1. С. 13-20. [Egorova N.B., Kurbatova E.A. An immunotherapeutic concept of microbial antigen application in atopy and disorders associated with facultative microflora, as exemplified by a polycomponent Immunovac VP4 vaccine. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2008, Vol. 10, no. 1, pp. 13-20. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2008-1-13-20.

4. Егорова Н.Б., Курбатова Е.А., Грубер И.М., Семенова И.Б., Михайлова И.А., Зверев В.В. Новый тип вакцин с комбинацией агонистов Toll-подобных рецепторов – TLRs 1/2, 4, 5/6, 9 // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии, 2011. Т. 4. С. 44-48. [Egorova N.B., Kurbatova E.A., Gruber I.M., Semenova I.B., Mikhailova N.A., Zverev V.V. Novel type of vaccine with a combination of toll like receptor agonists – TLR 1/2, 4, 5/6, 9. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*, 2011, Vol. 4, pp. 44-48. (In Russ.)]

5. Караулов А.В. Иммуномодуляция при респираторных инфекциях: от понимания целей и механизмов действия к клинической эффективности // Детские инфекции, 2012. Т. 3. С. 62-64. [Karaulov A.V. Immunomodulation at respiratory infections from understanding the objectives and mechanisms of action to clinical efficacy. *Detskie infektsii = Pediatric Infectious Disease Journal*, 2012, Vol. 40, no. 3, pp. 62-64. (In Russ.)]

6. Краснопрошина Л.И., Серова Т.А., Фошина Е.П., Бишева И.В., Сходова С.А. Особенности иммунного ответа при различных схемах применения бактериальной терапевтической вакцины «Иммуновак ВП-4» // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии, 2017. № 4. С. 23-30. [Krasnoproshina L.I., Serova T.A., Foshina E.P., Bisheva I.V., Skhodova S.A. Features of immune response during various schemes of use of bacterial therapeutic vaccine Immunovac VP-4. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*, 2017, Vol. 94, no. 4, pp. 23-30. (In Russ.)]

7. Лебединская О.В., Ахматова Н.К., Лебединская О.В., Черешнев В.А., Родионов С.Ю., Киселевский М.В. Влияние иммуномодуляторов «Иммуновак ВП-4» и «Профеталь» на функциональную активность мононуклеарных лейкоцитов // Медицинская иммунология, 2009. Т. 11. № 1. С. 15-20. [Lebedinskaya E.A., Akhmatova N.K., Lebedinskaya O.V., Chereshevnev V.A., Rodionov S.U., Kiselevsky M.V. Influence of immunomodulating agents immunovac VP-4 and profetal on functional activity of mononuclear leukocytes. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2009, Vol. 11, no. 1, pp. 15-20. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2009-1-15-20.

8. Немыкина О.Е., Егорова Н.Б., Щербакова Б.В., Курбатова Е.А., Семенова И.Б., Ефремова В.Н., Грубер И.М., Семенов Б.Ф. Иммунологические показатели при терапии атопического дерматита у детей поликомпонентной вакциной «Иммуновак ВП-4» // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии, 2005. Т. 5. С. 45-49. [Nemykina O.E., Egorova N.B., Shcherbakova B.V., Kurbatova E.A., Semenova I.B., Efremova V.N., Gruber I.M., Semenov B.F. Immunological indicators in the treatment of atopic dermatitis in children with a multicomponent vaccine Immunovac VP-4. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*, 2005, Vol. 5, pp. 45-49. (In Russ.)]

9. Осипова Г.Л. Поликомпонентная вакцина ВП-4 в терапии аллергических заболеваний // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии, 2003. № 1. С. 36-42. [Osipova G.L. Multicomponent vaccine VP-4 in the therapy of allergic *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*, 2003, no. 1, pp. 36-42. (In Russ.)]

10. Сорокина Е.В., Масюкова С.А., Курбатова Е.А., Егорова Н.Б. Терапевтическая бактериальная вакцина «Иммуновак» в комплексном лечении пациентов с хронической пиодермией // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии, 2010. Т. 4. С. 31-37. [Sorokina E.V., Masyukova S.A., Kurbatova E.A., Egorova N.B. Therapeutic bacterial vaccine Immunovac in a comprehensive examination of patients with chronic pyoderma. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*, 2010, Vol. 4, pp. 31-37. (In Russ.)]

11. Фошина Е.П., Серова Т.А., Бишева И.В., Слатинова О.В. Эффективность применения Иммуновак ВП-4 в отношении иммунологических показателей у часто и длительно болеющих детей // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии, 2019. Т. 1. С. 104-110. [Foshina E.P., Serova T.A., Bisheva I.B., Slatinova O.V. The effectiveness of Immunovac VP-4 for immunological parameters in frequently and long-term ill children. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*. 2019, Vol. 1, pp. 104-110. (In Russ.)]

12. Фошина Е.П., Слатинова О.В., Сходова С.А., Серова Т.А., Бишева И.В. Оценка влияния вакцины поликомпонентной Иммуновак-ВП-4 на системный иммунитет у детей с бронхолегочными заболеваниями // Российский аллергологический журнал, 2019. Т. 16, № 1-2. С. 204-206. [Foshina E.P., Slatinova O.V., Skhodova S.A., Serova T.A., Bisheva I.V. Evaluation of the study of the multicomponent vaccine Immunovac-VP-4 on systemic immunity in children with bronchopulmonary diseases. *Rossiyskiy allergologicheskiy zhurnal = Russian Allergology Journal*, 2019, Vol. 16, no. 1-2, pp. 204-206. (In Russ.)]
13. Akhmatova N.K., Egorova N.B., Kurbatova E.A., Akhmatov E.A. Activation of innate immunity by bacterial ligands of Toll-like receptors. *Front. Immunol.*, 2014, Vol. 5, 89. doi: 10.3389/fimmu.2014.00089.
14. Azkur A.K., Akdis M., Azkur D., Sokolowska M., van de Veen W., Brügggen M.C., O'Mahony L., Gao Y., Nadeau K., Akdis C.A. Immune response to SARS-CoV-2 and mechanisms of immunopathological changes in COVID-19. *Allergy*, 2020, Vol. 75, no. 7, pp. 1564-1581.
15. Björkstöm N.K., Strunz B., Ljunggren H.G. Natural killer cells in antiviral immunity. *Nat. Rev. Immunol.*, 2022, Vol. 22, no. 2, pp. 112-123.
16. Blanco-Melo D., Nilsson-Payant B.E., Liu W.C., Uhl S., Hoagland D., Møller R., Jordan T.X., Oishi K., Panis M., Sachs D., Wang T.T., Schwartz R.E., Lim J.K., Albrecht R.A., tenOever B.R. Imbalanced host response to SARS-CoV-2 drives development of COVID-19. *Cell*, 2020, Vol. 181, no.5, pp. 1036-1045.e9.
17. Bracaglia C., Prencipe G., de Benedetti F. Macrophage Activation Syndrome: different mechanisms leading to a one clinical syndrome. *Pediatr. Rheumatol. Online J.*, 2017, Vol. 15, 5. doi: 10.1186/s12969-016-0130-4.
18. Brooks D.G., Trifilo M.J., Edelmann K.H., Teyton L., McGavern D.B., Oldstone M.B.A. Interleukin-10 determines viral clearance or persistence *in vivo*. *Nat. Med.*, 2006, Vol. 12, pp. 1301-1309.
19. Carfi A., Bernabei R., Landi F. Persistent symptoms in patients after acute COVID19. *JAMA*, 2020, Vol. 324, pp. 603-605.
20. Carter S.J., Tattersall R.S., Ramanan A.V. Macrophage activation syndrome in adults: recent advances in pathophysiology, diagnosis and treatment. *Rheumatol. Oxf. Engl.*, 2019, Vol. 58, pp. 5-17.
21. Castro Dopico X., Ols S., Loré K., Karlsson Hedestam G.B. Immunity to SARS-CoV-2 induced by infection or vaccination. *J. Intern. Med.*, 2022, Vol. 291, no. 1, pp. 32-50.
22. Chen G., Wu D., Guo W., Cao Y., Huang D., Wang H., Wang T., Zhang X., Chen H., Yu H., Zhang X., Zhang M., Wu S., Song J., Chen T., Han M., Li S., Luo X., Zhao J., Ning Q. Clinical and immunological features of severe and moderate coronavirus disease 2019. *J. Clin. Invest.*, 2020, Vol. 130, no. 5, pp. 2620-2629.
23. Chen N., Zhou M., Dong X., Qu J., Gong F., Han Y., Qiu Y., Wang J., Liu Y., Wei Y., Xia J., Yu T., Zhang X., Zhang L. Epidemiological and clinical characteristics of 99 cases of 2019 novel coronavirus pneumonia in Wuhan, China: a descriptive study. *Lancet*, 2020, Vol. 395, pp. 507-513.
24. Crayne C.B., Albeituni S., Nichols K.E., Cron R.Q. The immunology of macrophage activation syndrome. *Front. Immunol.*, 2019, Vol. 10, 119. doi:10.3389/fimmu.2019.00119.
25. Dan J.M., Mateus J., Kato Y., Hastie K.M., Yu E.D., Faliti C.E., Grifoni A., Ramirez S.I., Haupt S., Frazier A., Nakao C., Rayaprolu V., Rawlings S.A., Peters B., Krammer F., Simon V., Saphire E.O., Smith D.M., Weiskopf D., Sette A., Crotty S. Immunological memory to SARS-CoV-2 assessed for up to 8 months after infection. *Science*, 2021, Vol. 371, no. 6529, eabf4063. doi: 10.1126/science.abf4063.
26. Diao B., Wang C., Tan Y., Chen X., Liu Y., Ning L., Chen L., Li M., Liu Y., Wang G., Yuan Z., Feng Z., Zhang Y., Wu Y., Chen Y. Reduction and functional exhaustion of T cells in patients with Coronavirus disease 2019 (COVID-19). *Front. Immunol.*, 2020, Vol. 11, 827. doi: 10.3389/fimmu.2020.00827.
27. Fu L., Wang B., Yuan T., Chen X., Ao Y., Fitzpatrick T., Li P., Zhou Y., Lin Y.F., Duan Q., Luo G., Fan S., Lu Y., Feng A., Zhan Y., Liang B., Cai W., Zhang L., Du X., Li L., Shu Y., Zou H. Clinical characteristics of coronavirus disease 2019 (COVID-19) in China: A systematic review and meta-analysis. *J. Infect.*, 2020, Vol. 80, pp. 656-665.
28. Garrigues E., Janvier P., Kherabi Y., Le Bot A., Hamon A., Gouze H., Doucet L., Berkani S., Olios E., Mallart E., Corre F., Zarrouk V., Moyer J.D., Galy A., Honsel V., Fantin B., Nguyen Y. Post-discharge persistent symptoms and health-related quality of life after hospitalization for COVID-19. *J. Infect.*, 2020, Vol. 81, pp. e4-e6.
29. Groff D., Sun A., Ssentongo A.E., Ba D.M., Parsons N., Poudel G.R., Lekoubou A., Oh J.S., Ericson J.E., Ssentongo P., Chinchilli V.M. The National COVID cohort collaborative: clinical characterization and early severity prediction. *JAMA Netw. Open*, 2021, Vol. 4, no. 7, e2116901. doi: 10.1001/jamanetworkopen.2021.
30. Gusev E., Sarapultsev A., Solomatina L., Chereshnev V. SARS-CoV-2-Specific immune response and the pathogenesis of COVID-19. *Int. J. Mol. Sci.*, 2022, Vol. 23, no. 3, 1716. doi: 10.3390/ijms23031716.
31. Gusev E., Sarapultsev A., Hu D., Chereshnev V. Problems of pathogenesis and pathogenetic therapy of COVID-19 from the perspective of the general theory of pathological systems (general pathological processes). *Int. J. Mol. Sci.*, 2021, Vol. 22, 7582. doi: 10.3390/ijms22147582.
32. Hadjadj J., Yatim N., Barnabei L., Corneau A., Boussier J., Smith N., Péré H., Charbit B., Bondet V., Chenevier-Gobeaux C., Breillat P., Carlier N., Gauzit R., Morbieu C., Pène F., Marin N., Roche N., Szwebel T.A., Merklings S.H., Treluyer J.M., Veyer D., Mouthon L., Blanc C., Tharaux P.L., Rozenberg F., Fischer A., Duffy D., Rieux-Laucat F.

Kernéis S., Terrier B. Impaired type I interferon activity and inflammatory responses in severe COVID-19 patients. *Science*, 2020, Vol. 369, no. 6504, pp. 718-724.

33. Halpin S.J., McIvor C., Whyatt G., Adams A., Harvey O., McLean L., Walshaw C., Kemp S., Corrado J., Singh R., Collins T., O'Connor R.J., Sivan M. Postdischarge symptoms and rehabilitation needs in survivors of COVID-19 infection: a cross-sectional evaluation. *J. Med. Virol.*, 2021, Vol. 93, pp. 1013-1022.

34. Huang C., Wang Y., Li X., Ren L., Zhao J., Hu Y., Zhang L., Fan G., Xu J., Gu X., Cheng Z., Yu T., Xia J., Wei Y., Wu W., Xie X., Yin W., Li H., Liu M., Xiao Y., Gao H., Guo L., Xie J., Wang G., Jiang R., Gao Z., Jin Q., Wang J., Cao B. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet*, 2020, Vol. 395, pp. 497-506.

35. Ibarrondo F.J., Fulcher J.A., Goodman-Meza D., Elliott J., Hofmann C., Hausner M.A., Ferbas K.G., Tobin N.H., Aldrovandi G.M., Yang O.O. Rapid decay of anti-SARS-CoV-2 antibodies in persons with mild COVID-19. *N. Engl. J. Med.*, 2020, Vol. 383, pp. 1085-1087.

36. Kamphuis E., Junt T., Waibler Z., Forster R., Kalinke U. Type I interferons directly regulate lymphocyte recirculation and cause transient blood lymphopenia. *Blood*, 2006, Vol. 108, no.10, pp. 3253-3261.

37. Kramer B., Knoll R., Bonaguro L., ToVinh M., Raabe J., Astaburuaga-Garcia R., Schulte-Schrepping J., Kaiser K.M., Rieke G.J., Bischoff J., Monin M.B., Hoffmeister C., Schlabe S., de Domenico E., Reusch N., Händler K., Reynolds G., Blüthgen N., Hack G., Finnemann C., Nischalke H.D., Strassburg C.P., Stephenson E., Su Y., Gardner L., Yuan D., Chen D., Goldman J., Rosenstiel P., Schmidt S.V., Latz E., Hrusovsky K., Ball A.J., Johnson J.M., Koenig P.A., Schmidt F.I., Haniffa M., Heath J.R., Kümmerer B.M., Keitel V., Jensen B., Stubbemann P., Kurth F., Sander L.E., Sawitzki B. Early IFN- α signatures and persistent dysfunction are distinguishing features of NK cells in severe COVID-19. *Immunity*, 2021, Vol. 54, pp. 2650-2569.e14.

38. Kuri-Cervantes L., Pampena M.B., Meng W., Rosenfeld A.M., Ittner C.A.G., Weisman A.R., Agyekum R.S., Mathew D., Baxter A.E., Vella L.A., Kuthuru O., Apostolidis S.A., Bershaw L., Dougherty J., Greenplate A.R., Pattekar A., Kim J., Han N., Gouma S., Weirick M.E., Arevalo C.P., Bolton M.J., Goodwin E.C., Anderson E.M., Hensley S.E., Jones T.K., Mangalmurti N.S., Luning Prak E.T., Wherry E.J., Meyer N.J., Betts M.R. Comprehensive mapping of immune perturbations associated with severe COVID-19. *Sci. Immunol.*, 2020, Vol. 5, no. 49, eabd7114. doi: 10.1126/sciimmunol.abd7114.

39. Li Q., Wang Y., Sun Q., Knopf J., Herrmann M., Lin L., Jiang J., Shao C., Li P., He X., Hua F., Niu Z., Ma C., Zhu Y., Ippolito G., Piacentini M., Estaquier J., Melino S., Weiss F.D., Andreano E., Latz E., Schultze J.L., Rappuoli R., Mantovani A., Mak T.W., Melino G., Shi Y. Immune response in COVID-19: what is next? *Cell Death Differ.*, 2022, Vol. 29, no. 6, pp. 1107-1122.

40. Liao M., Liu Y., Yuan J., Wen Y., Xu G., Zhao J., Cheng L., Li J., Wang X., Wang F., Liu L., Amit I., Zhang S., Zhang Z. Single-cell landscape of bronchoalveolar immune cells in patients with COVID-19. *Nat. Med.*, 2020, Vol. 26, pp. 842-844.

41. Long Q.X., Liu B.Z., Deng H.J., Wu G.C., Deng K., Chen Y.K., Liao P., Qiu J.F., Lin Y., Cai X.F., Wang D.Q., Hu Y., Ren J.H., Tang N., Xu Y.Y., Yu L.H., Mo Z., Gong F., Zhang X.L., Tian W.G., Hu L., Zhang X.X., Xiang J.L., Du H.X., Liu H.W., Lang C.H., Luo X.H., Wu S.B., Cui X.P., Zhou Z., Zhu M.M., Wang J., Xue C.J., Li X.F., Wang L., Li Z.J., Wang K., Niu C.C., Yang Q.J., Tang X.J., Zhang Y., Liu X.M., Li J.J., Zhang D.C., Zhang F., Liu P., Yuan J., Li Q., Hu J.L., Chen J., Huang A.L. Antibody responses to SARS-CoV-2 in patients with COVID-19. *Nat. Med.*, 2020, Vol. 26, no. 6, pp. 845-848.

42. Lucas C., Wong P., Klein J., Castro T.B.R., Silva J., Sundaram M., Ellingson M.K., Mao T., Oh J.E., Israelow B., Takahashi T., Tokuyama M., Lu P., Venkataraman A., Park A., Mohanty S., Wang H., Wyllie A.L., Vogels C.B.F., Earnest R., Lapidus S., Ott I.M., Moore A.J., Muenker M.C., Fournier J.B., Campbell M., Odio C.D., Casanovas-Massana A.; Yale IMPACT Team; Herbst R., Shaw A.C., Medzhitov R., Schulz W.L., Grubaugh N.D., Dela Cruz C., Farhadian S., Ko A.I., Omer S.B., Iwasaki A. Longitudinal analyses reveal immunological misfiring in severe COVID-19. *Nature*, 2020, Vol. 584, no. 7821, pp. 463-469.

43. Mehta A.K., Gracias D.T., Croft M. TNF activity and T cells. *Cytokine*, 2018, Vol. 101, pp. 14-18.

44. Moss P. The T cell immune response against SARS-CoV-2. *Nat. Immunol.*, 2022, Vol. 23, no. 2, pp. 186-193.

45. Ng K.W., Faulkner N., Cornish G.H., Rosa A., Harvey R., Hussain S., Ulferts R., Earl C., Wrobel A.G., Benton D.J., Roustan C., Bolland W., Thompson R., Agua-Doce A., Hobson P., Heaney J, Rickman H., Paraskevopoulou S., Houlihan C.F., Thomson K., Sanchez E., Shin G.Y., Spyer M.J., Joshi D., O'Reilly N., Walker P.A., Kjaer S., Riddell A., Moore C., Jebson B.R., Wilkinson M., Marshall L.R., Rosser E.C., Radziszewska A., Peckham H., Ciurtin C., Wedderburn L.R., Beale R., Swanton C., Gandhi S., Stockinger B., McCauley J., Gamblin S.J., McCoy L.E., Cherepanov P., Nastouli E., Kassiotis G. Preexisting and de novo humoral immunity to SARS-CoV-2 in humans. *Science*, 2020, Vol. 370, no. 6522, pp. 1339-1343.

46. Pujadas E., Chaudhry F., McBride R., Richter F., Zhao S., Wajnberg A., Nadkarni G., Glicksberg B.S., Houldsworth J., Cordon-Cardo C. SARS-CoV-2 viral load predicts COVID-19 mortality. *Lancet Respir. Med.*, 2020, Vol. 8, no. 9, e70. doi: 10.1016/S2213-2600(20)30354-4.

47. Qin C., Zhou L., Hu Z., Zhang S., Yang S., Tao Y., Xie C., Ma K., Shang K., Wang W., Tian D.S. Dysregulation of immune response in patients with Coronavirus 2019 (COVID-19) in Wuhan, China. *Clin. Infect. Dis.*, 2020, Vol. 71, no. 15, pp. 762-768.
48. Quatrini L., Della Chiesa M., Sivori S., Mingari M.C., Pende D., Moretta L. Human NK cells, their receptors and function. *Eur. J. Immunol.*, 2021, Vol. 51, no. 7, pp. 1566-1579.
49. Ragab D., Salah Eldin H., Taeimah M., Khattab R., Salem R. The COVID-19 Cytokine Storm; What We Know So Far. *Front. Immunol.*, 2020, Vol. 11, 1446. doi: 10.3389/fimmu.2020.01446.
50. Reyes M., Filbin M.R., Bhattacharyya R.P., Billman K., Eisenhaure T., Hung D.T., Levy B.D., Baron R.M., Blainey P.C., Goldberg M.B., Hacohen N. An immune-cell signature of bacterial sepsis. *Nat. Med.*, 2020, Vol. 26, pp. 333-340.
51. Salerno F., Engels S., van den Biggelaar M., van Alphen F.P.J., Guislain A., Zhao W., Hodge D.L., Bell S.E., Medema J.P., von Lindern M., Turner M., Young H.A., Wolkers M.C. Translational repression of pre-formed cytokine-encoding mRNA prevents chronic activation of memory T cells. *Nat. Immunol.*, 2018, Vol. 19, pp. 828-837.
52. Sarzi-Puttini P., Giorgi V., Sirotti S., Marotto D., Ardizzone S., Rizzardini G., Antinori S., Galli M. COVID-19, cytokines and immunosuppression: what can we learn from severe acute respiratory syndrome? *Clin. Exp. Rheumatol.*, 2020, Vol. 38, pp. 337-342.
53. Schultze J.L., Aschenbrenner A.C. COVID-19 and the human innate immune system. *Cell*, 2021, Vol. 184, pp. 1671-1692.
54. Siddiqi H.K., Mehra M.R. COVID-19 illness in native and immuno-suppressed states: A clinical-therapeutic staging proposal. *J. Heart Lung Transplant.*, 2020, Vol. 39, pp. 405-407.
55. Tan Y.X., Tan T.H., Lee M.J., Tham P.Y., Gunalan V., Druce J., Birch C., Catton M., Fu N.Y., Yu V.C., Tan Y.J. Induction of apoptosis by the severe acute respiratory syndrome coronavirus 7a protein is dependent on its interaction with the Bcl-XL protein. *J. Virol.*, 2007, Vol. 81, pp. 6346-6355.
56. Tay M.Z., Poh C.M., Rénia L., MacAry P.A., Ng L.F.P. The trinity of COVID-19: immunity, inflammation and intervention. *Nat. Rev. Immunol.*, 2020, Vol. 20, pp. 363-374.
57. Toor S.M., Saleh R., Sasidharan Nair V., Taha R.Z., Elkord E. T-cell responses and therapies against SARS-CoV-2 infection. *Immunology*, 2021, Vol. 162, no.1, pp. 30-43.
58. van der Sluis R.M., Holm C.K., Jakobsen M.R. Plasmacytoid dendritic cells during COVID-19: Ally or adversary? *Cell Rep.*, 2022, Vol. 40, no. 4, 111148. doi: 10.1016/j.celrep.2022.111148.
59. Wang D., Hu B., Hu C., Zhu F., Liu X., Zhang J., Wang B., Xiang H., Cheng Z., Xiong Y., Zhao Y., Li Y., Wang X., Peng Z. Clinical Characteristics of 138 Hospitalized Patients with 2019 Novel Coronavirus-Infected Pneumonia in Wuhan, China. *JAMA*, 2020, Vol. 323, 1061. doi: 10.1001/jama.2020.
60. Wang F., Nie J., Wang H., Zhao Q., Xiong Y., Deng L., Song S., Ma Z., Mo P., Zhang Y. Characteristics of peripheral lymphocyte subset alteration in COVID-19 Pneumonia. *J. Infect. Dis.*, 2020, Vol. 221, pp. 1762-1769.
61. Woodruff M.C., Ramonell R.P., Nguyen D.C., Cashman K.S., Saini A.S., Haddad N.S., Ley A.M., Kyu S., Howell J.C., Ozturk T., Lee S., Suryadevara N., Case J.B., Bugrovsky R., Chen W., Estrada J., Morrison-Porter A., Derrico A., Anam F.A., Sharma M., Wu H.M., Le S.N., Jenks S.A., Tipton C.M., Staitieh B., Daiss J.L., Ghosn E., Diamond M.S., Carnahan R.H., Crowe J.E. Jr., Hu W.T., Lee F.E.H., Sanz I. Extrafollicular B cell responses correlate with neutralizing antibodies and morbidity in COVID-19. *Nat. Immunol.*, 2020, Vol. 2, pp. 1506-1516.
62. Yao X.H., Li T.Y., He Z.C., Ping Y.F., Liu H.W., Yu S.C., Mou H.M., Wang L.H., Zhang H.R., Fu W.J., Luo T., Liu F., Guo Q.N., Chen C., Xiao H.L., Guo H.T., Lin S., Xiang D.F., Shi Y., Pan G.Q., Li Q.R., Huang X., Cui Y., Liu X.Z., Tang W., Pan P.F., Huang X.Q., Ding Y.Q., Bian X.W. A pathological report of three COVID-19 cases by minimal invasive autopsies. *Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi.*, 2020, Vol. 49, pp. 411-417.
63. Yue, Y., Nabar, N.R., Shi C., Kamenyeva O., Xiao X., Hwang, I., Wang M., Kehrl J.H. SARS-Coronavirus Open Reading Frame-3a drives multimodal necrotic cell death. *Cell Death Dis.*, 2018, Vol. 9, 904. doi: 10.1038/s41419-018-0917-y.
64. Zhao Q., Meng M., Kumar R., Wu Y., Huang J., Deng Y., Weng Z., Yang L. Lymphopenia is associated with severe coronavirus disease 2019 (COVID-19) infections: a systemic review and metaanalysis. *Int. J. Infect. Dis.*, 2020, Vol. 96, pp. 131-135.
65. Zheng H.Y., Zhang M., Yang C.X., Zhang N., Wang X.C., Yang X.P., Dong X.Q., Zheng Y.T. Elevated exhaustion levels and reduced functional diversity of T cells in peripheral blood may predict severe progression in COVID-19 patients. *Cell. Mol. Immunol.*, 2020, Vol. 17, pp. 541-543.

Авторы:

Хромова Е.А. — к.м.н., научный сотрудник лаборатории вакцинопрофилактики и иммунотерапии аллергических заболеваний ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова», Москва, Россия

Костинов М.П. — д.м.н., профессор, член-корр. РАН, заведующий лабораторией вакцинопрофилактики и иммунотерапии аллергических заболеваний ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова»; заведующий кафедрой эпидемиологии и современных технологий вакцинации ИПО ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Министерства здравоохранения РФ (Сеченовский университет), Москва, Россия

Сходова С.А. — к.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории механизмов регуляции иммунитета ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова», Москва, Россия

Осицов В.Н. — подполковник медицинской службы, начальник 1-го терапевтического отделения ФГКУЗ «Главный военный клинический госпиталь войск национальной гвардии Российской Федерации», г. Балашиха, Россия

Бишева И.В. — научный сотрудник лаборатории механизмов регуляции иммунитета ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова», Москва, Россия

Пахомов Д.В. — к.м.н., старший научный сотрудник лаборатории вакцинопрофилактики и иммунотерапии аллергических заболеваний ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова», Москва, Россия

Курбатова Е.А. — д.м.н., профессор, заведующая лабораторией терапевтических вакцин ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова», Москва, Россия

Хасанова А.А. — аспирант кафедры инфекционных болезней ФГБОУ ВО «Ульяновский государственный университет», г. Ульяновск, Россия

Крюкова Н.О. — ассистент, аспирант кафедры госпитальной терапии педиатрического факультета ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Шатохин М.Н. — д.м.н., профессор кафедры эндоскопической урологии ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования», Москва, Россия

Authors:

Khromova E.A., PhD (Medicine), Research Associate, Laboratory of Vaccine Prevention and Immunotherapy of Allergic Diseases, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation

Kostinov M.P., PhD, MD (Medicine), Professor, Corresponding Member, Russian Academy of Sciences, Honored Science Worker of Russia, Head, Laboratory of Vaccine Prevention and Immunotherapy of Allergic Diseases, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera; Head, Department of Epidemiology and Modern Immunization Technology, I. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russian Federation

Skhodova S.A., PhD (Biology), Leading Research Associate, Laboratory of Mechanisms of Immunity Regulation, I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation

Osiptov V.N., Lieutenant Colonel of Medical Service, Head, First Therapeutic Department, Main Military Clinical Hospital of the Russian National Guard, Balashikha, Russian Federation

Bisheva I.V., Research Associate, Laboratory of Mechanisms of Immunity Regulation, I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation

Pakhomov D.V., PhD (Medicine), Senior Research Associate, Laboratory of Vaccine Prevention and Immunotherapy of Allergic Diseases, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation

Kurbatova E.A., PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Laboratory of Therapeutic Vaccines, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation

Khasanova A.A., Postgraduate Student, Department of Infectious Diseases, Ulyanovsk State University, Ulyanovsk, Russian Federation

Kryukova N.O., Postgraduate Student, Assistant Professor, Department of Hospital Therapy, Faculty of Pediatrics, N. Pirogov Russian National Medical University, Moscow, Russian Federation

Shatokhin M.N., PhD, MD (Medicine), Professor, Department of Endoscopic Urology, Russian Medical Academy of Continuous Professional Education, Moscow, Russian Federation

Поступила 17.04.2023

Отправлена на доработку 05.05.2023

Принята к печати 10.05.2023

Received 17.04.2023

Revision received 05.05.2023

Accepted 10.05.2023

ВОЗМОЖНОСТИ КОРРЕКЦИИ ЛОКАЛЬНОГО ИММУННОГО СТАТУСА У ПАЦИЕНТОК С ХРОНИЧЕСКИМ ЭНДОМЕТРИТОМ

Боровиков И.О., Кравцова Е.И., Булгакова В.П., Боровикова О.И., Бирюкова М.И.

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

Резюме. Наиболее частой причиной повторных неудач имплантации при проведении экстракорпорального оплодотворения является хронический эндометрит с нарушением рецептивности эпителиального слоя полости матки — «тонким» эндометрием. Хроническое воспаление, сопровождающееся аутоиммунными реакциями слизистой, может приводить к извращению иммунного ответа лимфоцитарных клеток с изменением каскада цитокиновых реакций, что препятствует результативности проведения деконтаминационной терапии и в дальнейшем способствует невозможности реализации репродуктивной функции пациенток. В статье рассмотрен опыт комплексной предимплантационной подготовки пациенток с повторными неудачами имплантации обусловленными хроническим эндометритом на фоне внутриматочного введения кавитированного раствора рекомбинантного интерлейкина-2 (rIL-2).

Цель исследования — оценка изменений локального иммунного статуса у пациенток с хроническим эндометритом и повторными неудачами имплантации при комплексной подготовке к протоколу экстракорпорального оплодотворения с применением кавитированного раствора rIL-2.

Проведено исследование изменений иммунного статуса полости матки пациенток с повторными неудачами имплантации на фоне хронического эндометрита при комплексной подготовке к экстракорпоральному оплодотворению размороженными эмбрионами (n = 82) — контрольная группа женщины с бесплодием с нормальной толщиной эндометрия (М-эхо более 7 мм), которым был исключен диагноз «хронический эндометрит» (n = 30). Проводимая комплексная терапия: деконтаминационная и контаминационная; заместительная гормональная терапия; внутриматочная ультразвуковая кавитация раствора rIL-2. Проведена динамическая оценка локального иммунитета биоптата эндометрия с анализом основных фракций иммунокомпетентных лимфоидных клеток, морфологического состава, фагоцитарных реакций и цитокинового статуса.

Анализ показателей статуса иммунокомпетентных клеток и цитокинового профиля эндометрия пациенток с хроническим эндометритом свидетельствует о возможной Th2-девиации локального иммунного ответа, с изменением соотношения цитокинов, приводящих к нарушениям молекулярных,

Адрес для переписки:

*Боровиков Игорь Олегович
ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ
350063, Россия, г. Краснодар,
ул. им. Митрофана Седина, 4.
Тел.: 8 (909) 443-77-66.
E-mail: bio2302@mail.ru*

Address for correspondence:

*Igor O. Borovikov
Kuban State Medical University
4 Mitrofan Sedin St
Krasnodar
350063 Russian Federation
Phone: +7 (909) 443-77-66.
E-mail: bio2302@mail.ru*

Образец цитирования:

*И.О. Боровиков, Е.И. Кравцова, В.П. Булгакова, О.И. Боровикова, М.И. Бирюкова «Возможности коррекции локального иммунного статуса у пациенток с хроническим эндометритом» // Медицинская иммунология, 2024. Т. 26, № 2. С. 367-378.
doi: 10.15789/1563-0625-OFC-2590*

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

For citation:

*I.O. Borovikov, E.I. Kravtsova, V.P. Bulgakova, O.I. Borovikova, M.I. Biryukova "Options for correction of local immune status in patients with chronic endometritis", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2024, Vol. 26, no. 2, pp. 367-378.
doi: 10.15789/1563-0625-OFC-2590*

© Borovikov I.O. et al., 2024
The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License
DOI: 10.15789/1563-0625-OFC-2590

субклеточных и клеточных структур, что в совокупности с колебаниями активности других компонентов гомеостаза полости матки и определяет рецидивирующее течение заболевания с нарушением морфологии эндометрия. Предимплантационная подготовка с внутриматочным орошением кавитированным раствором rIL-2 у пациенток с повторными неудачами имплантации на фоне хронического эндометрита, способствует улучшению показателей локального иммунного статуса, более эффективно (в среднем в 2 раза) по сравнению с группой классической подготовки к экстракорпоральному оплодотворению размороженными эмбрионами, воздействуя на пролиферативные процессы в эпителии полости матки, способствуя увеличению имплантационного потенциала эндометрия и наступлению клинической беременности.

Ключевые слова: хронический эндометрит, повторные неудачи имплантации, локальный иммунный статус, предимплантационная подготовка, rIL-2, внутриматочная кавитация

OPTIONS FOR CORRECTION OF LOCAL IMMUNE STATUS IN PATIENTS WITH CHRONIC ENDOMETRITIS

Borovikov I.O., Kravtsova E.I., Bulgakova V.P., Borovikova O.I., Biryukova M.I.

Kuban State Medical University, Krasnodar, Russian Federation

Abstract. Chronic endometritis with impaired receptivity of uterine cavity epithelium (the “thin” endometrium) is considered the most common cause of recurrent implantation failures during *in vitro* fertilization (IVF). Chronic inflammation, accompanied by autoimmune mucosal reactions, may lead to a perverse immune response of lymphocytic cells with altered cascade of cytokine reactions, thus preventing efficiency of decontamination therapy, followed by potential inability to perform reproductive function in the patients. The article concerns our experience of complex preimplantation preparation of patients with recurrent implantation failures caused by chronic endometritis during a course of intrauterine administration of cavitated solution of recombinant interleukin 2 (rIL-2). Our aim was to assess some changes in local immune status in the patients with chronic endometritis and repeated implantation failures during complex preparation for the IVF procedure, using a cavitated solution of rIL-2.

A study of the local immune changes of uterine cavity in the patients with recurrent implantation failures suffering with chronic endometritis was carried out under complex preparation for IVF with thawed embryos (n = 82). A control group included the infertile women with normal endometrial thickness (> 7 mm at M-echo), with excluded diagnosis of chronic endometritis (n = 30). Complex therapy included decontamination and contamination; hormone replacement therapy; intrauterine ultrasonic cavitation of rIL-2 solution. Dynamic assessment of the local immunity was tested in the endometrial biopsies. We performed analysis of the main subpopulations of immune lymphoid cells, morphological composition, phagocytic responses and cytokine status.

he state of immunocompetent cells and cytokine profile of endometrial samples in the patients with chronic endometritis indicates a possible Th2 shift of the local immune response, with changing ratio of cytokines leading to impaired molecular, subcellular and cellular structures, which, along with fluctuating activity of other components of uterine cavity homeostasis, may determine a recurrent course of the disease with impaired endometrial morphology. Preimplantation preparation with intrauterine irrigation with a cavitated solution of rIL-2 in patients with recurrent implantation failures accomplished by chronic endometritis helps to improve the indices of local immunity, being more effective (an average of twofold), compared with the group of conventional preparation for IVF with thawed embryos. The treatment may promote the proliferative processes in epithelium of the uterine cavity thus contributing to increased potential of endometrium for implantation and occurrence of clinical pregnancy.

Keywords: chronic endometritis, repeated implantation failures, local immune status, pre-implantation preparation, rIL-2, intrauterine cavitation

Введение

Рецидивирующая имплантационная недостаточность, или так называемые «повторные неудачи имплантации» (RIF), является одним из наиболее важных факторов неудач вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ) и характеризуется отсутствием имплантации после переноса полноценных эмбрионов в эндометрий по меньшей мере тремя циклами экстракорпорального оплодотворения (ЭКО). После того, как большинство барьеров супружеской фертильности были преодолены, именно RIF становится основным препятствием к реализации репродуктивной функции, вызывая стресс и разочарование [1]. Тем более актуальным становится поиск причин, способствующих имплантационным неудачам, среди которых наиболее важным считается воспалительный фактор, связанный с длительным персистированием микрофлоры в полости матки [1, 2].

Хронический эндометрит (ХЭ) характеризуется длительным инфекционным повреждением эпителия полости матки со структурными и функциональными изменениями, способствующими нарушению его циклической трансформации и рецептивности [3, 4]. Эпидемиология распространенности ХЭ в популяции до сих пор не определена, что связано с трудностями диагностики, латентным течением и скрытой клинической картиной – основным проявлением ХЭ в большинстве случаев является фертильность [5]. В РФ ХЭ регистрируется также в широких пределах – от 0,2% до 66,3% случаев гинекологической патологии среди женщин фертильного возраста [5, 6].

В последние годы значительное внимание уделяется расширению понимания роли про- и противовоспалительных факторов в процессах нарушения имплантационных свойств эндометрия [7, 8, 9]. Иммунные аномалии, гиперкоагуляция и нарушения синтеза половых гормонов на фоне хронической воспалительной реакции служат потенциальными причинами имплантационных неудач [1, 10]. При этом локальные аутоиммунные девиации с изменением соотношения Th1/Th2 регуляторных лимфоцитарных клеток и, тем самым способствуя дисбалансу естественных клеток-киллеров и макрофагов маточного эпителия, изменения в клетках оксидативных и цитобioхимических процессов, могут напрямую влиять на успешность имплантации [9, 10, 11].

Лечение ХЭ, как и любого инфекционно-воспалительного процесса, основывается на деконтаминационной антибактериальной терапии, которая, по появившимся в последнее время публикациям, малоэффективна при проведении предимплантационной подготовки пациенток

с неудачами имплантации [2, 4, 12]. Поиск новых методов патогенетического воздействия на эпителий эндометрия, таких как ХГЧ, высокие дозы эстрадиола, антиоксидантная, витаминотерапия, попытки улучшения кровоснабжения эндометрия, скрэтчинг, введение гранулоцитарного колониестимулирующего фактора и стволовых клеток давали неоднозначный эффект [12, 13, 14, 15]. В связи с чем перспективным представляется исследование изменений локального иммунного статуса у пациенток с ХЭ и RIF, а также изучение фармакотерапевтического топического воздействия на него рекомбинантного интерлейкина-2 (rIL-2).

Цель исследования – оценить изменения локального иммунного статуса у пациенток с хроническим эндометритом и повторными неудачами имплантации при комплексной подготовке к протоколу экстракорпорального оплодотворения с применением кавитированного раствора rIL-2.

Материалы и методы

Дизайн исследования

Проспективное рандомизированное исследование с участием пациенток с хроническим эндометритом и повторными неудачами имплантации, включенными в протокол ЭКО с переносом размороженного эмбриона (РЭ) (n = 82) (средний возраст – 33,2±4,9 лет; средний возраст менархе – 11,5±1,3 года, полового дебюта – 17,4±1,4 года; интервал от менархе до сексуального дебюта – 3,5±1,5 года) выполнено на клинических базах кафедры акушерства, гинекологии и перинатологии Кубанского государственного медицинского университета (КубГМУ) (заведующая кафедрой – д.м.н., профессор Куценко И.И.): (время проведения: 07.2020 – 08.2022 гг.). Обследование пациенток проводили согласно приказу Министерства здравоохранения РФ № 803н от 31.07.2020 г. Критерии включения: 1) диагностированный ХЭ с 2 и более неудачными попытками ЭКО в анамнезе; 2) толщина эндометрия < 7 мм; 3) возраст ≤ 35 лет на момент включения в исследование; 4) отсутствие противопоказаний для проведения программы ЭКО (Приказ МЗ РФ № 803н); 5) согласие на проведение исследования. Критерии исключения: внутриматочные синехии, аденомиоз и туберкулез эндометрия, пороки развития матки. Контрольную группу (иммунологический контроль) составили женщины (n = 30) с формами бесплодия, не связанными с маточным фактором, нормальной толщиной эндометрия (М-эхо > 7 мм) и исключенным диагнозом «хронический эндометрит». Критерии постановки диагноза «хронический эндометрит»: анамнестические данные (бесплодие, RIF), гистероскопия (визуализация участков

гипертрофированной отечной слизистой матки и воспалительных инфильтратов), морфология и иммуногистохимическое исследование – обнаружение в биоптате эндометрия плазматических клеток ($CD138^+ \geq 3$).

Методом слепой выборки получено две репрезентативные группы: I группа ($n = 42$) – подготовка к ЭКО-РЭ – деконтаминационная/контаминационная терапия: перорально доксициклин (100 мг, 2 раза/день, 12 дней), секнидазол (200 мг однократно) и миконазол (200 мг интравагинально, 1 раз/день, 7 дней); контаминация – пробиотик, с культурой *Lactobacillus casei rhamnosus Doderleini* (интравагинально 14 дней); II группа ($n = 40$) – подготовка, аналогичная I группе, с внутриматочным ультразвуковым орошением полости матки кавитированным раствором rIL-2 – аппарат «Фотек АК101» (стабильность rIL-2 под воздействием УЗ-колебаний при кавитации определялась на базе медицинского центра «МедЛаб», СПб): 1000000 МЕ rIL-2 на 10 мл 0,9%-ного раствора NaCl – концентрация 0,10 мг/мл (100000 МЕ/мл), затем небулайзером получали мелкодисперсную аэрозольную взвесь для орошения полости матки (3 раза через день). Заместительная гормональная терапия: гестагенная поддержка – препараты микронизированного прогестерона вагинально со дня переноса эмбриона; эстрогенная поддержка – препарат 17 β -эстрадиола (со 2-3-го дня менструального цикла).

Исследование состояния местных параметров иммунной системы эндометрия включало: цитохимические показатели клеток мононуклеарно-фагоцитарной системы – цитохимическим методом выявляли активность миелопероксидазы (МПО), кислой фосфатазы (КФ) и неспецифической эстеразы (НЭ) макрофагов (клетки по степени активности фермента делили на 4 группы с вычислением среднего цитохимического показателя (СЦП)); субпопуляционный состав лимфоидных клеток с идентификацией кластерной принадлежности (реакции прямой и непрямой иммунофлуоресценции с регистрацией результатов на проточном цитофлуориметре) – $CD3^+$ – все Т-лимфоциты; $CD4^+$ – Т-лимфоциты хелперы-индукторы, $CD8^+$ – Т-лимфоциты цитотоксические, $CD19^+$ – все В-лимфоциты, $CD16^+CD56^+$ – естественные клетки киллеры (NK-клетки), $CD25^+$ – лимфоциты, несущие рецепторы к IL-2; HLA-DR $^+$ – активационный рецептор, $CD20^+$ – В-лимфоциты, $CD138^+$ – плазматические клетки; концентрацию цитокинов IL-1 β , IL-8, TNF α , IFN γ , IL-4, IL-6, IL-10, TGF- β в биоптате эндометрия определяли при проведении гистероскопии (5-7-й ДМЦ) и при биопсии (после окончания терапии) твердофазным иммунофер-

ментным методом (ТИФА) с использованием наборов (Caltag Laboratories, США) и расчетом противовоспалительного индекса (ПВИ) – отношение IL-6/IL-10.

Исследования проводились в соответствии с принципами предъявляемыми Хельсинкской декларацией ВМА (Fortaleza, Brazil, 2013), законом «Об обращении лекарственных средств» (№ 61, 2010) и принципами «Надлежащей клинической практики» (Good Clinical Practice (GCP), Astana, 2016) и правилами клинической практики в Российской Федерации (Приказ МЗ РФ № 200н, 2016). Участники исследования были ознакомлены с целями, дизайном и основными положениями исследования и подписали письменно оформленное информированное согласие на участие, публикацию его результатов в открытой печати. План исследования был одобрен этическим комитетом КубГМУ (выписка из протокола локального этического комитета № 18 от 12.09.2020 г.).

Статистический анализ данных проводился с помощью программного обеспечения SPSS 24.0 (IBM Corp., США). Непрерывные переменные были представлены как SD – среднее квадратичное отклонение: качественные в виде абсолютных (n) и относительных (%) величин. Критерий Пирсона (χ^2) для сопоставления нескольких эмпирических распределений одного и того же признака использовался для сравнения категориальных данных; переменные, не соответствующие критериям Пирсона, сравнивались критериями Фишера (F) ($p < 0,05$ был признан статистически значимым).

Результаты

Базовые характеристики пациенток были сходными в группах (табл. 1). Длительность бесплодия в основной группе в среднем составила $5,0 \pm 1,75$ года (95% ДИ 2,0; 9,0), в контрольной – $4,6 \pm 1,6$ года (95% ДИ 2,0; 7,0), первичное бесплодие было у 35,4% (29/82) пациенток основной и 35,0% (11/30) контрольной группы.

Морфология биоптатов эндометрия, полученных в «окно имплантации» естественного цикла, зарегистрировало преобладание поздней стадии фазы секреторной трансформации в основной группе с количеством зрелых пиноподий в поверхностном эпителии менее 20% у $75,9 \pm 2,1\%$ пациенток (в группе контроля большинство женщин (86,7%) имели более 40% зрелых пиноподий) ($\chi^2 = 139,607$; $p < 0,01$) (рис. 1).

Сравнительная оценка клеточного состава аспирата эндометрия пациенток с ХЭ и RIF выявила значимые отличия: у пациенток основной группы зарегистрировано снижение количества Т-лимфоцитов ($CD3^+$) за счет относительной и, в особенности, абсолютной концентрации

ТАБЛИЦА 1. АНАМНЕСТИЧЕСКИЕ ДАННЫЕ ПАЦИЕНТОК

TABLE 1. ANAMNESTIC DATA OF PATIENTS

Характеристики Characteristics	I группа Group (n = 42)		II группа Group (n = 40)		Контроль Control (n = 30)		χ^2
	М	±SD	М	±SD	М	±SD	
Возраст (лет) Age (years)	34,2	5,8	32,9	5,6	33,4	4,2	0,026
ИМТ (кг/см ²) BMI (kg/cm ²)	26,3	3,9	25,9	2,6	26,1	2,4	0,004
Репродуктивный анамнез Reproductive history							
Средний возраст менархе Average age of menarche	11,9	1,3	11,8	1,2	11,8	1,2	0,000
Возраст полового дебюта Age of sexual debut	17,2	1,7	16,9	1,4	17,4	1,6	0,249
Длительность бесплодия (лет) Duration of infertility (years)	5,1	1,7	4,9	1,8	4,6	1,6	0,081
Количество неудачных ВРТ Number of unsuccessful ART	3,4	1,1	3,5	1,1	1,2	0,2	12,518**
Толщина эндометрия (мм) Endometrial thickness (mm)	6,7	0,4	6,7	0,4	8,1	1,0	1,142
Бесплодие Infertility	n	%	n	%	n	%	
Первичное Primary	15	35,7	14	35,0	11	36,7	0,064
Вторичное Secondary	27	64,3	26	65,0	19	63,3	

Примечание. ** – статистическая значимость различий показателя $p < 0,01$.

Note. **, statistical significance of differences in $p < 0.01$.

T-хелперов (CD4⁺) при 3-4-кратном повышении цитотоксических T- (CD8⁺) и В-лимфоцитов (CD19⁺), и, соответственно, соотношения CD4⁺/CD8⁺, которое у пациенток с ХЭ было достоверно (в 4 раза – $p < 0,01$) более низким по сравнению с контрольной группой (табл. 2).

Кроме этого, в основной группе отмечено снижение доли субпопуляции T-regs (регуляторных лимфоцитов, несущих одновременно поверх-

ностные антигены CD4⁺, CD25⁺ и FoxP3, контролирующей иммунный ответ с торможением активации цитокинов и медиаторов воспаления, поддерживающей толерантность к имплантирующей бластоцисте) в общей популяции CD4⁺, и лимфоцитов, несущих мембранный рецептор к IL-2 (CD25⁺) – в 3 раза, на фоне повышения (в 2,0 раза) количества HLA-DR-положительных лимфоцитов, которые отражают активационные

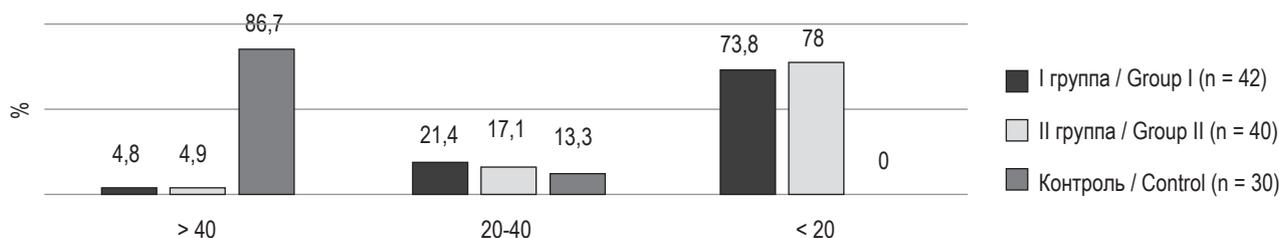


Рисунок 1. Биоптаты со зрелыми пиноподиями

Figure 1. Biopsy specimens with mature pinopodies

ТАБЛИЦА 2. СОСТАВ ЛИМФОИДНЫХ КЛЕТОК ЭНДОМЕТРИЯ

TABLE 2. COMPOSITION OF ENDOMETRIAL LYMPHOID CELLS

Группы / Показатели Groups / Indicators		Основная Main (n = 82)		Контроль Control (n = 30)		χ^2
		М	s	М	s	p
CD3 ⁺	%	26,8	9,5	53,2	10,1	8,064**
	абс. × 10 ⁹ /л abs. × 10 ⁹ /L	0,49	0,09	1,24	0,03	
CD4 ⁺	%	29,8	6,5	39,6	5,2	1,116
	абс. × 10 ⁹ /л abs. × 10 ⁹ /L	0,44	0,05	1,45	0,2	
CD8 ⁺	%	56,4	3,4	18,8	4,9	17,814**
	абс. × 10 ⁹ /л abs. × 10 ⁹ /L	0,55	0,05	1,74	0,04	
CD4 ⁺ /CD8 ⁺		0,53	0,1	2,11	0,1	93,368**
CD25 ⁺	%	4,9	1,4	14,7	2,4	3,952*
	абс. × 10 ⁹ /л abs. × 10 ⁹ /L	0,07	0,003	0,32	0,02	
CD16 ⁺ CD56 ⁺	%	10,3	1,1	15,6	0,3	0,714
	абс. × 10 ⁹ /л abs. × 10 ⁹ /L	0,13	0,08	0,37	0,01	
CD19 ⁺	%	32,6	4,6	10,2	0,9	10,7**
	абс. × 10 ⁹ /л abs. × 10 ⁹ /L	0,83	0,10	0,36	0,01	
HLA-DR ⁺	%	9,2	1,5	4,7	0,2	0,88
	абс. × 10 ⁹ /л abs. × 10 ⁹ /L	0,19	0,05	0,10	0,01	

Примечание. % – доля CD⁺ клеток от общего числа лимфоцитов. * – статистическая значимость различий показателя $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$.

Note. %, the proportion of CD⁺ cells in the total number of lymphocytes. *, statistical significance of differences in $p < 0.05$; **, $p < 0.01$.

потенции соответствующих лимфоцитарных пулов – снижения с преимущественной Th1-потенцией и активацией Th2-поляризованных лимфоцитов. Данные изменения состава лимфоидных клеток потенциально могут провоцировать аутоиммунные реакции, препятствующие успешной имплантации. Также в основной группе отмечено снижение (недостоверное – $p > 0,05$) концентрации НК-клеток (CD16⁺CD56⁺) и нейтрофильных лейкоцитов (CD68⁺) (достоверно – $p < 0,05$), что говорит о низкой цитотоксической активности эпителия полости матки, хотя считается, что для обеспечения нормального процесса имплантации количество этих клеток в первую фазу менструального цикла должно повышаться.

Фагоцитарные реакции в эндометрии пациенток с ХЭ характеризуются статистически значимым увеличением доли макрофагов (в абсолютном количестве среднее увеличение составило 5,9 раза) ($\chi^2 = 5150,916$; $p < 0,01$) с нарушением их

поглощательной способности, что характерно для изменений, связанных с воздействием эндотоксинов (антифагоцитарных факторов) анаэробной микрофлоры и образованием хронических форм (табл. 3).

По количеству пероксидазоположительных макрофагов можно опосредовано судить о защитной активности эндометрия – активность миелопероксидазы (МПО) у пациенток основной группы была в 3,5 раза ниже группы контроля ($\chi^2 = 60,278$; $p < 0,01$). Активность кислой фосфатазы (КФ), также отвечающей за бактерицидный ответ макрофагов, в основной группе достоверно не отличалась от контроля ($\chi^2 = 2,81$; $p > 0,05$), а неспецифическая эстераза (НЭ), обладающая субактивационными свойствами для макрофагов, в основной группе находилась на достоверно более низком уровне (уменьшение в 3,1 раза) ($\chi^2 = 32,826$; $p < 0,01$) (табл. 4).

ТАБЛИЦА 3. ФАГОЦИТАРНАЯ ЗАЩИТА ЭНДОМЕТРИЯ

TABLE 3. PHAGOCYTIC PROTECTION OF THE ENDOMETRIUM

Группы / Показатели Groups / Indicators		Основная Main (n = 82)		Контроль Control (n = 30)		χ^2
		М	с	М	с	
Фагоциты Phagocytes		6118,1	49,4	17041,2	409,4	5150,916**
Нейтрофилы Neutrophils	абс. abs.	5486,2	91,7	15283,9	311,5	4620,426**
	%	95,1	2,9	84,8	2,8	0,48
Фагоцитарное число Phagocytic number		0,8	0,1	0,4	0,1	12,676**
Фагоцитарный индекс Phagocytic index		1,7	0,24	1,7	0,9	0,0
Макрофаги Macrophages	абс. abs.	389,4	78,1	2301,1	403,7	1357,592**
	%	6,4	1,9	14,2	2,5	2,244
Фагоцитарное число Phagocytic number		0,6	0,1	0,2	0,1	19,012**
Фагоцитарный индекс Phagocytic index		1,8	0,4	1,0	0,4	1,75

Примечание. ** – статистическая значимость различий показателя $p < 0,01$.

Note. **, statistical significance of differences in $p < 0.01$.

Анализ локального цитокинового статуса эндометрия у пациенток с ХЭ показал, что концентрация основного макрофагального цитокина (IL-1 β) была почти в 3 раза ниже, чем в группе контроля (разница между группами статистически значимая – $\chi^2 = 12,054$; $p < 0,01$). Регуляторный полифункциональный цитокин IL-6, оказывающий, в определенных условиях, блокирующее действие на синтез IL-1 β и TNF α , был значимо выше группы контроля ($\chi^2 = 6,638$; $p < 0,01$). Концентрация TNF α в основной груп-

пе имела тенденцию к повышению ($\chi^2 = 19,134$; $p < 0,01$), а IFN γ – в 2 раза ниже ($\chi^2 = 21,93$; $p < 0,01$), как и IL-4, одного из основных противовоспалительных цитокинов, влияющего на активацию В-лимфоцитов и блокирующего синтез провоспалительных цитокинов – в 1,5 раза ниже – недостоверно ($\chi^2 = 1,55$; $p > 0,05$). Несмотря на то, что концентрация IL-10 в аспирате эндометрия пациенток с ХЭ характеризовалась высокой вариабельностью значений (коэффициенты вариации достигали 25%), она была значи-

ТАБЛИЦА 4. АКТИВНОСТЬ ФЕРМЕНТОВ МАКРОФАГОВ ЭНДОМЕТРИЯ (СЦП)

TABLE 4. ACTIVITY OF ENDOMETRIAL MACROPHAGE ENZYMES (MCI)

Группы / Показатели Groups / Indicators		Основная Main (n = 82)		Контроль Control (n = 30)		χ^2
		М	с	М	с	
Миелопероксидаза Myeloperoxidase		152,4	12,1	42,9	4,3	60,278**
Кислая фосфатаза Acid phosphatase		131,7	5,9	97,5	10,1	2,81
Неспецифическая эстераза Non-specific esterase		98,6	8,1	32,1	4,3	32,826**

Примечание. ** – статистическая значимость различий показателя $p < 0,01$.

Note. **, statistical significance of differences in $p < 0.01$.

ТАБЛИЦА 5. АКТИВНОСТЬ ОСНОВНЫХ КЛАССОВ ЦИТОКИНОВ СЕКРЕТА ПОЛОСТИ МАТКИ

TABLE 5. ACTIVITY OF THE MAIN CLASSES OF CYTOKINES OF THE SECRETION OF THE UTERINE CAVITY

Показатели (пг/мл) Indicators (pg/mL)	Основная Main (n = 82)		Контроль Control (n = 30)		χ^2
	M	s	M	s (95% ДИ) s (95% CI)	
IL-1 β	13,4	5,3	39,7	5,4 (15,14-45,90)	12,054**
IL-2	31,4	4,1	26,1	4,9 (11,9-29,1)	0,322
IL-6	119,1	5,9	81,6	9,8 (81,0-98,1)	6,638**
TNF α	64,4	7,3	22,6	6,4 (13,8-34,3)	19,134**
IFN γ	31,5	4,4	82,5	4,0 (16,1-30,3)	21,93**
IL-4	17,1	2,6	26,3	3,8 (19,1-32,5)	1,55
IL-10	34,6	10,1	95,1	14,1 (25,6-109,1)	27,296**
TGF- β	61,7	6,3	141,9	18,2 (116,2-159,4)	30,808**

Примечание. ** – статистическая значимость различий показателя $p < 0,01$.

Note. **, statistical significance of differences in $p < 0.01$.

мо ($\chi^2 = 27,296$; $p < 0,01$) ниже, чем в группе контроля, что отразилось на противовоспалительном индексе (ПВИ – соотношение IL-6/IL-10), который составил 3,4 в основной против 0,9 в группе контроля ($p < 0,05$). IL-2, продуцируемый активированными Т-клетками, у пациенток с ХЭ хоть и был выше, чем в группе контроля, но эта разница не была статистически значимой ($\chi^2 = 0,322$; $p > 0,05$). При этом стимулирующий преимущественно гуморальное звено TGF- β у пациенток с ХЭ более чем в два раза снижен по сравнению с контролем ($\chi^2 = 30,808$; $p < 0,01$) (табл. 5).

Анализ иммунологических показателей эндометрия при RIF и ХЭ свидетельствует о возможной Th2-девиации локального иммунного ответа, с изменением соотношения про- и противовоспалительных цитокинов, приводящих к нарушениям молекулярных, субклеточных и клеточных структур, что в совокупности с колебаниями активности других компонентов гомеостаза полости матки и определяет, с одной стороны, рецидивирующее течение заболевания, а с другой – нарушение морфологии эндометрия с последующей инфертильностью и имплантационной недостаточностью.

Оценка эффективности терапии

Для улучшения рецептивности эндометрия у женщин RIF и ХЭ, наряду с деконтаминационной/контаминационной терапией, нами предложено внутриматочное введение кавитированного раствора rIL-2 (II группа) – в следующий менструальный цикл (МЦ) после терапии у пациенток этой группы зафиксировано повы-

шение концентрации IL-1 β – $141,5 \pm 9,9$ пкг/мл соответственно ($p < 0,01$), превысив значения контроля более чем в 3 раза ($p < 0,05$). Это можно объяснить способностью IL-2 воздействовать на функционально-метаболическую активность фагоцитарных клеток, прежде всего, моноцитов/макрофагов, нейтрофилов, НК-клеток, а также стимуляцией синтеза эндогенных IFN α и IFN γ , способствующей ускоренному созреванию антигенспецифических лимфоцитов с активацией макрофагов и повышением синтеза IL-1 β . Концентрация TNF α в эндометрии, которая до лечения была достоверно выше, чем в группе контроля после лечения снизилась в обеих группах практически достигая значений контроля (в среднем $26,8 \pm 5,2$ пг/мл) ($p < 0,05$). IL-6 значимо увеличенный у пациенток с ХЭ, после окончания лечения снизился практически до контрольных значений в обеих группах, при этом во II группе его концентрация достоверно ($p < 0,01$) снизилась как по сравнению с исходными значениями, так и по сравнению со значениями контроля, что, скорее всего, объясняется активацией макрофагальных иммунных реакций и сменой направленности воздействий этого регуляторного цитокина (табл. 6).

После лечения концентрация IL-10 (регуляторного цитокина, участвующего в регенерации эпителиальных тканей) в группах в среднем составила $161,4 \pm 6,8$ пкг/мл (с наибольшим повышением во II группе – $199,2 \pm 6,5$ пг/мл), и ПВИ, соответственно, снизился (при этом если во II группе он был 0,2 ($p < 0,01$), то в I – 0,7). Воз-

ТАБЛИЦА 6. ДИНАМИКА КОНЦЕНТРАЦИИ ЦИТОКИНОВ В МЕТРОАСПИРАТЕ (M±s) (пг/мл)

TABLE 6. DYNAMICS OF CYTOKINE CONCENTRATION IN METROASPIRATE (M±s) (pg/mL)

Контроль Control (n = 30)		IL-1β	IL-2	IL-6	TNFα	TGF-β	IL-4	IL-10
		39,7±5,4	26,1±4,9	81,6±9,8	22,8±6,4	141,9±18,2	26,3±3,8	95,1±14,1
До лечения Before treatment	I гр. Gr. I (n = 42)	12,9±4,6	32,1±3,9	139,1±9,4 **	58,1±8,1 *	29,8±3,2 *	19,4±3,0 *	39,2±11,3 **
	II гр. Gr. II (n = 40)	13,7±3,5	31,4±4,1	124,1±8,6 **	44,6±5,5 *	30,7±2,2 *	16,5±2,2 *	29,9±8,6 *
После лечения After treatment	I гр. Gr. I (n = 42)	48,8±4,1 *	24,4±5,4	99,1±4,3	28,5±4,9 *	71,3±4,2 *	26,8±3,1 *	123,6±7,1 *
	II гр. Gr. II (n = 40)	141,5±9,9 **	123,4±13,3 *	63,7±5,2 *	25,1±5,5 *	286,2±4,5 **	28,4±2,9 *	199,2±6,5 **

Примечание. * – статистическая значимость различий показателя $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$.

Note. *, statistical significance of differences in $p < 0.05$; **, $p < 0.01$.

можно, это объясняется, в том числе, и способностью тромбоцитов активировать мононуклеарные клетки (PBMC), с высвобождением IL-10.

TGF-β является одним из наиболее важных факторов роста, выделяемым тромбоцитами во время заживления, и способствует пролиферации фибробластов и стволовых клеток. Локальная цитокиноterapia гIL-2, возможно, способствует стимулированию и регенерации эндометрия, с уменьшением доли фиброза в нем. В нашем исследовании после лечения наблюдалось значительное (в 9 раз) повышение TGF-β во II группе, что на фоне высоких концентраций других факторов роста и цитокинов способствует стимуляции митогенеза и пролиферации стволовых клеток эндометрия с улучшением его рецептивности.

Таким образом, локальное применение кавитированного раствора гIL-2 на фоне комплексной деконтаминационной и контаминационной терапии у пациенток с повторными неудачами имплантации и хроническим эндометритом способствует улучшению показателей локального иммунного статуса, воздействуя на пролиферативные процессы в эпителии полости матки, что увеличивает шансы на успех в программах экстракорпорального оплодотворения.

Ультразвуковое исследование состояния эндометрия, проведенное через один МЦ, показало

достижение М-эхо ≥ 7 мм (возможность провести имплантацию эмбрионов) у пациенток I группы в 42,8% (18/42), во II – 82,5% (33/40) – почти в 2 раза выше. Таким образом, для ЭКО была подготовлена 51 пациентка. Последующие беременности зарегистрированы у 38,9% (7/18) женщин I (биохимическая – 22,2% (4/18), клиническая – 77,8% (14/18)) и 45,4% (15/33) II группы (биохимическая – 18,1% (7/33), клиническая – 78,8% (26/33)) (рис. 2).

Самопроизвольный выкидыш случился у 16,7% (3/18) пациенток I и 15,1% (5/33) – II группы; родоразрешены в сроке гестации 22-36 недель 11,1% (2/18) беременных I и 12,1% (4/33) II группы. Показатель живорождения (процент от всех наступивших беременностей) в I группе составил 55,5% (10/18), во II – 60,6% (20/33).

Обсуждение

Неудовлетворительная результативность лечения ХЭ, ведущая к неудачам протоколов ЭКО, однозначно указывает на то, что нынешним вариантам терапии не хватает желаемой эффективности. Поиск оптимальной терапии ХЭ продолжается на различных уровнях: от способа введения, компонентов и дозы антибактериальных препаратов до продолжительности лечения и метода оценки эффективности. А добавление

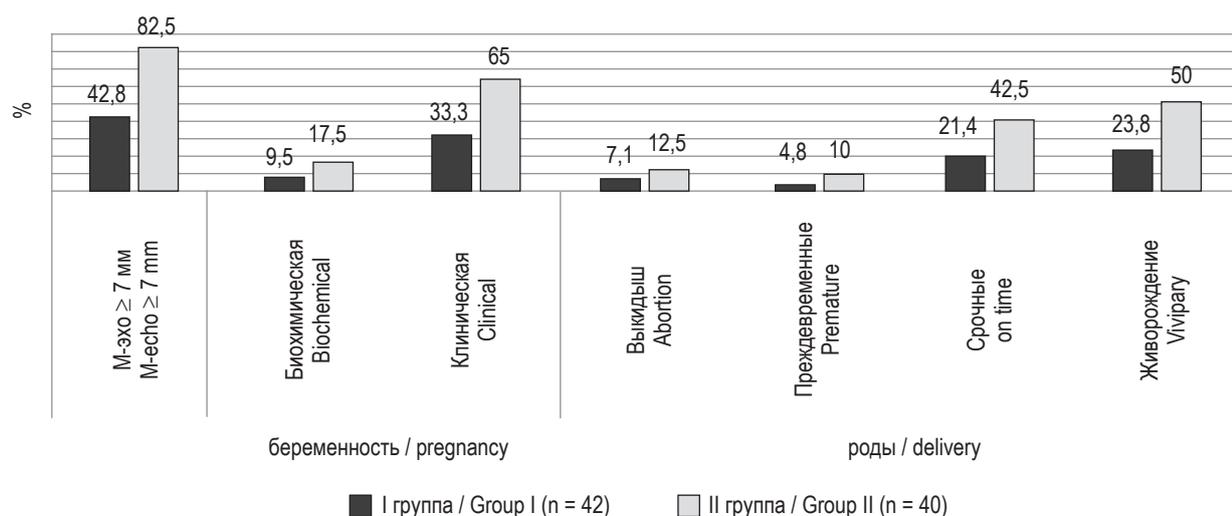


Рисунок 2. Эффективность предимплантационной подготовки

Figure 2. Effectiveness of preimplantation preparation

бесплодия и неудач ЭКО в это и так достаточно сложное уравнение добавляет еще один уровень и еще более подчеркивает необходимость достижения оптимальных результатов, так как в этом случае еще и существуют темпоральные рамки, в которые необходимо решить проблему семейной фертильности [4, 5, 6, 7, 8, 16]. Девиации в лимфоцитарных субпопуляциях и аномальная микробиота полости матки приводят к аутоиммунным механизмам воспалительных реакций, что во многом и определяет нарушение рецептивности эндометрия [17]. Точный механизм иммунных реакций, возникающий в эндометрии, подверженном длительной персистенции условно-патогенной микрофлоры до сих пор полностью расшифрован, однако уже известно, что изменения микробиоценоза полости матки может являться пусковым механизмом запуска каскада иммунных реакций, приводящих к аутоиммунизации, постоянной циркуляции В-клеток, нейтрофилов, Th2-девиации иммунного ответа, ведущей к гиперсекреции хемокинов и цитокинов, стойкой воспалительной реакции с последующим нарушением морфологии эпителиальных клеток [15, 16, 17].

Одной из проблем терапии женщин с ХЭ является отсутствие точки приложения воздействия лекарственных средств [5, 17]. Иммуномодуляторы, широко применяющиеся в терапии ХЭ, часто бывают малоэффективными – отсутствует топическое воздействие на маточный эпителий, что стимулирует поиск путей доставки препаратов непосредственно в зону воспаления. С этой точки зрения, наиболее интересным можно счи-

тать применение ультразвуковой кавитации [16]. Терапия рекомбинантной формой IL-2 – достаточно новый и еще малоизученный метод лечения ХЭ, обладающий плейотропной иммуномодулирующей активностью, способствующей восстановлению субпопуляций Т-хелперов, активацией NK-клеток и CD25-лимфоцитов, а УЗ-кавитация его раствора решает одну из основных проблем – homing-эффект данного препарата с быстрой его инактивацией в кровяном русле [17, 18]. Все вышеперечисленное, а также выявленные изменения локального иммунного статуса при ХЭ, и послужили патогенетическим обоснованием для применения кавитированным раствором rIL-2 на фоне деконтаминационной/контaminaционной и заместительной гормональной терапии у пациенток с повторными неудачами имплантации на фоне хронического эндометрита.

Заключение

Оценка активности иммунокомпетентных клеток и цитокинового профиля эпителия полости матки у пациенток с повторными неудачами имплантации, обусловленными хроническим эндометритом, показала изменения, характерные для Th2-девиации локального иммунного ответа, с изменением соотношения про- и противовоспалительных цитокинов. Предимплантационная подготовка с использованием топического внутриматочной цитокинотерапии кавитированным раствором rIL-2 на фоне деконтаминационной/контaminaционной и заместительной эстроген/гестагенной терапии показала более эффектив-

ное, по сравнению с группой классической подготовки к оплодотворению размороженными эмбрионами, с увеличением имплантационного потенциала эндометрия с наступлением клинической беременности и живорождением – в среднем в 2 раза. По-видимому, высокая эф-

фективность предлагаемой терапии обусловлена комплексным воздействием на очаг хронического аутоиммунного воспаления эндометрия с нормализацией его трофики, устранением Th2-девиации локального иммунного ответа и синергизмом с антибактериальной терапией.

Список литературы / References

1. Амян Т.С., Перминова С.Г., Кречетова Л.В., Вторушина В.В., Митюрин Е.В. Иммунологические аспекты повторных неудач имплантации в программе экстракорпорального оплодотворения // *Акушерство и гинекология*, 2017. № 1. С. 5-12. [Amyan T.S., Perminova S.G., Krechetova L.V., Vtorushina V.V., Mityurina E.V. Immunological aspects of repeated implantation failures in the *in vitro* fertilization program. *Akusherstvo i ginekologiya = Obstetrics and Gynecology*, 2017, no. 1, pp. 5-12. (In Russ.)]
2. Боровиков И.О., Куценко И.И., Булгакова В.П., Рубинина Э.Р., Горринг Х.И., Воронов В.А. Бесплодие на фоне хронического эндометрита и вагинального дисбиоза: опыт предимплантационной подготовки // *Медицинский совет*, 2020. № 3. С. 115-121. [Borovikov I.O., Kutsenko I.I., Bulgakova V.P., Rubinina E.R., Gorrington H.I., Voronov V.A. Infertility on the background of chronic endometritis and vaginal dysbiosis: the experience of preimplantation preparation. *Meditsinskiy sovet = Medical Council*, 2020, no. 3, pp. 115-121. (In Russ.)]
3. Дикке Г.Б., Остроменский В.В. Нарушение иммунного статуса при хроническом эндометрите и опыт его коррекции посредством локальной цитокинотерапии // *Акушерство и гинекология*, 2019. № 9. С. 139-146. [Dicke G.B., Ostromenskiy V.V. Violation of the immune status in chronic endometritis and the experience of its correction through local cytokine therapy. *Akusherstvo i ginekologiya = Obstetrics and Gynecology*, 2019, no. 9, pp. 139-146. (In Russ.)]
4. Лысенко О.В., Рождественская Т.А. Проблема «тонкого» эндометрия в репродуктивной медицине: опыт применения рекомбинантного интерлейкина-2 человека для подготовки пациенток к программам вспомогательных репродуктивных технологий // *Журнал акушерства и женских болезней*, 2017. Т. 66, № 4. С. 46-50. [Lysenko O.V., Rozhdzestvenskaya T.A. The problem of the “thin” endometrium in reproductive medicine: the experience of using recombinant interleukin-2 people to prepare patients for programs of assisted reproductive technologies. *Zhurnal akusherstva i zhenskikh bolezney = Journal of Obstetrics and Women’s Diseases*, 2017, Vol. 66, no. 4, pp. 46-50. (In Russ.)]
5. Мелкозёрова О.А., Башмакова Н.В., Есарева А.В. Проблемы коммуникации эмбриона и эндометрия: маркеры нарушений и механизмы влияния // *Российский вестник акушера-гинеколога*, 2016. Т. 16, № 5. С. 29-36. [Melkozerova O.A., Bashmakova N.V., Esareva A.V. Problems of embryo/endometrium communication: Markers of dysfunction and mechanisms of action. *Rossiyskiy vestnik akushera-ginekologa = Russian Bulletin of Obstetrician-Gynecologist*, 2016, Vol. 16, no. 5, pp. 29-36. (In Russ.)]
6. Петров Ю.А., Алехина А.Г., Блесманович А.Е. Актуальные вопросы хронического эндометрита // *Современные проблемы науки и образования*. 2018. № 6. [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://science-education.ru/ru/article/view?id=28155>. [Petrov Yu.A., Alyokhina A.G., Blesmanovich A.E. Actual issues of chronic endometritis. *Sovremennye problemy nauki i obrazovaniya = Modern Problems of Science and Education*, 2018, no. 6. [Electronic resource]. Access mode: <https://science-education.ru/ru/article/view?id=28155>. (In Russ.)]
7. Хабаров С.В., Горская О.С., Русанова Г.П. Опыт применения ультразвуковой кавитации у пациенток с хроническим эндометритом перед проведением программы ЭКО // *Акушерство и гинекология*, 2020. № 11. С. 197-204. [Khabarov S.V., Gorskaya O.S., Rusanova G.P. Experience in the use of ultrasonic cavitation in patients with chronic endometritis before the IVF program. *Akusherstvo i ginekologiya = Obstetrics and Gynecology*, 2020, no. 11, pp. 197-204. (In Russ.)]
8. Храмова А.Ю., Башмакова Н.В. Современный взгляд на проблему «тонкого» эндометрия: пути решения в программах ВРТ (обзор литературы) // *Проблемы репродукции*, 2019. Т. 25, № 4. С. 69-76. [Khrantsova A.Yu., Bashmakova N.V. Global view on the problem of “thin” endometrium: solutions to the problem in assisted reproductive technology (literature review). *Problemy reproduksii = Russian Journal of Human Reproduction*, 2019, Vol. 25, no. 4, pp. 69-76. (In Russ.)]
9. Чобанян А.Г., Егорова В.Н., Гизингер О.А. Рекомбинантный интерлейкин-2 в лечении бесплодия: обзор литературы // *Репродуктивная медицина*, 2021. Т. 4, № 49. С. 7-15. [Chobanyan A.G., Egorova V.N., Gisinger O.A. Recombinant interleukin-2 in the treatment of infertility: a review of the literature. *Reproduktivnaya meditsina = Reproductive Medicine*, 2021, Vol. 4, no. 49, pp. 7-15. (In Russ.)]
10. Шамилова А.М., Ильина И.Ю., Боровкова Е.И., Доброхотова Ю.Э. Хронический эндометрит. Пути улучшения методов диагностики // *РМЖ. Мать и дитя*, 2021. Т. 4, № 3. С. 243-249. [Shamilova A.M., Ilyina I.Yu., Borovkova E.I., Dobrokhotova Yu.E. Chronic endometritis. Towards the improvement of diagnostic methods. *RMZh. Mat i ditya = Russian Journal of Woman and Child Health*, 2021, Vol. 4, no. 3, pp. 243-249. (In Russ.)]
11. Яковчук Е.К., Сулима А.Н., Рыбалка А.Н., Дижа М.А., Аникин С.С., Симачева С.А. Хронический эндометрит: современное состояние проблемы, основные аспекты патогенеза, влияние на репродук-

тивную функцию // Российский вестник акушера-гинеколога, 2016. Т. 16, № 5. С. 37-41. [Yakovchuk E.K., Sulima A.N., Rybalka A.N., Dizha M.A., Anikin S.S., Simacheva S.A. Chronic endometritis: State-of-the-art, main aspects of pathogenesis, impact on reproductive function. *Rossiyskiy vestnik akushera-ginekologa = Russian Bulletin of Obstetrician-Gynecologist*, 2016, Vol. 16, no. 5, pp. 37-41. (In Russ.)]

12. Benner M., Ferwerda G., Joosten I., van der Molen R. How uterine microbiota might be responsible for a receptive, fertile endometrium. *Hum. Reprod.*, 2018, Vol. 24, no. 4, pp. 393-415.

13. Bosdou J.K., Venetis C.A., Tarlatzis B.C., Grimbizis G.F., Kolibianakis E.M. Higher probability of live-birth in high, but not normal, responders after first frozen-embryo transfer in a freeze-only cycle strategy compared to fresh-embryo transfer: a meta-analysis. *Hum. Reprod.*, 2019, Vol. 34, no. 3, pp. 491-505.

14. Hou Z., Jiang F., Yang J., Liu Y., Zha H., Yang X., Bie J., Meng Y. What is the impact of granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) in subcutaneous injection or intrauterine infusion and during both the fresh and frozen embryo transfer cycles on recurrent implantation failure: a systematic review and meta-analysis? *Reprod. Biol. Endocrinol.*, 2021, Vol. 19, no. 1, 125. doi: 10.1186/s12958-021-00810-4.

15. Miralaei S., Ashrafi M., Arabipour A., Zolfaghari Z., Taghvaei S. The incidence rate of unresponsive thin endometrium in frozen embryo transfer cycles: A case-series of therapy with granulocyte colony stimulating factor. *Int. J. Reprod. Biomed.*, 2019, Vol. 17, no. 12, pp. 923-928.

16. Qian W., Yujun S., Reiqi F., Mengxue W., Chune R., Aifang J., Tingting Y. Role of inflammatory factors in the etiology and treatment of recurrent implantation failure. *Reprod. Biol.*, 2022, Vol. 22, no. 4, 100698. doi: 10.1016/j.repbio.2022.100698.

17. Ranisavljevic N., Raad J., Anahory T., Grynberg M., Sonigo C. Embryo transfer strategy and therapeutic options in infertile patients with thin endometrium: a systematic review. *J. Assist. Reprod. Genet.*, 2019, Vol. 36, no. 11, pp. 2217-2231.

18. Zhu Y.C., Sun Y.X., Shen X.Y., Jiang Y., Liu J.Y. Effect of intrauterine perfusion of granular leukocyte-colony stimulating factor on the outcome of frozen embryo transfer. *World J. Clin. Cases*, 2021, Vol. 9, no. 30, pp. 9038-9049.

Авторы:

Боровиков И.О. — д.м.н., доцент кафедры акушерства, гинекологии и перинатологии ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Краснодар, Россия

Кравцова Е.И. — к.м.н., доцент кафедры акушерства, гинекологии и перинатологии ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Краснодар, Россия

Булгакова В.П. — аспирант кафедры акушерства, гинекологии и перинатологии ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Краснодар, Россия

Боровикова О.И. — аспирант кафедры акушерства, гинекологии и перинатологии ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Краснодар, Россия

Бирюкова М.И. — старший лаборант кафедры акушерства, гинекологии и перинатологии ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Краснодар, Россия

Authors:

Borovikov I.O., PhD, MD (Medicine). Associate Professor, Department of Obstetrics, Gynecology and Perinatology, Kuban State Medical University, Krasnodar, Russian Federation

Kravtsova E.I., PhD (Medicine), Associate Professor, Department of Obstetrics, Gynecology and Perinatology, Kuban State Medical University, Krasnodar, Russian Federation

Bulgakova V.P., Postgraduate Student, Department of Obstetrics, Gynecology and Perinatology, Kuban State Medical University, Krasnodar, Russian Federation

Borovikova O.I., Postgraduate Student, Department of Obstetrics, Gynecology and Perinatology, Kuban State Medical University, Krasnodar, Russian Federation

Biryukova M.I., Senior Laboratory Assistant, Department of Obstetrics, Gynecology and Perinatology, Kuban State Medical University, Krasnodar, Russian Federation

Поступила 11.10.2022

Отправлена на доработку 07.11.2022

Принята к печати 08.11.2022

Received 11.10.2022

Revision received 07.11.2022

Accepted 08.11.2022

ВЛИЯНИЕ ТОПИЧЕСКИХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ НА ЛОКАЛЬНЫЕ КОНЦЕНТРАЦИИ IL-5 И МОМЕТАЗОНА ФУРОАТА ПРИ ХРОНИЧЕСКОМ ПОЛИПОЗНОМ РИНОСИНУСИТЕ

Афлитонов М.А.^{1,4}, Стрельникова Е.Г.², Безрукова Е.В.²,
Артюшкин С.А.², Варюшина Е.А.³, Моисеева Е.А.^{1,4}

¹ ФГАОУ ВО «Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта», г. Калининград, Россия

² ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университет имени И.И. Мечникова», Санкт-Петербург, Россия

³ ФГБУ «Научно-исследовательский институт гриппа имени А.А. Смородинцева» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

⁴ ГБУЗ «Областная клиническая больница Калининградской области», г. Калининград, Россия

Резюме. Длительное персистирующее воспаление является основным фактором патогенеза при хроническом полипозном риносинусите (ХПРС). Перспективным вопросом современной клинической оториноларингологии является модификация лекарственных средств, содержащих топические глюкокортикостероиды, для повышения локальной биодоступности, уменьшения концентрации глюкокортикостероидов, снижения локального воспалительного ответа. Целью работы являлась оценка влияния мочевины, сульфата магния, маннита на концентрации мометазона фууроата и IL-5 в полипозной ткани пациентов с ХПРС. В исследование включены 146 пациентов с ХПРС в возрасте от 18 до 62 лет. Биопсии полипозной ткани забирали в процессе полипотомии. В жидкостях, полученных методом микродиализа тканей полипов, определяли концентрации мометазона методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. Концентрации цитокинов IL-3, IL-4, IL-5 и IL-10 в сыворотке крови и микродиализатах полипозной ткани IL-5 измеряли методом твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA). Средний возраст пациентов с ХПРС составил $42,9 \pm 7,2$ г, среди них 93 мужчины (63,69%), 53 женщины (36,30%). Клинические показатели тяжести заболевания по шкале SNOT-22 у пациентов с ХПРС значительно превышали таковые в контрольной группе ($p \leq 0,05$). Результаты биохимического анализа микродиализатов полипозной ткани показали повышение содержания ионов Na^+ при резистентной форме ХПРС по сравнению с чувствительной и зависимой формами ($p < 0,05$). Кривые с уровнем мометазона фууроата получили во всех исследуемых пробах. Было обнаружено, что добавление раствора сульфата магния к мометазону увеличивает Стах мометазона

Адрес для переписки:

Афлитонов Максим Александрович
ГБУЗ «Областная клиническая больница
Калининградской области»
236016, Россия, г. Калининград, ул. Клиническая, 74.
Тел.: 8 (4012) 57-86-63.
Email: maksim-aflitonov@yandex.ru

Address for correspondence:

Maksim A. Aflitonov
Regional Clinical Hospital
of the Kaliningrad Region
74 Klinicheskaya St
Kaliningrad
236041 Russian Federation
Phone: +7 (4012) 57-86-63.
E-mail: maksim-aflitonov@yandex.ru

Образец цитирования:

М.А. Афлитонов, Е.Г. Стрельникова, Е.В. Безрукова,
С.А. Артюшкин, Е.А. Варюшина, Е.А. Моисеева
«Влияние топических лекарственных средств
на локальные концентрации IL-5 и мометазона
фууроата при хроническом полипозном риносинусите»
// Медицинская иммунология, 2024. Т. 26, № 2.
С. 379-388. doi: 10.15789/1563-0625-EOT-2646

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

For citation:

M.A. Aflitonov, E.G. Strelnikova, E.V. Bezrukova,
S.A. Artyushkin, E.A. Moiseeva "Effect of topical drugs on
the local concentrations of IL-5 and mometasone furoate
in chronic polypous rhinosinusitis", Medical Immunology
(Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2024, Vol. 26, no. 2,
pp. 379-388.
doi: 10.15789/1563-0625-EOT-2646

© Aflitonov M.A. et al., 2024
The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License
DOI: 10.15789/1563-0625-EOT-2646

до 154 нг/мл в биологических жидкостях после микродиализа. При добавлении раствора мочевины к мометазону Стах возрастает до 198 нг/мл. В нативном диализате полипозной ткани носа уровни IL-5 составляли $89 \pm 2,01$ пг/мл. Через 2 часа после добавления мометазона фуората происходило снижение концентраций IL-5 до $61 \pm 3,5$ пг/мл, после добавления мочевины до $69 \pm 2,98$ пг/мл ($p \leq 0,01$, по сравнению с контролем без добавления ЛС). Анализ уровней цитокинов в сыворотке крови показал, что у пациентов с ХГРС концентрации IL-5 значительно превышали таковые в контрольной группе ($p \leq 0,05$). При ХГРС наблюдалась тенденция к повышению уровней IL-3 и IL-4 в среднем в два раза и к снижению содержания IL-10 (более чем в 1,5 раза) в сыворотках крови по сравнению с контрольной группой. Полученные результаты помогут разработать новые клинические подходы для повышения биодоступности тГКС, что позволит повысить эффективность базовой терапии ХГРС и разработать методику профилактики резистентных форм полипоза.

Ключевые слова: хронический полипозный риносинусит, IL-5, топические глюкокортикостероиды, резистентность к мометазону, высокочувствительная жидкостная хроматография, локальное воспаление

EFFECT OF TOPICAL DRUGS ON THE LOCAL CONCENTRATIONS OF IL-5 AND MOMETASONE FUROATE IN CHRONIC POLYPOUS RHINOSINUSITIS

Aflitonov M.A.^{a, b}, Strelnikova E.G.^b, Bezrukova E.V.^b, Artyushkin S.A.^b, Moiseeva E.A.^{a, d}

^a I. Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russian Federation

^b I. Mechnikov North-Western State Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

^c A. Smorodintsev Research Institute of Influenza, St. Petersburg, Russian Federation

^d Regional Clinical Hospital of the Kaliningrad Region, Kaliningrad, Russian Federation

Abstract. Long-term persistence of inflammation is the main factor of pathogenesis in chronic polypous rhinosinusitis (CRSwNP). Prospectives of current clinical otorhinolaryngology include modification of drugs containing topical glucocorticosteroids in order to increase local bioavailability, reduce the concentration of glucocorticosteroids, and alleviate the local inflammatory response. The aim of our work was to evaluate the effect of urea, magnesium sulfate, and mannitol on the concentrations of mometasone furoate and IL-5 in the polypous tissue of patients with CRSwNP. The study included 146 patients with CRSwNP aged 18 to 62 years. Biopsies of polypous tissue were taken during polypotomy. In the fluid samples obtained by microdialysis of polypous tissues, mometasone concentrations were determined by high-performance liquid chromatography. Concentrations of IL-3, IL-4, IL-5 and IL-10 cytokines in blood serum, and IL-5 in microdialysates of polypous tissue were measured by ELISA technique. The average age of patients with CRSwNP was 42.9 ± 7.2 years, with prevalence of male patients ($n = 93, 63.7\%$) over females ($n = 53, 36.3\%$). Severity parameters of the disease by the SNOT-22 scale were significantly higher in CRSwNP patients than in control group ($p \leq 0.05$). The results of biochemical analysis of microdialysates from polypous tissue showed increased content of Na^+ ions in the resistant clinical cases of CRSwNP compared with the sensitive and dependent clinical forms ($p < 0.05$). Curves with the level of mometasone furoate were obtained in all the studied samples. It was found that the addition of magnesium sulfate solution to mometasone increases the C_{max} of mometasone to 154 ng/mL in biological fluids after microdialysis. When urea solution is added to mometasone, C_{max} increases to 198 ng/mL. In the native nasal polypous tissue dialysate, IL-5 levels were 89 ± 2.01 pg/mL. Two hours after the addition of mometasone furoate, IL-5 concentrations decreased to 61 ± 3.5 pg/mL, upon addition of urea, it changed to 69 ± 2.98 pg/mL ($p \leq 0.01$, compared with the control without the addition of drugs). Analysis of serum cytokine levels showed that IL-5 concentrations in the patients with CRSwNP significantly exceeded (> 3 -fold) those in the control group ($p \leq 0.05$). There was a trend for increase of IL-3 and IL-4 (2-fold) and to decreased IL-10 levels in blood sera (> 1.5 -fold) in patients with CRSwNP compared with controls. These results may be helpful for development of novel clinical approaches, in order to increase bioavailability of topically administered glucocorticosteroids, thus allowing to promote the effectiveness of basic therapy of CRSwNP and to develop therapy for the prevention of resistant forms of polyposis.

Keywords: chronic rhinosinusitis, nasal polyps, topical glucocorticosteroids, mometasone, IL-5, furoate resistance, high-performance liquid chromatography, local inflammation

Список сокращений

ЛС – лекарственное средство; КТ – компьютерная томография; ОНП – околоносовые пазухи; тГКС – топические глюкокортикостероиды; Стах – максимальная (пиковая) концентрация ЛС, которая достигается в определенном компартменте; GM-CSF – гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор; IL-5 – интерлейкин-5; IL-5R α – рецептор интерлейкина-5; IL-3 – интерлейкин-3; IL-4 – интерлейкин-4; IL-10 – интерлейкин-10; Th2 – Т-хелперы 2-го типа.

Введение

Топические глюкокортикостероиды (тГКС) широко используются оториноларингологами для лечения различных воспалительных заболеваний околоносовых пазух (ОНП). Эмпирически тГКС классифицируются на слабые, средней силы, сильные и очень сильные. Врачам зачастую приходится на основе клинической оценки подбирать наиболее подходящий тГКС, чтобы вызвать ремиссию заболевания. В 29% случаев достигнуть этого не удастся, что объясняется резистентностью воспаленных тканей, тяжестью заболевания и коморбидным фоном пациента [20]. Длительное персистирующее воспаление является основным фактором патогенеза при хроническом полипозном риносинусите (ХПРС). Согласно рекомендациям EPOS ХПРС разделяют по характеру доминирующего эндотипа на Th2- и не-Th2-опосредованные типы иммунного ответа [10]. Th2-тип иммунного ответа при ХПРС характеризуется эозинофильным воспалением, повышением продукции Th2-цитокинов (IL-5, IL-13), гистамина, а также иммуноглобулина E (IgE) [13, 17]. Для оценки эффективности лечения дифференцируют контролируруемую, частично контролируемую и неконтролируемую формы течения ХПРС [4]. При неконтролируемой форме течения ХПРС наблюдается резистентность к терапии тГКС, точные причины развития резистентности и неэффективности терапии остаются к настоящему времени невыясненными.

В клинической практике отсутствуют данные о влиянии локального воспаления на концентрацию тГКС, достигших клеток-мишеней. Группы тГКС значительно различаются по своим «липофильным» свойствам, а следовательно, по абсорбции слизистой оболочкой и по способности вызывать локальные клинические эффекты. Низкая эффективность может быть связана как с проблемами при доставке, так и при кинетике лекарственного средства (ЛС). Различные факторы, такие как носитель ЛС, усилители проницаемости, липофильность, разведение раствора, добавки и вспомогательные вещества также влияют на местную активность тГКС и уровень цитоки-

нов. Методика микродиализа нативных тканей является оптимальным методом получения локальных биологических жидкостей, содержащих тГКС и цитокины [1]. Использование данного метода позволяет получить достоверную информацию о концентрации действующего вещества, в частности мометазона фууроата и IL-5, в полипозной ткани пациента. Рядом авторов показана стабильность значений концентрации тГКС и цитокинов, исследованных методом микродиализа нативных тканей. Идеальный тГКС для локального применения должен обладать длительной экспозицией на поверхности слизистой, обеспечивать пролонгированный клинический эффект, характеризоваться высокой концентрацией в интерстициальном пространстве при минимальной дозировке и снижать уровни провоспалительных цитокинов [6]. Интерес вызывает влияние различных добавок, модифицирующих ЛС в целях улучшения биодоступности тГКС и снижения уровня локального воспалительного профиля. Перспективным вопросом современной клинической оториноларингологии является модификация ЛС, содержащих тГКС, для повышения локальной биодоступности, уменьшения концентрации тГКС, снижения местного воспалительного ответа [2, 3, 18]. Локальные концентрации ЛС и цитокинов могут изменяться при применении тГКС в комбинации с усилителями проницаемости и осмотическими средствами. В связи с этим **целью нашего исследования** являлась оценка влияния мочевины, сульфата магния, маннита на концентрации мометазона фууроата и IL-5 в полипозной ткани пациентов с ХПРС.

Материалы и методы

Исследования проведены у 146 пациентов с диагнозом ХПРС в возрасте от 18 до 62 лет. Контрольную группу составили 17 человек без ХПРС. Клиническое обследование пациентов с ХПРС включало в себя проведение компьютерной томографии (КТ) (баллы по шкале Lund-Mackay) пазух носа и оценку тяжести течения ХПРС в баллах по шкале SNOT-22. Для исследований у участников исследования получали венозную кровь и фрагменты полипозной ткани. Концентрации цитокинов в сыворотке крови и локальных уровней IL-5 в биологических жидкостях после микродиализа измеряли методом твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA) с применением соответствующих тест-систем в соответствии с инструкциями фирм-производителей: IL-5 (ELH-IL5-1 RayBiotech, США); IL-3 (D3000 R@D Systems); IL-4 (ELH-IL4-1 RayBiotech, США); IL-10 (RT IL-10 SIMPLEX, Thermo Fisher Scientific, США). До аналитического этапа сыво-

ротку хранили в низкотемпературном холодильнике -70°C в пробирках Eppendorf.

Фрагменты полипозной ткани (операционный материал) из полости носа пациентов с ХПРС получали в процессе полипотомии. В качестве контроля использовали фрагменты размерами до 22 мм нижних носовых раковин, полученных в процессе задней конхотомии у участников без ХПРС. Определение концентраций мометазона фууроата и IL-5 в полипозной ткани проводили в тестах *in vitro*. Для этого получали биологические жидкости, содержащие мометазон, согласно методике микродиализа тканей [1]. Концентрации мометазона определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. Для оценки воздействия различных лекарственных средств на кинетику мометазона в первой группе производилась инсталляция на площадку обмена мометазона фууроата; во второй группе – мочевины и мометазона фууроата; в третьей группе – сульфата магния и мометазона фууроата и в четвертой – маннита и мометазона фууроата. Диализат получали посредством пропускания перфузата сквозь зонды диаметром 0,55 мм и площадками обмена длиной 5 мм. Перфузат пропускали с помощью перистальтического насоса через нативные образцы до получения 1 мл диализата. Полученные пробы (20 мкл) хранили в холодильнике при -40°C в центрифужных пробирках Eppendorf до аналитического этапа. Хроматографический анализ выполняли на жидкостном хроматографе Agilent Technologies 1260 Infinityс диодно-матричным детектором. Условия проведения анализа:

колонка PhenomenexLuna C18 (2), $150 \times 2,00$ мм, 5 мкм при температуре 28°C и предколонка Eclipse XDB-C18 $4,6 \times 12,5$ мм, 5 мкм. В качестве подвижной фазы в режиме градиентного элюирования использовали смесь ацетонитрила в бидистиллированной воде (от 25% до 80% ацетонитрила). Скорость потока подвижной фазы – 0,3 мл/мин. Объем вводимой пробы – 20 мкл. Время хроматографирования: 15 мин. УФ-детектирование проводили при длине волны $254 \pm 1,2$ нм.

Статистическая обработка результатов исследования проводилась с использованием программ Microsoft Excel 2010, StatSoft Statistica 10.0. При сравнении групп для выборок с нормальным распределением использовался t-критерий Стьюдента, для непараметрических выборок – U-критерий Манна–Уитни, W-критерий Вилкоксона использовался для сравнения парных связанных групп, если распределение показателей хотя бы в одной группе отличалось от нормального. Оценка нормальности распределения проводилась с помощью теста Колмогорова–Смирнова, для оценки корреляции использовался коэффициент ранговой корреляции Спирмена.

Результаты

Клиническая оценка течения ХПРС по шкале Lund-Mackay и SNOT-22

Средний возраст пациентов с ХПРС составил $42,9 \pm 7,2$ г. (от 18 до 62 лет). Среди 146 пациентов было 93 мужчины (63,69%), 53 женщины (36,30%). Результаты клинического обследования пациентов представлены на рисунке 1. В левой

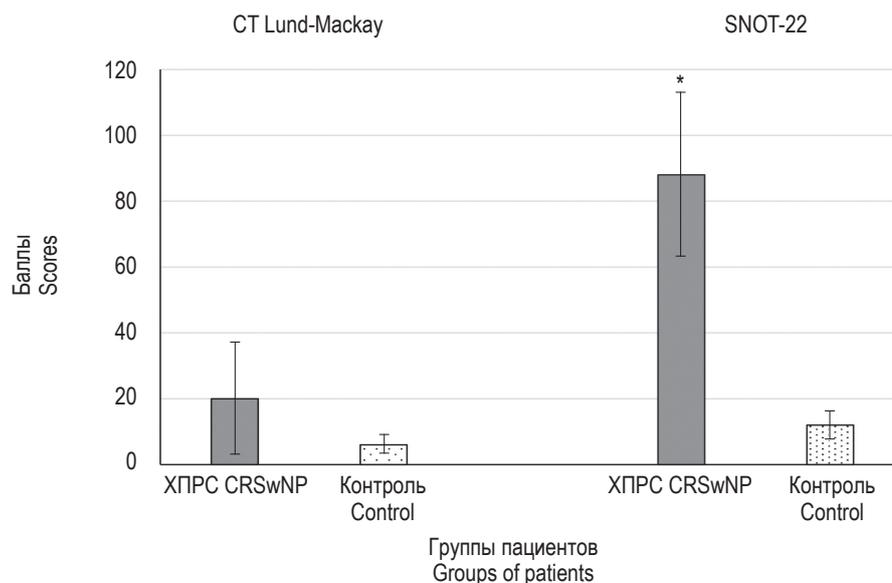


Рисунок 1. Показатели шкал (баллы) Lund-Mackay и SNOT-22 у пациентов с ХПРС

Примечание. * – различия между группами достоверны, $p \leq 0,05$.

Figure 1. Lund-Mackay, SNOT-22 scores data in patients with CrwNP

Note. *, differences between groups are significant, $p \leq 0.05$.

части гистограммы приведены баллы по шкале Lund-Маскау, полученные на основании данных компьютерной томографии (КТ). В правой части гистограммы отображены результаты оценки тяжести течения ХПРС по шкале SNOT-22. Как следует из приведенных данных, показатели тяжести заболевания по шкале SNOT-22 у пациентов с ХПРС значительно превышали таковые в контрольной группе ($p \leq 0,05$).

Биохимические показатели микродиализатов ткани полипов

Для оценки метаболизма полипозной ткани при разных формах ХПРС были проанализированы 13 биохимических показателей. Результаты анализа представлены в таблице 1. Как следует из полученных данных, наибольшие различия между группами были обнаружены по содержанию Na^+ в микродиализатах ткани полипов. Было

показано повышение содержания ионов Na^+ при резистентной форме ХПРС по сравнению с чувствительной и зависимой формами ($p < 0,05$). Не было выявлено статистически значимых различий между подгруппами по остальным изученным показателям.

Оценка влияния ЛС на кинетику мометазона

Для изучения воздействия различных ЛС на содержание мометазона в диализатах полипозной ткани оценивали кинетику мометазона без добавления ЛС и в сочетании с мочевиной, сульфатом магния и маннитом. Учитывались объективные данные на изолированных фрагментах полипозной ткани, которые были получены в течение $6,5 \pm 0,56$ часа. Кривые с уровнем мометазона фууроата получили во всех исследуемых пробах. Профиль мометазона с мочевиной показал Stax (198 нг/мл); профиль мометазона с сульфатом

ТАБЛИЦА 1. БИОХИМИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ МЕТАБОЛИЗМА ПОЛИПОЗНОЙ ТКАНИ ПРИ РАЗЛИЧНЫХ ФОРМАХ ХПРС, $M \pm m$

TABLE 1. BIOCHEMICAL PARAMETERS OF THE METABOLISM OF POLYPOUS TISSUE IN VARIOUS TYPES CRSwNP, $M \pm m$

Показатель, ммоль/л Parameters, mmol/L	Формы ХПРС Types of CRSwNP		
	Чувствительная Sensitive	Зависимая Dependent	Резистентная Resistant
Na^+	139,00±2,43	140,00±1,93	148,00±1,87*
K^+	4,70±0,23	4,70±0,43	4,70±0,15
Ca^{2+}	2,50±0,12	2,50±0,32	2,50±0,54
Mg^{2+}	0,50±0,23	0,50±0,23	0,50±0,23
Cl^-	115,00±0,32	115,00±0,13	115,00±0,17
HCO_3^-	30,00±1,14	30,00±1,13	30,00±1,23
SO_4^{2-}	1,20±0,42	1,20±0,16	1,20±0,23
PO_4^{2-}	1,00±0,14	1,00±0,11	1,00±0,18
Общий белок, г/л Total protein, g/L	30,00±2,65	30,00±3,54	30,00±0,65
Альбумин Albumin	0,188±0,570	0,188±0,250	0,188±0,430
pH	7,64±0,21	7,64±0,11	7,64±0,13
Глюкоза Glucose	6,05±2,54	6,05±2,15	6,05±0,79
Органическая кислота Organic acid	5,60±0,26	5,60±0,54	5,60±0,78

Примечание. * – различия достоверны между резистентной и чувствительной формами; между резистентной и зависимой формами ХПРС ($p < 0,05$).

Note. *, differences are significant between resistant and sensitive types; between resistant and dependent types of CRSwNP ($p < 0.05$).

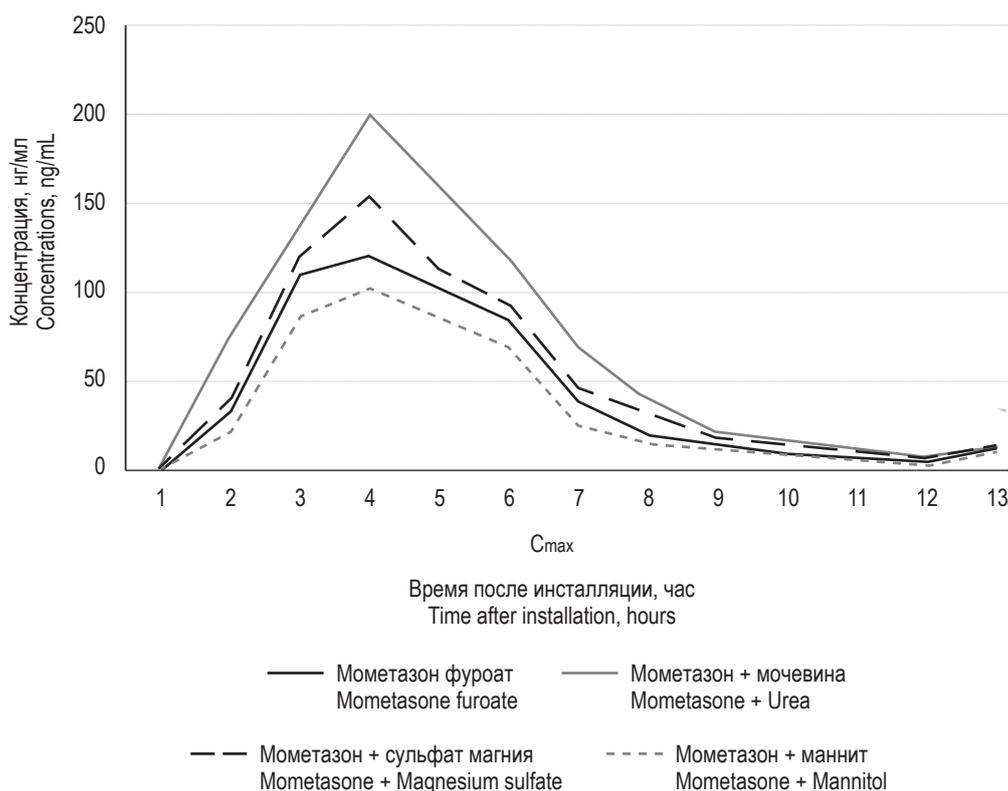


Рисунок 2. Экстраполированные фармакокинетические профили кривых мометазона фуората и мометазона фуората в сочетании с мочевиной, сульфатом магния и маннитом (построенные на основании объективных концентраций мометазона)

Примечание. C_{max} – максимальная (пиковая) концентрация ЛС, которая достигается в определенном компартменте.

Figure 2. Extrapolated pharmacokinetic profiles of mometasone furoate curves and mometasone furoate in combination with urea; magnesium sulfate; mannitol (based on objective mometasone concentrations)

Note. C_{max} , the maximum (peak) concentration of drugs, which is achieved in a certain compartment.

магния C_{max} (154 нг/мл), профиль мометазона с маннитом C_{max} (102 нг/мл), профиль чистого мометазона C_{max} (120 нг/мл). Экстраполированные фармакокинетические профили мометазона фуората представлены на рисунке 2.

Анализ влияния мометазона фуората и ЛС на концентрацию ИЛ-5

В нативном диализате полипозной ткани носа уровни ИЛ-5 составляли $89 \pm 2,01$ пг/мл. Через 2 часа после добавления мометазона фуората происходило снижение концентраций ИЛ-5 до $61 \pm 3,5$ пг/мл, после добавления мочевины – до $69 \pm 2,98$ пг/мл. Данные изменения были статистически достоверными по сравнению с пробами без добавления ЛС с высоким уровнем значимости ($p \leq 0,01$). После внесения сульфата магния и маннита наблюдали незначительное уменьшение концентрации ИЛ-5 до $78 \pm 3,37$ пг/мл и $85 \pm 1,93$ пг/мл соответственно, при этом различия не достигали статистически достоверных уровней. Концентрации ИЛ-5 в диализате поли-

позной ткани после инсталляции различных ЛС представлены на рисунке 3.

Концентрации провоспалительных цитокинов в сыворотке крови

У пациентов с ХГРС и в контрольной группе была проведена оценка содержания цитокинов ИЛ-3, ИЛ-4, ИЛ-5 и ИЛ-10 в сыворотке крови (рис. 4). Как следует из представленных результатов, у пациентов ХГРС концентрации ИЛ-5 значительно превышали (в среднем более чем в три раза) таковые в контрольной группе, при этом выявленные различия являлись статистически достоверными ($p \leq 0,05$). Уровни ИЛ-3 и ИЛ-4 при ХГРС были повышены по сравнению с таковыми в контрольной группе в среднем в два раза, но данные изменения не были статистически значимыми. У пациентов ХГРС наблюдалась выраженная тенденция к снижению содержания ИЛ-10 в сыворотках крови (более чем в 1,5 раза) по сравнению с контролем, однако различия не достигли статистически значимых величин.

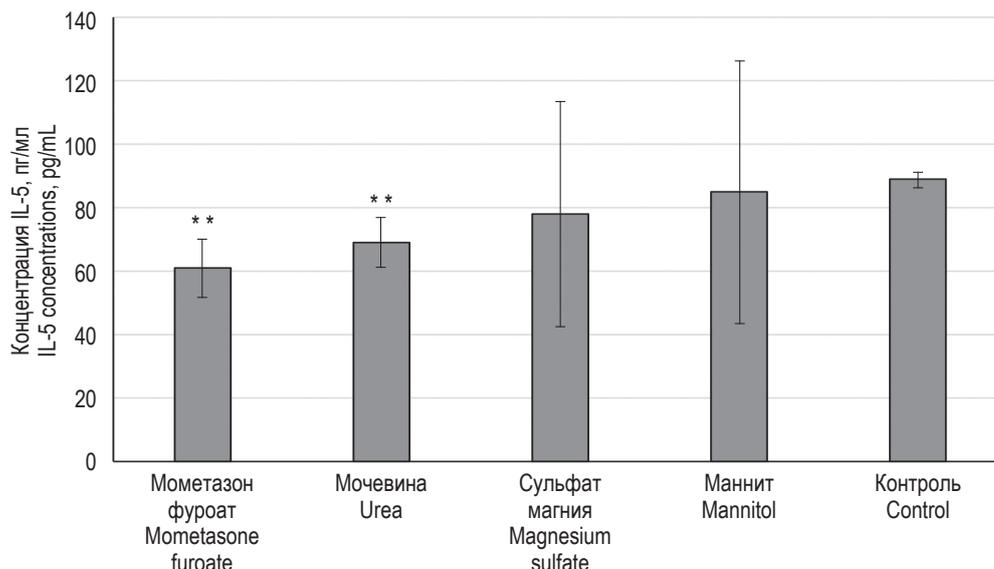


Рисунок 3. Концентрации IL-5 в диализате через 2 часа после инсталляции различных ЛС

Примечание. ** – различия между группами достоверны, $p \leq 0,01$.

Figure 3. Concentrations of IL-5 in dialyzing fluid 2 hours after installation of various medicines

Note. **, differences between groups are significant, $p \leq 0.01$.

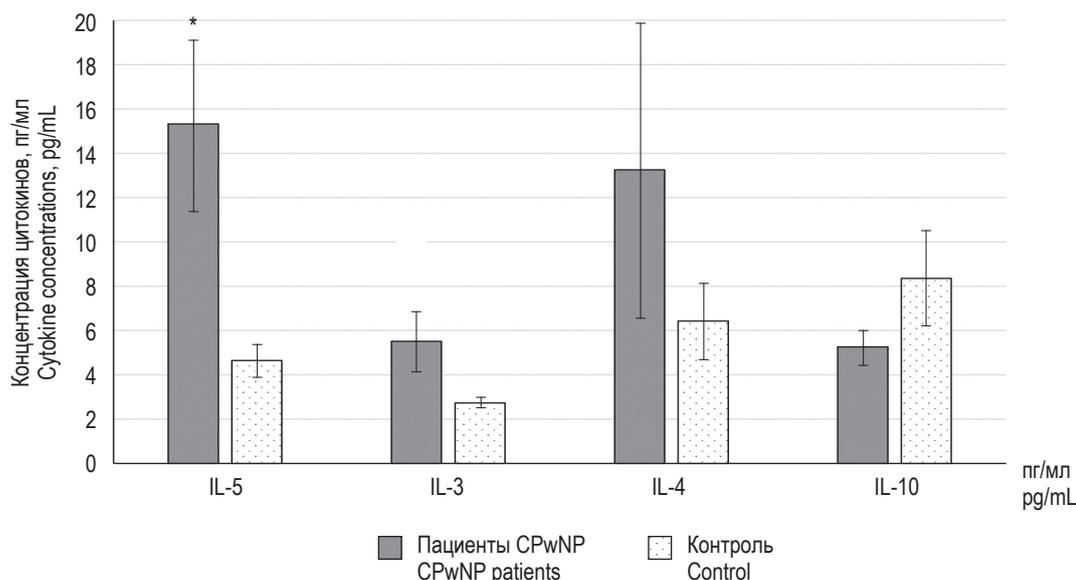


Рисунок 4. Концентрации цитокинов в сыворотках крови пациентов с ХПРС

Примечание. * – различия с контрольной группой достоверны, $p \leq 0,05$.

Figure 4. Cytokine concentrations in sera of patients with CrwNP

Note. *, differences with control group are significant, $p \leq 0.05$.

Обсуждение

Клиническое обследование пациентов с ХПРС, участвовавших в настоящем исследовании, включало в себя проведение компьютерной томографии (КТ) пазух носа и оценку тяжести

течения ХПРС. По данным КТ (по шкале Lund-Mackay) и данным тяжести течения ХПРС (по шкале SNOT-22) у пациентов был выявлен высокий уровень поражения придаточных пазух носа и среднетяжелый уровень снижения качества жизни. Прогрессирующее снижение показателей

качества жизни у пациентов с ХПРС отмечают и другие исследователи [16, 18]. Результаты биохимической оценки микродиализата полипозной ткани свидетельствуют о формировании классического интерстициального отека (сочетание повышенного давления в микрососудах, повышения проницаемости микрососудов, увеличения скорости микрососудистой фильтрации в интерстициальном пространстве) при чувствительной, зависимой и резистентной формах ХПРС. Высокие уровни натрия в интерстициальном пространстве и нарушение второго пути удаления интерстициальной жидкости при ХПРС (серозной трансудации) приводит к значительной задержке жидкости внутри интерстиция и уменьшению объема слизистого отделяемого в полости носа.

С использованием разработанной ранее методики микродиализа полипозной ткани в данной работе были получены локальные биологические жидкости, в которых определяли концентрации мометазона фууроата и IL-5. Во всех изученных образцах полипозной ткани было выявлено содержание мометазона, что подтвердило полученные ранее результаты [1]. Объективные данные на изолированных фрагментах полипозной ткани получали в течении $6,5 \pm 0,56$ часов. На более поздних сроках наблюдалось резкое падение концентрации мометазона фууроата, показателей метаболизма и концентрации IL-5, и данные, полученные после этой временной точки, расценивались как неинформативные. Данный эффект, скорее всего, был связан с прогрессирующим нарушением жизнеспособности тканей [7].

Анализ содержания цитокинов показал, что у пациентов с ХПРС наблюдается повышенная продукция IL-5 как на системном, так и на местном уровне. Так, при ХПРС в сыворотках крови концентрации IL-5 составили $15,32 \pm 3,87$ пг/мл, в нативном диализате полипозной ткани — $89 \pm 2,01$ пг/мл носа. Полученные данные подтверждаются описанными в литературе исследованиями, указывающими на преобладание гипериммунного ответа 2-го типа и повышение уровней IL-5 как в периферической крови, так и в тканях полипов носа при ХПРС [9, 15]. Известно, что ХПРС обычно ассоциируется с эозинофильной инфильтрацией ткани, связанной с Th2-опосредованным иммунным ответом, и характеризуется повышенным уровнем IL-5 и других медиаторов воспаления 2-го типа. Эозинофилы и IL-5 играют важную роль в воспалении при ХПРС. Эозинофилы секретируют многочисленные медиаторы воспаления 2-го типа, включая гранулярные белки, ферменты, цитокины, хемокины, факторы роста, липиды и продукты окисления. IL-5 — гомодимерный гликопротеин с молекулярной массой 40–50 кДа, гемопоэтиче-

ский цитокин, который имеет решающее значение для пролиферации, созревании, миграции и выживания эозинофилов, а также участвует в биологических функциях тучных клеток, базофилов, врожденных лимфоидных клеток, В-клеток и эпителиальных клеток [11]. Эозинофильная инфильтрация и IL-5 могут служить в качестве биомаркеров рецидива полипов при диагностике и оценке тяжести ХПРС. Результаты исследований показали, что блокирование пути IL-5/IL-5R приводит к снижению роста полипов у пациентов с исходно высокими локальными уровнями IL-5 [12]. Таким образом, основываясь на текущих опубликованных данных, можно заключить, что IL-5 представляет собой подходящую и эффективную мишень для лечения пациентов с ХПРС.

В нашей работе было изучено влияние добавления ЛС к тГКС (мометазону) на уровень IL-5 в полипозной ткани. Значительное снижение содержания IL-5 выявлено при добавлении мочевины, что свидетельствует об уменьшении локального воспалительного ответа. Одновременно получен высокий профиль локальной концентрации мометазона при использовании мометазона с мочевиной Стах (198 нг/мл). Это указывает на возможность использования мочевины в качестве усилителя проницаемости при терапии ХПРС [14]. В роли осмотического средства (увеличивающего осмотический градиент на границе слизистой) может выступать профиль с сульфатом магния Стах (154 нг/мл). Очевидно, концентрация мометазона зависит от активности локального воспаления, что подтверждается связью IL-5 и Стах мометазона. Связь может быть обусловлена чувствительностью эозинофилов к IL-5. Данная связь зависит от относительной экспрессии IL-5R α , что, в свою очередь, зависит от состояния активации эозинофилов, их созревания и локализации. Отмечается, что экспрессия IL-5R α в тканях повышена у пациентов с ХПРС и астмой [5].

Характерные паттерны Th2-опосредованного иммунного ответа отмечены у всех пациентов [8]. По данным анализа сыворотки крови гипериммунный вариант цитокинового ответа доминирует при ХПРС. Пропорциональное увеличение провоспалительных цитокинов IL-5, IL-3 выявлено у всех пациентов выборки. Как известно, основными цитокинами Th2-опосредованного иммунного ответа являются IL-4, IL-5 и IL-13. Цитокины IL-3, IL-5 и гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF) играют ключевую роль в дифференцировке и активации эозинофилов и формировании назальных полипов. У пациентов с ХПРС наблюдали снижение продукции IL-10 на системном уровне. Ранее было показано важное значение IL-10 в патогенезе ХПРС, нарушение регуляции противовоспалительного цитокина

ИЛ-10 связывают с усиленным иммунопатологическим ответом [19].

Заключение

Полученные результаты помогут разработать новые клинические подходы для повышения био-

доступности тГКС, что позволит повысить эффективность базовой терапии ХПРС и разработать методику профилактики резистентных форм полипоза. Проведенный анализ позволит обосновать создание комплекса реабилитационных мероприятий для пациентов с хроническими формами риносинуситов.

Список литературы / References

1. Афлитонов М.А., Стрельникова Е.Г., Безрукова Е.В., Артюшкин С.А., Воронов А.В. Терапевтический лекарственный мониторинг топических глюкокортикостероидов: использование метода высокоэффективной жидкостной хроматографии для обнаружения мометазона фууроата в полипах носа // Оториноларингология. Восточная Европа, 2022. Т. 12, № 3. С. 327-333. [Aflitonov M.A., Strelnikova E.G., Bezrukova E.V., Artyushkin S.A., Voronov A.V. Therapeutic drug monitoring of topical glucocorticosteroids: using high performance liquid chromatography to detect mometasone furoate in nasal polyps. *Otorinolaringologiya. Vostochnaya Evropa = Otorhinolaryngology. Eastern Europe*, 2022, Vol. 12, no. 3, pp. 327-333. (In Russ.)]
2. Безрукова Е.В., Хмельницкая Н.М., Афлитонов М.А. Современные аспекты иммунопатогенеза хронического полипозного риносинусита // Российская оториноларингология, 2017. Т. 1, № 3. С. 16-23. [Bezrukova E.V., Khmel'nizkaya N.M., Aflitonov M.A. Modern aspects of immunopathogenesis of chronic polyposis rhinosinusitis. *Rossiyskaya otorinolaringologiya = Russian Otorhinolaryngology*, 2017, Vol. 1, no. 3, pp. 16-23. (In Russ.)]
3. Arancibia C., Langdon C., Mullol J. Lack of additive benefit of oral steroids on short-term postoperative outcomes in nasal polyposis. *Laryngoscope*, 2022, Vol. 130, no. 12, pp. 2742-2747.
4. Bachert C., Han J.K., Wagenmann M., Hosemann W., Lee S.E., Backer V., Mullol J., Gevaert P., Klimek L., Prokopakis E., Knill A., Cavaliere C., Hopkins C., Hellings P. EUFOREA expert board meeting on uncontrolled severe chronic rhinosinusitis with nasal polyps (CRSwNP) and biologics: Definitions and management. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2021, Vol. 147, no. 1, pp. 29-36.
5. Benninger M., Ferguson B., Hadley J. Adult chronic rhinosinusitis: definitions, diagnosis, epidemiology, and pathophysiology. *Otolaryngol. Head Neck Surg.*, 2003, Vol. 129, no. 1, pp. 1-32.
6. Campbell R.G. Risks and management of long-term corticosteroid use in chronic rhinosinusitis. *Curr. Opin. Otolaryngol. Head Neck Surg.*, 2018, Vol. 26, no. 1, pp. 1-7.
7. Dautremont J., Mechor B., Rudmik L. The role of immediate postoperative systemic corticosteroids when utilizing a steroid-eluting spacer following sinus surgery. *Otolaryngol. Head Neck Surg.*, 2014, Vol. 150, no. 4, pp. 689-695.
8. de Borja F., Martínez-Antón A., Picado C. Corticosteroid treatment regulates mucosal remodeling in chronic rhinosinusitis with nasal polyps. *Laryngoscope*, 2015, Vol. 125, no. 5, pp. 158-167.
9. Derendorf H., Meltzer E. Molecular and clinical pharmacology of intranasal corticosteroids: clinical and therapeutic implications. *Allergy*, 2008, Vol. 63, no. 1, pp. 1292-1300.
10. Fokkens W.J., Lund V.J., Hopkins C., Hellings P.W., Kern R., Reitsma S., Toppila-Salmi S., Bernal-Sprekelsen M., Mullol J., Alobid I., Terezinha Anselmo-Lima W., Bachert C., Baroody F., von Buchwald C., Cervin A., Cohen N., Constantinidis J., de Gaborly L., Desrosiers M., Diamant Z., Douglas R.G., Gevaert P.H., Hafner A., Harvey R.J., Joos G.F., Kalogjera L., Knill A., Kocks J.H., Landis B.N., Limpens J., Lebeer S., Lourenco O., Meco C., Matricardi P.M., O'Mahony L., Philpott C.M., Ryan D., Schlosser R., Senior B., Smith T.L., Teeling T., Tomazic P.V., Wang D.Y., Wang D., Zhang L., Agius A.M., Ahlstrom-Emanuelsson C., Alabri R., Albu S., Alhabash S., Aleksic A., Aloulah M., Al-Qudah M., Alsaleh S., Baban M.A., Baudoin T., Balvers T., Battaglia P., Bedoya J.D., Beule A., Bofares K.M., Braverman I., Brozek-Madry E., Richard B., Callejas C., Carrie S., Caulley L., Chussi D., de Corso E., Coste A., El Hadi U., Elfarouk A., Eloy P.H., Farrokhi S., Felisati G., Ferrari M.D., Fishchuk R., Grayson W., Goncalves P.M., Grdinic B., Grgic V., Hamizan A.W., Heinichen J.V., Husain S., Ping T.I., Ivaska J., Jakimovska F., Jovancevic L., Kakande E., Kamel R., Karpischenko S., Kariyawasam H.H., Kawauchi H., Kjeldsen A., Klimek L., Krzeski A., Kopacheva Barsova G., Kim S.W., Lal D., Letort J.J., Lopatin A., Mahdjoubi A., Mesbahi A., Netkovski J., Nyenbue Tshipukane D., Obando-Valverde A., Okano M., Onerci M., Ong Y.K., Orlandi R., Otori N., Ouennoughy K., Ozkan M., Peric A., Plzak J., Prokopakis E., Prepageran N., Psaltis A., Pugin B., Raftopoulos M., Rombaux P., Riechelmann H., Sahtout S., Sarafoleanu C.-C., Searyoh K., Rhee C.-S., Shi J., Shkoukani M., Shukuryan A.K., Sicak M., Smyth D., Sindvongs K., Soklic Kosak T., Stjarne P., Sutikno B., Steinsvag S., Tantilipikorn P., Thanaviratnanich S., Tran T., Urbancic J., Valiulus A., Vasquez de Aparicio C., Vicheva D., Virkkula P.M., Vicente G., Voegels R., Wagenmann M.M., Wardani R.S., Welge-Lussen A., Witterick I., Wright E., Zabolotny D., Zsolt B., Zwetsloot C.P. European position paper on rhinosinusitis and nasal polyps. *Rhinology*, 2020, 2020, Vol. 58, Suppl. S29, pp. 1-464.

11. Gevaert P., Han J.H., Smith S.C., Sousa A.R., Howarth P.H., Yancey S.W., Chan R., Bachert C. The roles of eosinophils and interleukin-5 in the pathophysiology of chronic rhinosinusitis with nasal polyps. *Int. Forum Allergy Rhinol.*, 2022, Vol. 11, pp. 1413-1423.
12. Gevaert P., Lang-Loidolt D., Lackner A., Stammberger H., Staudinger H., van Zele T., Holtappels G., Tavernier J., van Cauwenberge P., Bachert C. Nasal IL-5 levels determine the response to anti-IL-5 treatment in patients with nasal polyps. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2006. Vol. 118, pp. 1133-1141.
13. Heffler E., Malvezzi L., Boita M., Brussino L., de Virgilio A., Ferrando M., Puggioni F., Racca F., Stomeo N., Spriano G.M., Canonica G.W. Immunological mechanisms underlying chronic rhinosinusitis with nasal polyps. 2018. *Expert Rev. Clin. Immunol.*, 2018, Vol. 14, no. 9, pp. 731-737.
14. Kariyawasam H., Scadding G. Chronic rhinosinusitis: therapeutic efficacy of anti-inflammatory and antibiotic approaches. *Allergy Asthma Immunol. Res.*, 2011, Vol. 3, no. 1, pp. 226-235.
15. Kramer M., Ostertag P., Pfrogner E. Nasal interleukin-5, immunoglobulin E, eosinophilic cationic protein, and soluble intercellular adhesion molecule-1 in chronic sinusitis, allergic rhinitis, and nasal polyposis. *Laryngoscope*, 2000, Vol. 110, no. 1, pp. 1056-1062.
16. Toma S., Hopkins C. Stratification of SNOT-22 scores into mild, moderate or severe and relationship with other subjective instruments. *Rhinology*, 2016, Vol. 54, no. 2, pp. 129-133.
17. Ryu G., Kim D.W. Th2 inflammatory responses in the development of nasal polyps and chronic rhinosinusitis. *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.*, 2019, Vol. 20, no. 1, pp. 1-8.
18. van Zele T., Claeys S., Gevaert P. Differentiation of chronic sinus diseases by measurement of inflammatory mediators. *Allergy*, 2006, Vol. 61, no. 1, pp. 1280-1289.
19. Xu J., Han R., Kim D.W., Mo J.-H., Jin Y., Rha K.-S., Kim Y.M. Role of interleukin-10 on nasal polypogenesis in patients with chronic rhinosinusitis with nasal polyps. *PLoS One*, 2016, Vol. 11, no. 9, e0161013. doi: 10.1371/journal.pone.0161013.
20. Zhang Y., Lou H., Wang C. Mechanisms underlying glucocorticoid resistance in chronic rhinosinusitis with nasal polyps. *Zhonghua Er Bi Yan Hou Tou Jing Wai Ke Za Zhi*, 2018, Vol. 53, no. 2, pp. 154-160.

Авторы:

Афлитонов М.А. — к.м.н., доцент кафедры хирургических болезней ФГАОУ ВО «Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта»; заведующий отделением оториноларингологии ГБУЗ «Областная клиническая больница Калининградской области», г. Калининград, Россия

Стрельникова Е.Г. — к.х.н., старший научный сотрудник научно-исследовательской лаборатории хроматографии ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университет имени И.И. Мечникова», Санкт-Петербург, Россия

Безрукова Е.В. — к.м.н., доцент, ученый секретарь, заведующая учебной частью кафедры оториноларингологии ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университет имени И.И. Мечникова», Санкт-Петербург, Россия

Артюшкин С.А. — д.м.н., профессор, заведующий кафедрой оториноларингологии, проректор ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университет имени И.И. Мечникова», Санкт-Петербург, Россия

Варюшина Е.А. — д.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории векторных вакцин ФГБУ «Научно-исследовательский институт гриппа имени А.А. Смородинцева» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Моисеева Е.А. — ассистент кафедры хирургических болезней ФГАОУ ВО «Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта»; врач отделения оториноларингологии ГБУЗ «Областная клиническая больница Калининградской области», г. Калининград, Россия

Authors:

Aflitonov M.A., PhD (Medicine), Associate Professor, Department of Surgical Diseases, I. Kant Baltic Federal University; Head, Department of Otorhinolaryngology, Regional Clinical Hospital of the Kaliningrad Region, Kaliningrad, Russian Federation

Strelnikova E.G., PhD (Chemistry), Senior Research Associate, Research Laboratory of Chromatography, I. Mechnikov North-Western State Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Bezrukova E.V., PhD (Medicine), Associate Professor, Head, Research Department of Otorhinolaryngology Department, I. Mechnikov North-Western State Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Artyushkin S.A., PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Otorhinolaryngology Department, I. Mechnikov North-Western State Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Varyushina E.A., PhD, MD (Biology), Leading Research Associate, Laboratory of Vector Vaccines, A. Smorodintsev Research Institute of Influenza, St. Petersburg, Russian Federation

Moiseeva E.A., Assistant Professor, Department of Surgical Diseases, Immanuel Kant Baltic Federal University, Physician, Department of Otorhinolaryngology, Regional Clinical Hospital of the Kaliningrad Region, Kaliningrad, Russian Federation

РОЛЬ ИЗМЕНЕНИЙ ЦИТОКИНОВОГО СТАТУСА ОКОЛОПЛОДНЫХ ВОД В ПАТОГЕНЕЗЕ ФОРМИРОВАНИЯ НЕСОСТОЯТЕЛЬНОСТИ ПЛОДНЫХ ОБОЛОЧЕК

Дятлова Л.И., Глухова Т.Н.

ЧУОО ВО «Медицинский университет «РЕАВИЗ», г. Саратов, Россия

Резюме. Определение основных звеньев патогенеза формирования несостоятельности плодных оболочек при недоношенной беременности позволит расширить возможности прогнозирования дородового излития околоплодных вод и усовершенствовать выжидательную тактику ведения гестации при преждевременном разрыве плодных мембран. Клиническая значимость изучения данной акушерской проблемы неоспорима ввиду высокого риска осложнений и перинатальных потерь, обусловленных преждевременными родами. Данная научная работа посвящена исследованию изменения цитокинового профиля околоплодных вод при дородовом излитии околоплодных вод в сроках гестации 22-34 недели. Проведено определение показателей провоспалительных (TNF α , IL-6, IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-8) и противовоспалительных (IL-4, IL-10) цитокинов в околоплодных водах у 30 пациенток, недоношенная беременность которых осложнилась преждевременным разрывом плодных оболочек. С целью контроля исследован уровень указанных цитокинов в амниотической жидкости у 25 беременных с физиологическим течением беременности в доношенные сроки гестации. Применены твердофазный иммуноферментный метод (тест-система производства АО «Вектор-Бест». Исследование проведено на базе ГУЗ «Перинатальный центр Саратовской области». Установлено, что преждевременному разрыву плодных оболочек предшествует нарастание уровня провоспалительных цитокинов в амниотической жидкости. Последнее свидетельствует о значимых процессах альтерации в фетоплацентарном комплексе, являющихся пусковым моментом не только для повреждения плодных мембран, но и для развития родовой деятельности.

Ключевые слова: цитокины, дородовое излитие околоплодных вод, преждевременные роды

ROLE OF ALTERED AMNIOTIC FLUID CYTOKINE PROFILE IN DEVELOPMENT OF FETAL MEMBRANE INSUFFICIENCY

Dyatlova L.I., Glukhova T.N.

Reaviz Medical University, Saratov, Russian Federation

Abstract. Studies on pathogenesis of fetal membrane insufficiency in preterm pregnancy should expand the opportunities of predicting prenatal rupture of amniotic fluid and improve the strategy of antipartum gestation management in cases of premature rupture of the fetal membranes. The clinical significance of studying this obstetric problem is unquestionable due to the high risk of complications and perinatal losses caused by preterm birth. This research is devoted to studying the changes in cytokine profile of amniotic fluid during prenatal rupture of amniotic fluid at 22 to 34 weeks of gestation. The levels of pro-inflammatory (TNF α , IL-6, IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-8) and anti-inflammatory (IL-4, IL-10) cytokines in amniotic fluid were determined in 30

Адрес для переписки:

*Дятлова Лариса Ивановна
ЧУОО ВО «Медицинский университет «РЕАВИЗ»
410012, Россия, Саратов, ул. Верхний Рынок, 10.
Тел.: 8 (800) 600-24-00
E-mail: larisady@mail.ru*

Address for correspondence:

*Larisa I. Dyatlova
Reaviz Medical University
10 Verkhniy Rynok St
Saratov
410012 Russian Federation
Phone: +7 (800) 600-24-00.
E-mail: larisady@mail.ru*

Образец цитирования:

*Л.И. Дятлова, Т.Н. Глухова «Роль изменений цитокинового статуса околоплодных вод в патогенезе формирования несостоятельности плодных оболочек» // Медицинская иммунология, 2024. Т. 26, № 2. С. 389-392. doi: 10.15789/1563-0625-ROA-2880
© Дятлова Л.И., Глухова Т.Н., 2024
Эта статья распространяется по лицензии Creative Commons Attribution 4.0*

For citation:

*L.I. Dyatlova, T.N. Glukhova "Role of altered amniotic fluid cytokine profile in development of fetal membrane insufficiency", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2024, Vol. 26, no. 2, pp. 389-392. doi: 10.15789/1563-0625-ROA-2880
© Dyatlova L.I., Glukhova T.N., 2024
The article can be used under the Creative Commons Attribution 4.0 License
DOI: 10.15789/1563-0625-ROA-2880*

patients, whose premature pregnancy was complicated by early rupture of the membranes. For reference, the level of these cytokines in the amniotic fluid was studied in 25 pregnant women with a physiological course of pregnancy at full-term gestation. The ELISA technique was used with a test system produced by JSC Vector-Best. The study was carried out on the basis of the Perinatal Center of the Saratov Region. We have found that premature rupture of the membranes is preceded by increased levels of pro-inflammatory cytokines in amniotic fluid. The latter result suggests a significant alteration in fetoplacental complex, which may be the starting point both for damage to the fetal membranes, as well as for development of labor activity.

Keywords: cytokines, fetal membranes, premature rupture, preterm labor

Введение

В настоящее время одной из наиболее актуальных проблем акушерства являются преждевременные роды. По данным многоцентрового исследования, опубликованного в журнале *The Lancet Global Health* [7], в 25% случаев причиной рождения недоношенного ребенка служит преждевременный разрыв плодных мембран.

По современным представлениям разрыв плодных оболочек является уникальным генетически запрограммированным процессом в сочетании с рядом провоцирующих факторов, таких как сократительная деятельность матки, перерастяжение миометрия при многоплодной беременности и многоводии, хориоамнионит, наследственно обусловленное нарушение синтеза коллагена, активация металлопротеиназ, приводящая к повреждению экстрацеллюлярного матрикса фетальных мембран и т. д.

На основании многочисленных исследований утвердилось мнение, что наиболее значимой причиной преждевременного разрыва околоплодных мембран является восходящее инфицирование, на что указывает идентичность штаммов патогенов, выделенных у плодов и из мочеполовых путей беременных. Бактериальные агенты опосредованно стимулируют выработку простагландинов, повышающих сократительную деятельность матки, одновременно эндотоксины и микробные протеазы активируют экспрессию металлопротеиназ и провоспалительных цитокинов с последующим локальным разрушением коллагена плодных оболочек.

Касаясь биологической значимости цитокинов, следует отметить, что цитокины представляют собой биологически активные вещества-медиаторы короткодистантного межклеточного взаимодействия, в ряде случаев участвующие в системных эффектах при физиологических и типовых патологических процессах в ответ на внедрение в организм патогенов.

Следует отметить, что представления о динамике изменений цитокинового профиля крови и околоплодных вод при физиологических и патологических процессах, в том числе при преждевременном разрыве плодных оболочек при недоношенной гестации, находятся на стадии исследований.

Исходя из вышеизложенного представляет научный и практический интерес определение состояния цитокинового статуса околоплодных вод при недоношенной беременности, осложненной родовым излитием околоплодных вод.

Цель исследования – изучить реактогенные изменения цитокинового статуса околоплодных

вод, инициирующие развитие реакций клеточного и гуморального звеньев иммунитета при недоношенной беременности, осложненной преждевременным разрывом плодных оболочек.

Материалы и методы

Исследование проведено на базе ГУЗ «Перинатальный центр Саратовской области». Основную группу составили 30 пациенток, беременность которых осложнилось родовым излитием околоплодных вод при сроках гестации 22-34 недели. Диагноз преждевременного излития околоплодных вод устанавливали на основании клинических и лабораторных данных, включающих в том числе микроскопическое исследование, определение наличия во влагалище ПАМГ-1 (AmniSure® ROM Test), оценку индекса амниотической жидкости (УЗИ). Для определения содержания в амниотической жидкости прои противоспалительных цитокинов (IL-6, IL-8, IL-1 β , TNF α , IL-2, IL-4, IL-10) использовали твердофазный иммуноферментный метод (тест-система производства АО «Вектор-Бест» (Новосибирская обл.).

С целью сравнения аналогичные исследования околоплодных вод проведены у 25 рожениц при условии физиологического течения беременности и родов в срок.

Статистическая обработка полученных результатов проведена параметрическим методом на персональном компьютере с использованием программы Statistica 6.0.

Результаты и обсуждение

Как известно, цитокины обладают широким биологическим действием. Прежде всего обеспечивают коротко- и длиннодистантные взаимодействия клеток и участвуют не только в специфических иммунных реакциях, но и являются пусковым триггером в формировании типовых патологических реакций, таких как воспаление. Установлена неоспоримая роль цитокинов в процессах имплантации, эмбриогенеза, в формировании экстраэмбриональных структур. В настоящее время существует мнение, что высокая экспрессия провоспалительных цитокинов (TNF, IL-6, IL-1) является необходимым условием для успешной nidации бластоцисты [1]. В последующем многокомпонентные сдвиги гормональных, гуморальных, нервных взаимодействий в сочетании с изменением вектора продукции в фетоплацентарном комплексе в сторону противоспалительных цитокинов (IL-4, IL-10) обеспечивают физиологическое течение беременности [6]. В связи с вышеизложенным представляло

интерес изучить, как изменяется цитокиновый профиль непосредственно в фетоплацентарном комплексе при преждевременном излитии околоплодных вод в 22-34 недели гестации. С этой целью исследованы околоплодные воды у пациенток с изучаемой патологией беременности.

Изучения профиля провоспалительных (TNF α , IL-6, IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-8) и противовоспалительных (IL-4, IL-10) цитокинов позволило установить определенные сдвиги при указанной патологии гестации.

Как оказалось, при дородовом излитии околоплодных вод при сроках гестации 22-34 недели возрастает уровень продукции IL-8, что, как правило, ассоциировано с развитием хронического и острого воспалительного ответа (табл. 1).

В настоящее время достаточно большое внимание уделяется IL-6, как наиболее значимому маркеру воспалительного ответа при различных видах патологии инфекционно-воспалительного характера (табл. 1). Установлено резкое повышение содержания данного цитокина в околоплодных водах при указанной патологии беременности. Касаясь значимости IL-6 при беременности, следует отметить его системное влияние на организм матери и фетоплацентарный комплекс, обеспечивающее активацию гуморального иммунитета, продукцию острофазных белков, гемопоэз. В то же время IL-6 стимулирует синтез IL-2 [4].

Таким образом, повышение продукции IL-8 и IL-6, с одной стороны, свидетельствует о воспалительном ответе инфекционно-аллергического характера в системе «мать-плацента-плод», а с другой стороны – о развитии целого ряда специфических и неспецифических механизмов защитно-приспособительных реакций.

Среди цитокинов TNF α занимает особое место, так как он принимает участие в развитии коагуляционных и микрогемодинамических расстройств прежде всего за счет его вазодилатирующего эффекта. Одновременное возрастание уровня содержания в околоплодных водах TNF α и IL-1 β при изучаемой патологии гестации свидетельствует о

потенциальной возможности развития бактериально-токсического шока (табл. 1). В то же время увеличение продукции IL-6 и IL-1 повышает чувствительность миометрия к окситоцину, что является триггером развития родовой деятельности.

Продуцируемый синцитиотрофобластом, моноцитарно-макрофагальной системой и лимфоидной тканью IL-2 опосредованно через другие провоспалительные цитокины также способствует сократительной активности миоцитов матки. Как известно, IL-2 является T-клеточным фактором роста, обеспечивающим пролиферацию и дифференцировку T-лимфоцитов, тем самым стимулирует клеточно-опосредованный иммунитет. Таким образом, выявленное увеличение продукции IL-2 свидетельствует об ассоциированном Th1 иммунном ответе организма на инфекционные агенты и предвещает развитие родовой деятельности (табл. 1) [2].

Далее наши исследования были посвящены значимости противовоспалительных цитокинов в формировании несостоятельности плодных оболочек. По данным литературы IL-4 относится к B-клеточному фактору роста, продуцируемому Th2 лимфоцитами, тучными клетками, макрофагами и клетками стромы. Как известно, B-клеточный фактор роста оказывает стимулирующее действие на пролиферацию T- и B-лимфоцитов, NK-клеток, продукцию иммуноглобулинов, тем самым обеспечивает противовоспалительный эффект [5]. При изучении количественного содержания IL-4 в околоплодных водах при преждевременном разрыве плодных оболочек при недоношенной беременности установлено снижение его показателей по отношению к группе сравнения (табл. 1).

Аналогичные тенденции снижения уровня противовоспалительных цитокинов определены при исследовании содержания IL-10 в амниотической жидкости при изучаемой патологии гестации. Как известно, IL-2 обладает иммуномодулирующим действием, так как, с одной стороны, стимулирует пролиферацию B-лимфоцитов, про-

ТАБЛИЦА 1. ПОКАЗАТЕЛИ СОДЕРЖАНИЯ ЦИТОКИНОВ В ОКОЛОПЛОДНЫХ ВОДАХ У БЕРЕМЕННЫХ С ПРЕЖДЕВРЕМЕННЫМ РАЗРЫВОМ ОКОЛОПЛОДНЫХ МЕМБРАН ПРИ СРОКАХ ГЕСТАЦИИ 22-34 НЕДЕЛИ

TABLE 1. INDICATORS OF THE CONTENT OF CYTOKINES IN AMNIOTIC FLUID IN PREGNANT WOMEN WITH PREMATURE RUPTURE OF AMNIOTIC MEMBRANES AT GESTATION PERIODS OF 22-34 WEEKS

Показатели уровня цитокинов, пг/мл Cytokine levels, pg/mL	Группы наблюдения / Observation groups				p
	Группа сравнения Comparison group		Беременные с ПРПО Pregnant women with PROM		
	n	M \pm m	n	M \pm m	
TNF α	25	0,050 \pm 0,002	30	1,26 \pm 0,08	< 0,001
IL-1 β	25	–	30	0,18 \pm 0,01	–
IL-2	25	0,09 \pm 0,02	30	1,51 \pm 0,02	< 0,001
IL-4	25	5,04 \pm 0,29	30	4,60 \pm 0,11	< 0,05
IL-6	25	0,30 \pm 0,01	30	1,30 \pm 0,06	< 0,001
IL-8	25	6,65 \pm 0,50	30	58,1 \pm 4,3	< 0,001
IL-10	25	6,31 \pm 0,29	30	4,8 \pm 0,2	< 0,001

Примечание. Показатель p рассчитан по отношению к показателям группы сравнения.

Note. The p indicator is calculated in relation to the indicators of the comparison group.

дукцию ряда иммуноглобулинов (IgE, IgM, IgA), а другой стороны, тормозит секрецию IL-1 β , TNF α , IL-6. Снижение уровня IL-10 в околоплодных водах в основной группе исследования свидетельствовало о дисрегуляции в моноцитарно-макрофагальной и лимфоидной системе фето-плацентарного комплекса при сформировавшейся несостоятельности плодных оболочек.

Заключение

Несостоятельность плодных оболочек при доношенной беременности закономерно сочета-

ется с дисбалансом цитокинового профиля околоплодных вод, характеризующимся возрастанием секреции провоспалительных цитокинов TNF α , IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-8 с одновременным снижением содержания противовоспалительных цитокинов IL-10, IL-4, свидетельствующим о патогенетической взаимосвязи деструктивных процессов в плодных мембранах на фоне индуцибельного синтеза провоспалительных цитокинов. Последнее обусловлено, вероятно, антигенной стимуляцией моноцитарно-макрофагальной и лимфоидных систем на фоне активации медиаторов воспаления гуморального или клеточного происхождения [3].

Список литературы / References

1. Гордеева Л.А., Глушкова О.А., Воронина Е.Н., Шаталина И.В., Шутров А.Е. Ассоциации материнских полиморфизмов генов цитокинов (IL1B, IL1RN, TNF, IL4, IL6) с врожденными пороками развития у плода и новорожденного // Иммунология, 2013. № 6. С. 299 -304. [Gordeeva L.A., Glushkova O.A., Voronina E.N., Shatalina I.V., Shutrov A.E. Associations of maternal polymorphisms of cytokine genes (IL1B, IL1RN, TNF, IL4, IL6) with congenital malformations in the fetus and newborn. *Immunologiya = Immunologiya*, 2013, no. 6, pp. 299-304. (In Russ.)]
2. Литвицкий П.Ф. Патофизиология: учебник: в 2-х т. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2003. Т. 2. 808 с. [Litvitsky P.F. Pathophysiology: textbook: in 2 volumes]. М.: GEOTAR-Media, 2003. Vol. 2. 808 p.
3. Попков В.М., Чеснокова Н.П., Захарова Н.Б., Плохов В.Н., Барсуков В.Ю., Глухова Т.Н., Понукалина Е.В., Моррисон В.В., Норкин И.А., Морозова О.Л., Морозов Д.Н., Шелехова Т.В., Понукалин А.Н., Селезнева Т.Д., Жевак Т.Н., Полугова Н.В., Моррисон А.В., Зяблов Е.В., Агабеков А.И., Злобнова О.А., Дятлова Л.И., Губанова Е.И., Невважай Т.А., Сертакова А.В., Рубашкин С.А., Григорьева Н.А., Никольский Ю.Г., Дурнов Д.А., Лакомова Д.Ю., Тарасова Д.С., Гражданов Р.А., Фомкин Р.Н., Россоловский А.Н., Лях Р.Н., Сергеева О.Н. Цитокины: биологическая роль в развитии реакций адаптации и повреждения в условиях нормы и патологии различного генеза / под общ. ред. В.М. Попкова, Н.П. Чесноковой. Саратов: Изд-во Саратов. гос. мед. ун-та, 2016. 448 с. [Popkov V.M., Chesnokova N.P., Zakharova N.B., Plokhov V.N., Barsukov V.Yu., Glukhova T.N., Ponukalina E.V., Morrison V.V., Norkin I.A., Morozova O.L., Morozov D.N., Shelekhova T.V., Ponukalin A.N., Selezneva T.D., Zhevak T.N., Polutova N.V., Morrison A.V., Zyablov E.V., Agabekov A.I., Zlobnove O.A., Dyatlova L.I., Gubanova E.I., Nevvazhai T.A., Sertakova A.V., Rubashkin S.A., Grigoreva N.A., Nikolskiy Yu.G., Durnov D.A., Lakomova D.Yu., Tarasova D.S., Grazhdanov R.A., Fomkin R.N., Rossolovskiy A.N., Lyakh R.N., Sergeeva O.N. Cytokines: a biological role in the development of adaptation reactions and damage under normal and pathological conditions of various origins. Under total ed. V.M. Popkov, N.P. Chesnokova]. Saratov: Saratov State Medical University, 2016. 448 p.
4. Штыгашева О.В., Агеева Е.С., Иптышев В.М. Роль иммунорегуляторных цитокинов в патогенезе хронического гастрита и язвенной болезни, поиск предикторов заболеваний //Сибирский медицинский журнал, 2011. № 1. С. 88-90. [Shtygasheva O.V., Ageeva E.S., Iptyshev V.M. The role of immunoregulatory cytokines in the pathogenesis of chronic gastritis and peptic ulcer disease, the search for disease predictors. *Sibirskiy meditsinskiy zhurnal = Siberian Medical Journal*, 2011, no. 1, pp. 88-90. (In Russ.)]
5. Ярилин А.А. Иммунология М.: ГЭОТАР-Медиа, 2010. 752 с. [Yarilin A.A. Immunology] Moscow: GEOTAR-Media, 2010. 752 p.
6. Brito H.O., Barbosa F.L., dos Reis R.C., Fraga D., Borges B.S., Franco C.R., Zampronio A.R. Evidence of substance P autocrine circuitry that involves TNF- α , IL-6, and PGE2 in endogenous pyrogen-induced fever. *J. Neuroimmun.*, 2016, Vol. 293, pp. 1-7.
7. Chawla D., Agarwal R. Preterm births and deaths: from counting to classification Preterm births and deaths: from counting to classification. *Lancet Global Health*, 2022. Vol. 10, no. 11, pp. e1537-e1538.

Авторы:

Дятлова Л.И. — д.м.н., профессор кафедры акушерства и гинекологии ЧУОО ВО «Медицинский университет «РЕАВИЗ», г. Саратов, Россия

Глухова Т.Н. — д.м.н., главный научный сотрудник ЧУОО ВО «Медицинский университет «РЕАВИЗ», г. Саратов, Россия

Поступила 10.06.2023

Принята к печати 04.10.2023

Authors:

Dyatlova L.I., PhD, MD (Medicine), Professor, Department of Obstetrics and Gynecology, Reaviz Medical University, Saratov, Russian Federation

Glukhova T.N., PhD, MD (Medicine), Chief Research Associate, Reaviz Medical University, Saratov, Russian Federation

Received 10.06.2023

Accepted 04.10.2023

АНТИТЕЛА К ЦИКЛИЧЕСКОМУ ЦИТРУЛЛИНИРОВАННОМУ ПЕПТИДУ И АНГИОПОЭТИНОПОДОБНЫЙ БЕЛОК 4-ГО ТИПА КАК МАРКЕРЫ ИММУННОГО ВОСПАЛЕНИЯ И ОСТЕОПОРТИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ У БОЛЬНЫХ РЕВМАТОИДНЫМ АРТРИТОМ

Османова Г.Я.^{1,2}, Александров В.А.^{1,2}, Александров А.В.^{1,2},
Шилова Л.Н.¹, Черкесова Е.Г.¹, Александрова Н.В.², Зборовская И.А.²

¹ ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Волгоград, Россия

² ФГБНУ «Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной ревматологии имени А.Б. Зборовского», г. Волгоград, Россия

Резюме. Низкоэнергетические переломы при ревматоидном артрите (РА) чаще встречаются у пациентов с высокой активностью и большой длительностью заболевания, а также с высокими титрами антицитруллинированных антител (АСРА). При воспалительных артритах также отмечено повышение экспрессии ангиопоэтиноподобного белка 4-го типа (ANGPTL4) в костной ткани. Целью исследования был анализ влияния АСРА и ANGPTL4 на системную минеральную плотность кости у пациентов с установленным РА. Антитела к АСРА и содержание ANGPTL4 были протестированы в сыворотке крови 96 больных РА (женщин 91,7%) с помощью иммуноферментного метода. Минеральную плотность поясничных позвонков (BMD_{L1-L4}), шейки бедра и бедренной кости в целом (BMD_{total}) измеряли методом двухэнергетической рентгеновской абсорбциометрии (DXA). В исследуемой группе АСРА и ANGPTL4 были положительными у 61,5% и 41,7% пациентов соответственно. АСРА отрицательно коррелировал с BMD_{total} , а ANGPTL4 – с BMD_{L1-L4} ($p < 0,05$). Разделение пациентов на группы с низкой ($n = 34$) и высокой ($n = 62$) активностью по DAS28 продемонстрировало значимое повышение АСРА с ростом активности РА ($p = 0,042$). Показатели АСРА и ANGPTL4 также были значительно выше в группе больных РА с остеопорозом (ОП) ($n = 45$) по сравнению с таковыми в группе РА без ОП ($n = 51$) ($p = 0,002$ и $p = 0,028$ соответственно). В общей группе больных РА возраст, ин-

Адрес для переписки:

Александров Владислав Андреевич
ФГБНУ «Научно-исследовательский институт
клинической и экспериментальной ревматологии
имени А.Б. Зборовского»
400138, Россия, г. Волгоград, ул. им. Землячки, 76.
Тел.: 8 (8442) 78-90-98, (905) 061-12-23.
E-mail: imlab@mail.ru

Address for correspondence:

Vladislav A. Aleksandrov
A. Zborovskiy Research Institute of Clinical
and Experimental Rheumatology
76 Zemlyachka St
Volgograd
400138 Russian Federation
Phone: +7 (8442) 78-90-98, (905) 061-12-23.
E-mail: imlab@mail.ru

Образец цитирования:

Г.Я. Османова, В.А. Александров,
А.В. Александров, Л.Н. Шилова, Е.Г. Черкесова,
Н.В. Александрова, И.А. Зборовская «Антитела
к циклическому цитруллинированному пептиду
и ангиопоэтиноподобный белок 4-го типа как маркеры
иммунного воспаления и остеопоротических процессов
у больных ревматоидным артритом» // Медицинская
иммунология, 2024. Т. 26, № 2. С. 393-400.
doi: 10.15789/1563-0625-ATC-2862

© Османова Г.Я. и соавт., 2024
Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

G.Ya. Osmanova, V.A. Aleksandrov, A.V. Aleksandrov,
L.N. Shilova, E.G. Cherkesova, N.V. Aleksandrova,
I.A. Zborovskaya "Antibodies to cyclic citrullinated peptide
and angiopoietin-like protein type 4 as markers of immune
inflammation and osteoporotic processes in rheumatoid arthritis
patients", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya
Immunologiya, 2024, Vol. 26, no. 2, pp. 393-400.
doi: 10.15789/1563-0625-ATC-2862

© Osmanova G.Ya. et al., 2024
The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License
DOI: 10.15789/1563-0625-ATC-2862

декс массы тела (ИМТ), длительность и активность заболевания не оказывали значимого влияния на АСРА. Но в группе больных РА с ОП зависимость между АСРА и DAS28 стала достоверной ($\beta = 0,31$, $p = 0,039$). Для ANGPTL4 в общей группе больных РА из всех представленных переменных значимой была только длительность заболевания ($\beta = 0,31$, $p = 0,039$). В регрессионной модели показатель BMD_{total} в равной степени зависел от возраста пациентов ($\beta = -0,28$), ИМТ ($\beta = 0,25$) и уровня АСРА ($\beta = -0,26$). Поиск связи BMD_{L1-L4} с различными характеристиками РА продемонстрировал сильное влияние только ANGPTL4 ($\beta = -0,74$; $R^2 = 0,57$). Обнаруженная зависимость ANGPTL4 и снижения BMD именно в губчатом слое кости позволяет выделить группу пациентов РА с высоким содержанием ANGPTL4 в качестве группы риска именно по переломам позвоночника, и рассмотреть ANGPTL4 в качестве потенциальной мишени для лечения остеопоротических нарушений.

Ключевые слова: ревматоидный артрит, ангиопоэтин-подобный белок 4-го типа, антитела против циклического цитруллинового пептида, минеральная плотность кости, остеопороз, низкотравматичные переломы

ANTIBODIES TO CYCLIC CITRULLINATED PEPTIDE AND ANGIOPOIETIN-LIKE PROTEIN TYPE 4 AS MARKERS OF IMMUNE INFLAMMATION AND OSTEOPOROTIC PROCESSES IN RHEUMATOID ARTHRITIS PATIENTS

Osmanova G.Ya.^{a, b}, Aleksandrov V.A.^{a, b}, Aleksandrov A.V.^{a, b},
Shilova L.N.^a, Cherkesova E.G.^a, Aleksandrova N.V.^b, Zborovskaya I.A.^b

^a Volgograd State Medical University, Volgograd, Russian Federation

^b A. Zborovsky Research Institute of Clinical and Experimental Rheumatology, Volgograd, Russian Federation

Abstract. Low-energy fractures in rheumatoid arthritis (RA) are more common in patients with high activity and long duration of disease, and with high titers of anti-citrullinated antibodies (ACPA). Increased expression of angiopoietin-like protein type 4 (ANGPTL4) in bone tissue has also been noted in inflammatory arthritis. The purpose of the present study was to analyze the effect of ACPA and ANGPTL4 on systemic bone mineral density in RA patients. Antibodies to ACPA and ANGPTL4 content were detected in blood serum of 96 RA patients (women, 91.7%) by enzyme immunoassay. Mineral density of the lumbar vertebrae (BMD_{L1-L4}), hip neck, and entire femur (BMD_{total}) was measured by dual-energy X-ray absorptiometry (DXA). In study group, the ACPA and ANGPTL4 tests were positive in 61.5% and 41.7% of patients, respectively. Negative correlations were shown between ACPA and BMD_{total} , and of ANGPTL4 with BMD_{L1-L4} ($p < 0.05$). Separation of the patients into groups with low ($n = 34$) and high ($n = 62$) DAS28 activity demonstrated a significant increase in ACPA with increasing RA activity ($p = 0.042$). ACPA and ANGPTL4 scores were also significantly higher in the group of 45 RA patients with osteoporosis (OP) compared to the RA group without OP ($n = 51$) showing significant difference at $p = 0.002$ and $p = 0.028$, respectively. Patients' age, body mass index (BMI), duration and activity of the disease had no significant effect on ACPA in the general group of RA patients. However, the correlation between ACPA and DAS28 proved to be significant in the group of RA patients with OP ($\beta = 0.31$, $p = 0.039$). Among all presented variables, the disease duration was the only significant factor for ANGPTL4 in the total group of RA patients ($\beta = 0.31$, $p = 0.039$). In the regression model, BMD_{total} showed similar correlations with patients' age ($\beta = -0.28$), BMI ($\beta = 0.25$), and ACPA level ($\beta = -0.26$). A search for association between BMD_{L1-L4} and various RA characteristics demonstrated a strong correlation with ANGPTL4 only ($\beta = -0.74$; $R^2 = 0.57$). The revealed correlation between ANGPTL4 and decreased BMD specifically in the spongy layer of bone allows us to identify the RA patients with high ANGPTL4 levels as a risk group specifically for spinal fractures thus considering ANGPTL4 as a potential target for treatment of osteoporotic disorders.

Keywords: rheumatoid arthritis, angiopoietin-like protein type 4, anti-citrullinated protein antibodies, bone mineral density, osteoporosis, fragility fractures

Introduction

Rheumatoid arthritis (RA) is the most common joint disease of inflammatory genesis and it is characterized by a symmetrical pattern of arthritis and the appearance of systemic symptoms. Osteoporosis (OP) is a frequent concomitant pathological condition in RA characterized by low bone mass and disruption of bone microarchitectonics [7]. It leads to an increased risk of spontaneous fractures resulting from minimal or even no trauma.

Bone remodeling disorders in RA lead to an imbalance between bone formation and bone resorption, partially due to the effects of chronic inflammation. With the years, osteopenia can progress to OP with increased bone fragility, increased risk of fracture, decreased quality of life, and a poor prognosis, especially in patients on long-term glucocorticoids. It was noted that low-traumatic fractures in RA are more common in patients with high pathological process activity and long duration of the disease, as well as with high titers of anti-citrullinated protein antibodies (ACPA).

Numerous cells, cytokines, molecules and signaling pathways (RANK/RANKL/OPG – receptor activator of nuclear factor (NF)- κ B/and its ligand/osteoprotegerin; Wnt/DKK1/Scl – Wnt, drosophila segment polarity gene wingless and integrated or int-1 of the vertebrate homolog/Dickkopf-1/Sclerostin) are involved in the disbalanced bone remodeling process in RA and directly depend on the interaction between inflammatory and immune systems. Inflammatory cytokines (such as TNF α , IL-6, IL-1) stimulate osteoclastogenesis while disrupting osteoblastogenesis [5]. Autoantibodies are also involved in the pathogenesis of bone resorption in RA. ACPA can have a direct and independent effect on osteoclasts, becoming a significant factor in the loss of bone mass. Vimentin protein is an important target in the pathogenesis of RA, and antibodies to citrullinated vimentin are probably capable of playing an initial role in the progression of systemic osteoporosis [9].

ACPA, rheumatoid factor (RF), and C-reactive protein (CRP) ≥ 0.3 mg/dL predict progression of bone erosion and cartilage destruction in RA [1]. A recent study showed that seropositivity for RF and/or ACPA influences systemic bone loss in patients with RA, with different effects of ACPA and/or RF on osteoclastogenesis in cortical and cancellous bone regions [14]. However, longitudinal assessments of changes in bone mineral density (BMD) in RA patients are inconsistent and involve multiple factors (inflammation, disease activity, use of glucocorticoids, etc.).

The existing methods of determining markers of bone synthesis and resorption are not sufficiently informative to determine the correlation between immune inflammation and osteoporotic processes in bone in RA. A number of cytokines (IL-6, IL-8, IL-11, IL-15, RANKL) and adipokines (chimerin, nesfatin, angiopoietin-like proteins) have been proposed as potential markers of bone and articular cartilage destruction. Angiopoietin-like protein 4 (ANGPTL4) belongs to the family of circulating angiopoietin-like proteins that are active in various body cells and are thought to be involved in repairing and remodeling damaged tissue. The C-terminal fibrinogen-like domain of ANGPTL4 is able to interact with extracellular matrix receptors through the N-linked glycan chain, selectively preventing the activation of the cytokine cascade in endothelial cells and inhibiting the process of neovascularization. ANGPTL4 supports cartilage matrix degradation through increased secretion of inflammatory factors and matrix metalloproteinase [8]. Increased ANGPTL4 expression in bone tissue (in both osteoclasts and osteoblasts) has been noted in inflammatory arthritis, especially in hypoxia [10]. Our earlier preliminary study of the role of ANGPTL4 in increasing bone resorption and the development of osteopenia in patients with RA showed a negative correlation between ANGPTL4 and bone mineral density in the spine [3].

The purpose of this study was to analyze the effect of ACPA and ANGPTL4 on systemic bone mineral density in patients with established RA.

Materials and methods

All patients included in the study met the criteria of the 2010 ACR/EULAR diagnostic classification of RA. Exclusion criteria were: the presence of other autoimmune diseases, hyperthyroidism, diabetes mellitus and malignant neoplasm of any localization; severe liver and kidney dysfunction; long-term use of drugs that affect bone metabolism; pregnant or lactating women; the presence of signs of acute bacterial and viral infection at the time of the study.

A total of 96 patients with RA (91.7% women and 8.3% men) aged 29 to 75 years old were examined. Clinical and laboratory characteristics of RA patients are presented in Table 1.

Physical examination of patients included anthropometry with determination of body mass index (BMI), collection of medical history, and assessment of disease activity according to DAS index²⁸. Blood samples were collected in the morning after an overnight fast (at least 12 hours) in order to minimize daily

TABLE 1. CLINICAL AND LABORATORY CHARACTERISTICS OF RA PATIENTS

Studied indicator	Value	%
Age, years	55.4±10.7	
Patients under the age of 50		33.3
Duration of RA, years	9.0 (3.0-15.5)	
Patients with RA duration < 5 years		30.2
RA activity by DAS28-ESR, points	3.48±1.12	
Patients with moderate RA activity (3.2 < DAS28 ≤ 5.1)		57.3
Seropositivity for RF and/or ACPA		76.0
Presence of erosions		77.1
Body mass index, points	28.50±6.07	
Smoked at the time of the study		7.29
Treatment with biological anti-rheumatic drugs		4.17
Treatment with glucocorticoids > 3 months		61.5

Note. Values are presented as mean ± standard deviation (M±SD) for parametric variables, median and quartiles 1 and 3 (Me (Q_{0.25}-Q_{0.75})) for nonparametric continuous variables; as percentage of total sample (%) for categorical variables.

fluctuations in the determined values, and were stored at -80 °C until analysis. Erythrocyte sedimentation rate (ESR, mm/h) by Westergren method, C-reactive protein (mg/L) and rheumatoid factor (IU/mL) were evaluated by standard laboratory procedures. Serum analysis included required tests for antibodies to cyclic citrullinated peptide (Anti-CCP hs; Orgentec Diagnostika, Germany) and angiopoietin-like protein type 4 (RayBio Human ANGPTL4 ELISA Kit, RayBiotech, USA), which were quantified by ELISA according to kit manufacturer instructions.

The mineral density of the lumbar vertebrae at the level of L1-L4 (BMD_{L1-L4}), femoral neck, and femur (BMD_{total}) in general was measured by dual-energy X-ray absorptiometry (DXA) on a Lunar Prodigy (GE, USA). Each patient's BMD was compared with the average BMD of healthy young adults of the same sex. The default diagnostic threshold for OP was T-criterion: T points ≥ -1 were considered normal bone density, T points between < -1 and > -2.5 as osteopenia, and T points ≤ -2.5 as OP.

Statistical analysis was performed using STATISTICA 10.0 software (StatSoft Inc., USA) and Microsoft Office Excel (Microsoft Corp., USA). The studied indicators were preliminarily checked for normal distribution. The data are presented as mean ± standard deviation (M±SD) or median (Quartile 1, Quartile 3) (Me (Q_{0.25}-Q_{0.75})), as appropriate. Data for categorical variables were expressed as absolute

numbers and percentages. Spearman's correlation coefficient (r) was used to determine the correlations between the variables. The comparison of proportions between the study groups was analyzed using the chi-square test (χ²). Mann-Whitney U test (U test) and Kruskal-Wallis ANOVA test (H test) were used to compare data groups. We used univariate analysis followed by multivariate logistic regression analysis of variables with p < 0.1 to analyze influencing factors. The data with a probability value less than 0.05 (p < 0.05) were considered statistically significant.

Results and Discussion

The average serum ACPA concentration of RA patients was 64.7 (8.4-778) ng/mL, ANGPTL4 was 1.82 (0.56-10.7) ng/mL. In the studied group of RA patients ACPA and RF-IgM were positive in 61.5% and 69.8% of patients, respectively. The upper limit of normal (M+3SD) equal to 3.17 ng/mL was established after determination of ANGPTL4 in serum of 48 practically healthy persons comparable by sex and age with the studied group of RA patients. 41.7% of RA patients were found positive for ANGPTL4.

No correlation between ACPA and ANGPTL4 was observed neither in the general group of RA patients (p > 0.1), nor in individual patient groups depending on sex, age (< and > 50 years), duration of disease, presence of erosions, and RF-IgM

TABLE 2. ACPA AND ANGPTL4 LEVELS IN RA PATIENTS DEPENDING ON THE PRESENCE OF SECONDARY OSTEOPOROSIS

Indicator	Group I	Group II
ACPA, units/mL	15.5 (7.05-139.00)	252 (25.8-1028.0)**
ANGPTL4, ng/mL	0.98 (0.46-3.47)	3.53 (0.68-12.10)*

Note. ACPA, antibodies against cyclic citrullinated peptide; ANGPTL4, angiopoietin-like protein type 4; intergroup differences: *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$.

seropositivity ($p > 0.05$). ACPA was positively correlated with RF ($r = 0.3$), DAS28 ($r = 0.22$) and negatively with BMD_{total} ($r = -0.26$); for all measures $p < 0.05$. ANGPTL4 was positively correlated with RF ($p = 0.32$), disease duration ($p = 0.23$) and negatively with BMD_{L1-L4} ($r = -0.69$); for all measures $p < 0.05$.

When comparing groups of patients with different RA activity no significant differences in ACPA content (H test = 6.1, $p = 0.11$) and ANGPTL4 (H test = 2.9, $p = 0.41$) were obtained. This is probably associated with significant prevalence of patients with moderate disease activity. The separation of patients into groups with low ($DAS28 \leq 3.2$, $n = 34$) and high ($DAS28 > 3.2$, $n = 62$) RA activity demonstrated a significant increase in ACPA with increasing activity of the pathological process (U test = 2.03, $p = 0.042$). No significant changes were found for ANGPTL4 (U test = 1.68, $p = 0.093$).

Patients were divided into two groups according to BMD of the lumbar or bilateral hip joint and the presence of a history of low-energy fractures: group I – RA without OP (RA/OP⁻; $n = 51$); group II – RA with OP (RA/OP⁺; $n = 45$). Patients did not differ by gender ($p = 0.11$), DAS28 index ($p = 0.39$), BMI ($p = 0.07$), presence of erosions ($p = 0.88$) and seropositivity for RF ($p = 0.35$), but the second group included older patients ($p = 0.018$), with greater duration of disease ($p = 0.03$) and inflammatory indices (CRP and ESR, $p < 0.05$). ACPA and ANGPTL4 scores were significantly higher in the RA/OP⁺ group compared with those in the RA/OP⁻ group (U test: $Z = 3.08$, $p = 0.002$ and $Z = 2.2$, $p = 0.028$, respectively) (Table 2).

ACPA-positivity can be considered as a specific risk factor for systemic bone mass loss, and potentiation of ACPA effects on osteoclastogenesis is observed in the presence of RF [4]. This probably results from the generation of immune complexes with ACPA and the resulting stimulation of osteoclast activation and cytokine production in macrophages. Osteoclast-mediated bone destruction in RA is regulated by immune cells and their cytokines as well as ACPA [6] and possibly ANGPTL.

Next, a regression analysis was performed using the new characteristics of the studied factors (the linear character of the correlation between the variables was ensured). Factors influencing ACPA and ANGPTL4 with $p < 0.1$ were included in a multivariate logistic regression analysis.

In the general group of RA patients, age, BMI, duration and activity of the disease had no significant effect on ACPA. But in the RA/OP⁺ group, the correlation between ACPA and DAS28 became significant ($\beta = 0.31$, $p = 0.039$). Of all the variables presented, only disease duration was significant for ANGPTL4 content in the overall group of RA patients ($\beta = 0.31$, $p = 0.039$). The effect of this factor on ANGPTL4 was more pronounced in the RA/OP⁻ group ($\beta = 0.35$, $p = 0.012$), but not in the RA/OP⁺ group ($p = 0.79$).

ACPA is known as a risk factor not only for joint destruction in patients with RA, but also for bone mass loss, especially in the proximal femur [12]. This relationship was also confirmed in our study. In the regression model, femoral BMD was almost equally dependent on patient age ($\beta = -0.28$), BMI ($\beta = 0.25$), and ACPA level ($\beta = -0.26$). The square of the multiple correlation coefficient (R^2) in this model was 0.22. The search for associations between BMD_{L1-L4} and other RA characteristics (age, disease duration and activity, BMI, RF level, CRP, ANGPTL4 and ACPA) showed a strong influence only of ANGPTL4 ($\beta = -0.74$), with an R^2 value for the whole model equal to 0.57.

In a review by D'Onofrio B. et al. the main specific risk factors for osteoporotic fractures in RA are activity and duration of the disease, presence of disability and use of glucocorticoids, but not the presence of any autoantibodies [4]. Reduced BMD correlated with the presence of autoantibodies is only one possible link in the multifactorial process of osteoporotic fracture and cannot fully explain the relationship between autoantibodies and low-energy vertebral fractures in RA [13].

ANGPTL4 actively promotes lipid metabolism by inhibiting lipoprotein lipase and hepatic lipase activity, in addition to regulating inflammation and

TABLE 3. CORRELATION COEFFICIENTS BETWEEN ACPA, ANGPTL4 AND BMD VALUES IN DIFFERENT BONE SECTIONS

Indicator	ACPA		ANGPTL4	
	Coefficient	p	Coefficient	p
BMD_{total}	a = 0.9365 b = -0.015	< 0.001 0.048	a = 0.8858 b = -0.012	< 0.001 0.234
BMD_{L1-L4}	a = 1.0223 b = -0.003	< 0.001 0.729	a = 1.0596 b = -0.076	< 0.001 < 0.001

Note. ACPA, antibodies against cyclic citrullinated peptide; ANGPTL4, angiotensin-like protein type 4; BMD_{total}, femoral bone mineral density; BMD_{L1-L4}, spinal bone mineral density at L1-L4 level; a, b, nonlinear relationship equation factors.

participating in metabolic processes. Whole-genome association studies have shown an association of ANGPTL4 with triglyceride, triglyceride-rich lipoprotein cholesterol, and low-density lipoprotein cholesterol levels. Plasma ANGPTL4 is negatively correlated with high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C) [11]. In addition, HDL-C, after adjusting for sex, age, and BMI, was a predictor of the development of OP in RA patients [15]. A detailed evaluation of the potential importance of ANGPTL4 for the prevention and treatment of patients with spinal OP remains to be performed.

At the final stage of the study, we evaluated the coefficients of nonlinear dependence equations of immune inflammation markers and osteoporotic processes (Table 3).

Both coefficients were highly significant in describing the power equation ($y = ax^b$) for the relationship between BMD_{total} and ACPA, as well as for BMD_{L1-L4} and ANGPTL4. ACPA levels can reliably predict BMD_{total}: $BMD_{total} = 0,936x[ACPA]^{-0,015}$, and serum ANGPTL4 levels predict BMD_{L1-L4} : $BMD_{L1-L4} = 1,06x[ANGPTL4]^{-0,076}$.

Along with the opinion that RA patients are particularly prone to cortical bone layer OP (especially the femoral neck) and that they have a greater predisposition to periarticular bone loss having elevated levels of ACPA [2], many studies present conflicting results (depending on the patient groups analyzed, fracture rates vary from 8 to 49%) in reducing BMD and vertebral fracture rates [4]. The dependence of ANGPTL4 and reduction of BMD in the cancellous bone layer allow us to identify a group of RA patients with high ANGPTL4 content as a risk group specifically for spinal fractures, and to consider ANGPTL4 as a potential target for the treatment of osteoporotic disorders.

Biomarkers remain powerful tools to predict BMD changes, targeting each skeletal anatomical region individually to help prevent low-energy fractures in patients with RA. However, the detection of the

dependence of various biomarkers and quantitative indicators of bone tissue (mass or bone density) does not allow us to judge with the same confidence the changes in qualitative characteristics of bone (such as bone strength), which the new technologies are aimed at assessing.

Despite a number of limitations of this study (single-center cross-sectional study; no data on the postmenopausal status of patients; no consideration of the effects of the drugs used on immune cells and bone metabolism), gaining new knowledge about any possible mechanisms of secondary osteoporosis in RA will help make decisions about intervention early in the primary disease and prevent serious complications associated with osteoporotic fractures.

Conclusion

Apparently, in order to track systemic bone loss in RA even before the clinical debut of the disease, initial OP screening using DXA and calculation of the estimated 10-year risk of osteoporotic fractures by FRAX should be performed with special attention not only in ACPA-positive patients [2], but also in RA patients with high serum ANGPTL4 values. To prevent loss of systemic bone mass (especially in the femur) in ACPA-positive patients the focus should be on reducing disease activity, and in ANGPTL4-positive patients on timely prescription of anti-osteoporotic medications.

Acknowledgments

The authors are grateful to the staff of the Volgograd Center for Diagnostics and Treatment of Osteoporosis (chief Polyakova Yu.V.) for their help in collecting clinical materials, as well as to the staff of the Department of Clinical Laboratory Diagnostics of Volgograd Medical University (chief Zavodovsky B.V.) for methodical assistance in conducting laboratory tests.

References

1. Abdelhafiz D., Baker T., Glasgow D.A., Abdelhafiz A. Biomarkers for the diagnosis and treatment of rheumatoid arthritis – a systematic review. *Postgrad. Med.*, 2023, Vol. 135, no. 3, pp. 214-223.
2. Adami G., Saag K.G. Osteoporosis pathophysiology, epidemiology, and screening in rheumatoid arthritis. *Curr. Rheumatol. Rep.*, 2019, Vol. 21, no. 7, 34. doi: 10.1007/s11926-019-0836-7.
3. Aleksandrov V.A., Shilova L.N., Aleksandrov A.V., Osmanova G.Y., Aleksandrova N.V., Zborovskaya I.A. The decrease in bone mineral density depends on the concentrations of angiopoietin-like protein type 4 in patients with rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.*, 2021, Vol. 80, no. S1, 225. doi: 10.1136/annrheumdis-2021-eular.2266.
4. D'Onofrio B., di Lernia M., de Stefano L., Bugatti S., Montecucco C., Bogliolo L. Personalized therapeutic strategies in the management of osteoporosis in patients with autoantibody-positive rheumatoid arthritis. *J. Clin. Med.*, 2022, Vol. 11, no. 9, 2341. doi: 10.3390/jcm11092341
5. Fang Q., Zhou C., Nandakumar K.S. Molecular and cellular pathways contributing to joint damage in rheumatoid arthritis. *Mediators Inflamm.*, 2020, Vol. 2020, 3830212. doi: 10.1155/2020/3830212.
6. Jung Y.K., Kang Y.M., Han S. Osteoclasts in the inflammatory arthritis: implications for pathologic osteolysis. *Immune Netw.*, 2019, Vol. 19, no. 1, e2. doi: 10.4110/in.2019.19.e2.
7. Klose-Jensen R., Tse J.J., Keller K.K., Barnabe C., Burghardt A.J., Finzel S., Tam L.S., Hauge E.M., Stok K.S., Manske S.L. High-resolution peripheral quantitative computed tomography for bone evaluation in inflammatory rheumatic disease. *Front. Med.*, 2020, Vol. 7, 337. doi: 10.3389/fmed.2020.00337.
8. Liu F.J., Xie L.Y., Li H.Z., Cao S.N., Chen Y.Z., Bin-Shi, Wang D.D. Expression of ANGPTL4 in nucleus pulposus tissues is associated with intervertebral disc degeneration. *Dis. Markers*, 2021, Vol. 2021, 3532716. doi: 10.1155/2021/3532716.
9. Llorente I., García-Castañeda N., Valero C., González-Álvaro I., Castañeda S. Osteoporosis in rheumatoid arthritis: dangerous liaisons. *Front. Med. (Lausanne)*, 2020, Vol. 7, 601618. doi: 10.3389/fmed.2020.601618.
10. Masuko K. Angiopoietin-like 4: A molecular link between insulin resistance and rheumatoid arthritis. *J. Orthop. Res.*, 2017, Vol. 35, no. 5, pp. 939-943.
11. Olshan D.S., Rader D.J. Angiopoietin-like protein 4: A therapeutic target for triglycerides and coronary disease? *J. Clin. Lipidol.*, 2018, Vol. 12, no. 3, pp. 583-587.
12. Tomizawa T., Ito H., Murata K., Hashimoto M., Tanaka M., Murakami K., Nishitani K., Azukizawa M., Okahata A., Doi K., Saito M., Furu M., Hamaguchi M., Mimori T., Matsuda S. Distinct biomarkers for different bones in osteoporosis with rheumatoid arthritis. *Arthritis Res. Ther.*, 2019, Vol. 21, no. 1, 174. doi: 10.1186/s13075-019-1956-1.
13. Wysham K.D., Baker J.F., Shoback D.M. Osteoporosis and fractures in rheumatoid arthritis. *Curr. Opin. Rheumatol.*, 2021, Vol. 33, pp. 270-276.
14. Yu S.F., Chen J.F., Chen Y.C., Wang Y.W., Hsu C.Y., Lai H.M., He H.R., Ko C.H., Chiu W.C., Cheng T.T. The impact of seropositivity on systemic bone loss in rheumatoid arthritis—a 3-year interim analysis of a longitudinal observational cohort study. *Front. Med. (Lausanne)*, 2022, Vol. 9, 885801. doi: 10.3389/fmed.2022.885801.
15. Zeng T., Tan L., Yu J., Wu Y. High density lipoprotein in rheumatoid arthritis: emerging role in predicting inflammation level and osteoporosis occurrence. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, 2020, Vol. 80, no. 5, pp. 375-380.

Авторы:

Османова Г.Я. — ассистент кафедры госпитальной терапии ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ; младший научный сотрудник, ФГБНУ «Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной ревматологии имени А.Б. Зборовского», г. Волгоград, Россия

Александров В.А. — ассистент кафедры госпитальной терапии ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ; младший научный сотрудник, ФГБНУ «Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной ревматологии имени А.Б. Зборовского», г. Волгоград, Россия

Authors:

Osmanova G. Ya., Assistant Professor, Department of Hospital Therapy, Volgograd State Medical University; Junior Research Associate, A. Zborovsky Research Institute of Clinical and Experimental Rheumatology, Volgograd, Russian Federation

Aleksandrov V.A., Assistant Professor, Department of Hospital Therapy, Volgograd State Medical University; Junior Research Associate, A. Zborovsky Research Institute of Clinical and Experimental Rheumatology, Volgograd, Russian Federation

Александров А.В. — д.м.н., доцент, профессор кафедры клинической лабораторной диагностики ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ; заведующий лабораторией функциональных методов исследования, ультразвуковой диагностики и восстановительной терапии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной ревматологии имени А.Б. Зборовского», г. Волгоград, Россия

Шилова Л.Н. — д.м.н., доцент, заведующая кафедрой госпитальной терапии ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Волгоград, Россия

Черкесова Е.Г. — к.м.н., доцент кафедры госпитальной терапии ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Волгоград, Россия

Александрова Н.В. — к.м.н., старший научный сотрудник, ФГБНУ «Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной ревматологии имени А.Б. Зборовского», г. Волгоград, Россия

Зборовская И.А. — д.м.н., профессор, директор ФГБНУ «Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной ревматологии имени А.Б. Зборовского», г. Волгоград, Россия

Aleksandrov A.V., PhD, MD (Medicine), Professor, Department of Clinical Laboratory Diagnostics, Volgograd State Medical University; Head, Laboratory of Functional Research Methods, Ultrasound Diagnostics and Rehabilitation Therapy, A. Zborovsky Research Institute of Clinical and Experimental Rheumatology, Volgograd, Russian Federation

Shilova L.N., PhD, MD (Medicine), Associate Professor, Head, Department of Hospital Therapy, Volgograd State Medical University, Volgograd, Russian Federation

Cherkesova E.G., PhD (Medicine), Associate Professor, Department of Hospital Therapy, Volgograd State Medical University, Volgograd, Russian Federation

Aleksandrova N.V., PhD (Medicine), Senior Research Associate, A. Zborovsky Research Institute of Clinical and Experimental Rheumatology, Volgograd, Russian Federation

Zborovskaya I.A., PhD, MD (Medicine), Professor, Director, A. Zborovsky Research Institute of Clinical and Experimental Rheumatology, Volgograd, Russian Federation

Поступила 24.04.2023
Принята к печати 07.05.2023

Received 24.04.2023
Accepted 07.05.2023

ВЛИЯНИЕ ПРОИЗВОДНОГО ПИРИМИДИНА НА УРОВЕНЬ ЦИТОКИНОВ В УСЛОВИЯХ СТРЕПТОКОККОВОЙ РАНЕВОЙ ИНФЕКЦИИ

Цибизова А.А.¹, Ясенявская А.Л.¹, Тюренков И.Н.², Озеров А.А.²,
Самотруева М.А.¹

¹ ФГБОУ ВО «Астраханский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Астрахань, Россия

² ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Волгоград, Россия

Резюме. Заболевания, вызванные *Streptococcus pyogenes*, являются одной из значимых проблем практического здравоохранения, в связи со способностью данного патогена вызывать заболеваемость во всех возрастных группах населения с развитием различных осложнений. Отмечено, что стрептококковая инфекция сопровождается наряду с инфекционно-воспалительными симптомами, выраженным иммунным ответом на *Streptococcus pyogenes*, что опосредовано функциональной активностью моноцитов и дендритных клеток, отвечающих за продукцию про- и противовоспалительных цитокинов, регулирующих взаимодействие, пролиферацию и функциональную активность всех участников клеточного и гуморального звеньев иммунитета. Разработка новых противомикробных средств, обладающих, наряду с антибактериальной активностью, иммуностимулирующим действием, является актуальной задачей. Цель данного исследования является изучение влияния пиримидинового производного на уровень про- (IL-1 β , IL-6, IL-8) и противовоспалительных интерлейкинов (IL-4, IL-10) в условиях экспериментальной стрептококковой раневой инфекции. Изучение влияния производного пиримидина 3-[2-[(4,6-диметилпиримидин-2-ил)амино]-2-оксоэтил]хиназолин-4(3H)-он (VMA-13-14) проводилась в условиях *in vivo* на модели стрептококковой раневой инфекции. Эксперименты проводили на мышах линии СВА 3-месячного возраста (20-22 г). Животные были разделены на группы: контроль I – здоровые животные, которым вводили воду для инъекций; контроль II – инфицированные нелеченные животные; опыт I – животные, которым в качестве лечения вводили внутривенно производное пиримидина в дозе 36 мг/кг в течение 7 дней, начиная с первого дня заражения; опыт II – животные, которым в качестве лечения вводили внутривенно препарат сравнения цефепим в средней терапевтической дозе 50 мг/кг в том же режиме, что и исследуемое соединение. После выведения мышей из эксперимента определяли уровни про- и противовоспалительных интерлейкинов в сыворотке крови методом иммуноферментного анализа. В исследовании было установлено, что пиримидиновое производное 3-[2-[(4,6-диметилпиримидин-2-ил)амино]-2-оксоэтил]хиназолин-4(3H)-он в условиях стрептококковой раневой инфекции оказывает иммунорегуляторное действие,

Адрес для переписки:

Ясенявская Анна Леонидовна
ФГБОУ ВО «Астраханский государственный
медицинский университет» Министерства
здравоохранения РФ
414000, Россия, г. Астрахань, ул. Бакинская, 121.
Тел.: 8 (917) 188-04-10.
E-mail: yasen_9@mail.ru

Address for correspondence:

Anna L. Yasenyavskaya
Astrakhan State Medical University
121 Bakinskaya St
Astrakhan
414000 Russian Federation
Phone: +7 (917) 188-04-10.
E-mail: yasen_9@mail.ru

Образец цитирования:

А.А. Цибизова, А.Л. Ясенявская, И.Н. Тюренков,
А.А. Озеров, М.А. Самотруева «Влияние производного
пиримидина на уровень цитокинов в условиях
стрептококковой раневой инфекции» // Медицинская
иммунология, 2024. Т. 26, № 2. С. 401-406.
doi: 10.15789/1563-0625-EOA-2705

© Цибизова А.А. и соавт., 2024

Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

A.A. Tsybizova, A.L. Yasenyavskaya, I.N. Tyurenkov,
A.A. Ozerov, M.A. Samotrueva "Effect of a pyrimidine
derivative on the level of cytokines in conditions of
streptococcal wound infection", Medical Immunology
(Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2024, Vol. 26, no. 2,
pp. 401-406. doi: 10.15789/1563-0625-EOA-2705

© Tsybizova A.A. et al., 2024

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

DOI: 10.15789/1563-0625-EOA-2705

проявляющееся в снижении провоспалительных и увеличении противовоспалительных интерлейкинов. Следует отметить, что выраженное воздействие производного пиримидина относительно препарата сравнения (Цефепим) на уровни интерлейкинов может быть связано с бактериостатическим действием исследуемого соединения, так как усиление интоксикации при быстрой гибели микроорганизмов в результате воздействия бактерицидных средств может усугублять течение инфекционно-воспалительного процесса.

Ключевые слова: *Streptococcus pyogenes*, экспериментальная стрептококковая инфекция, противомикробная активность, иммуотропное действие, интерлейкины, производное пиримидина

EFFECT OF A PYRIMIDINE DERIVATIVE ON THE LEVEL OF CYTOKINES IN CONDITIONS OF STREPTOCOCCAL WOUND INFECTION

Tsybizova A.A.^a, Yasenyavskaya A.L.^a, Tyurenkov I.N.^b, Ozerov A.A.^b, Samotrueva M.A.^a

^a Astrakhan State Medical University, Astrakhan, Russian Federation

^b Volgograd State Medical University, Volgograd, Russian Federation

Abstract. Diseases caused by *Streptococcus pyogenes* are one of the significant problems of practical health care, due to the ability of this pathogen to cause morbidity in all age groups of the population with the development of different complications. The streptococcal infection is accompanied, along with infectious and inflammatory symptoms, by a pronounced immune response to *Streptococcus pyogenes*, which is mediated by the functional activity of monocytes and dendritic cells responsible for the production of pro- and anti-inflammatory cytokines that regulate the interaction, proliferation and functional activity of all participants in the cellular and humoral links of immunity. The purpose is to study the effect of a pyrimidine derivative on the level of pro- (IL-1 β , IL-6, IL-8) and anti-inflammatory interleukins (IL-4, IL-10) in conditions of experimental streptococcal wound infection. The study of the effect of the pyrimidine derivative 3-[2-[(4,6-dimethylpyrimidin-2-yl)amino]-2-oxoethyl]quinazolin-4(3H)-one was carried out *in vivo* on the model streptococcal wound infection. The experiments were carried out on CBA mice 3 months old (20-22 g). Animals were divided into groups: control I – healthy animals, which were injected with water for injection; control II – infected untreated animals; experience I – animals that were treated intraperitoneally with a pyrimidine derivative at a dose of 36 mg/kg for 7 days, starting from the first day of infection; experiment II – animals that were treated intraperitoneally with the reference drug cefepime at an average therapeutic dose of 50 mg/kg in the same regimen as the test compound. The levels of pro- and anti-inflammatory interleukins in blood serum were determined by enzyme immunoassay. The study found that the pyrimidine derivative 3-[2-[(4,6-dimethylpyrimidin-2-yl)amino]-2-oxoethyl]quinazolin-4(3H)-one under conditions of streptococcal wound infection has an immunoregulatory effect, manifested in a decrease in pro-inflammatory and an increase in anti-inflammatory interleukins.

Keywords: *Streptococcus pyogenes*, experimental streptococcal infection, antimicrobial activity, immunotropic action, interleukins, pyrimidine derivative

Работа выполнена в рамках государственного задания Министерства здравоохранения Российской Федерации в части проведения НИР по теме «Поиск и разработка перспективных соединений с антибактериальной активностью среди производных пиримидина для создания лекарственных препаратов» 48.2-2021.

Введение

Заболевания, вызванные *Streptococcus pyogenes*, являются одной из значимых проблем практического здравоохранения, в связи со способно-

стью данного патогена вызывать заболеваемость во всех возрастных группах населения с развитием таких осложнений, как системное воспалительное заболевание соединительной ткани, воспалительное заболевание почек, септицемия и синдрома токсического шока, а также с высокой неэффективностью антибактериальной терапии [11]. Отмечено, что стрептококковая инфекция сопровождается наряду с инфекционно-воспалительными симптомами, выраженным иммунным ответом на *Streptococcus pyogenes*, что опосредовано функциональной активностью

моноцитов и дендритных клеток, отвечающих за продукцию про- и противовоспалительных цитокинов, регулирующих взаимодействие, пролиферацию и функциональную активность всех участников клеточного и гуморального звеньев иммунитета [4, 10]. Сложность патогенеза инфекции, возбудителем которой является *S. pyogenes*, связана с наличием у него большого количества факторов патогенности. Установлено, что клеточно-ассоциированные факторы (М-белок, Fc-связывающие белки и др.) обеспечивают антифагоцитарные свойства стрептококка, в то время как экстрацеллюлярные факторы (стрептолизины, пирогенные экзотоксины и др.) – вызывают продукцию провоспалительных цитокинов, таких как TNF α , IL-1 β , IL-6 и др., усугубляя инфекционно-воспалительный процесс [1, 6, 14]. Исследования факторов патогенности, и регуляторных механизмов являются важной задачей научного поиска, направленного на понимание сложной функциональной организации возбудителя в условиях взаимодействия с макроорганизмом [2].

Принимая во внимание вышеописанное, разработка новых противомикробных средств, обладающих, наряду с антибактериальной активностью, иммуностропным действием, является актуальной задачей. В качестве таких средств могут быть предложены пиримидиновые производные. Установлено, что соединения, содержащие в своей химической формуле пиримидиновое кольцо, обладают широким спектром фармакологической активности, оказывая психотропное, гипотензивное, антиоксидантное, метаболическое, противовоспалительное, регенераторное, иммуностропное, а также противомикробное действие [5, 8, 9]. Отмечено, что пиримидиновые соединения оказывают влияние на уровень про- и противовоспалительных цитокинов в условиях генерализованной инфекции [7]. Одним из таких соединений является пиримидиновое производное, синтезированное учеными Волгоградского государственного медицинского университета, 3-[2-[(4,6-диметилпиримидин-2-ил)амино]-2-оксоэтил]хиназолин-4(3H)-он.

Цель – изучить влияние пиримидинового производного на уровень про- (IL-1 β , IL-6, IL-8) и противовоспалительных интерлейкинов (IL-4, IL-10) в условиях экспериментальной стрептококковой раневой инфекции.

Материалы и методы

Изучение влияния производного пиримидина 3-[2-[(4,6-диметилпиримидин-2-ил)амино]-2-оксоэтил]хиназолин-4(3H)-он (VMA-13-14) проводилась в условиях *in vivo* на модели стрептококковой раневой инфекции. *S. pyogenes* получен от пациентов с инфекционной патологией кожных

покровов, получавших лечение в хирургическом отделении ГБУЗ АО «ГКБ №3», г. Астрахань. Идентификацию *S. pyogenes* и подсчет колоний осуществляли с помощью микробиологического анализатора BIOMIC V3 (Giles Scientific, США).

Эксперименты в условиях *in vivo* проводили на мышах линии СВА 3-месячного возраста (20-22 г), моделируя стрептококковую раневую инфекцию. Все манипуляции проводили согласно международной и отечественной нормативной документации, регламентирующей работу с экспериментальными животными. Перед инфицированием на левом боку животного была выстрижена шерсть площадью 1,5 × 1,5 см. Затем путем подкожного введения суспензии *S. pyogenes* в физиологическом растворе в дозе × 10⁸ микробных тел в три точки подготовленной области по 0,1 мл. Животные были разделены на группы: контроль I – здоровые животные, которым вводили воду для инъекций; контроль II – инфицированные нелеченные животные; опыт I – животные, которым в качестве лечения вводили внутривентриально производное пиримидина в дозе 36 мг/кг в течение 7 дней, начиная с первого дня заражения (доза, что составило 1/10 от молекулярной массы, определена в ходе экспериментальных исследований по оценке токсичности и подтверждена с помощью программного обеспечения GUSAR); опыт II – животные, которым в качестве лечения вводили внутривентриально препарат сравнения цефепим (цефепим дигидрохлорид моногидрат; порошок для приготовления раствора для внутривенного и внутримышечного введения; ПАО «Красфарма»; Россия) в средней терапевтической дозе 50 мг/кг в том же режиме, что и исследуемое соединение. Противомикробную эффективность пиримидинового соединения 3-[2-[(4,6-диметилпиримидин-2-ил)амино]-2-оксоэтил]хиназолин-4(3H)-он (VMA-13-14), устанавливали путем оценки общего состояния животного, аппетита, массы тела, динамики изменения раневой поверхности. После выведения мышей из эксперимента методом быстрой декапитации определяли уровни про- и противовоспалительных интерлейкинов IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-8, IL-10 в сыворотке крови методом иммуноферментного анализа с использованием наборов реагентов ELISA Kit for Interleukin IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-8, IL-10 (Cloud-Clone Corp., Китай).

Полученные результаты были статистически обработаны, вычисляя среднее арифметическое (M) и среднюю ошибку среднего арифметического (m). Данные представлены в виде M \pm m. Статистическую обработку полученных результатов проводили с помощью программного обеспечения BIOSTAT (AnalystSoft Inc., Канада) с учетом критерия Манна–Уитни. Различия считали значимыми при p \leq 0,05.

Результаты и обсуждение

Развитие стрептококковой раневой инфекции сопровождалось снижением аппетита, угнетенного состояния у животных, снижением массы тела, а также появлением папул на вторые сутки после инфицирования на местах введения патогена с последующим развитием гнойного и некротического процесса.

Результаты оценки влияния производного пиримидина 3-[2-[(4,6-диметилпиримидин-2-ил)амино]-2-оксоэтил]хиназолин-4(3Н)-он на уровень провоспалительных интерлейкинов в условиях стрептококковой раневой инфекции показано в таблице 1.

Развитие стрептококковой инфекции способствовало повышению уровней провоспалительных интерлейкинов по сравнению со здоровыми животными: IL-1 β – 37% (p < 0,05), IL-6 – практически на 50% (p < 0,05), IL-8 – на 41% (p < 0,05).

В условиях введения пиримидинового соединения в качестве лечения наблюдалось снижение уровней исследуемых интерлейкинов в сравнении с группой нелеченых животных: IL-1 β – на 17% (p < 0,05), IL-6 – на 8% (p > 0,05), IL-8 – на 15% (p > 0,05). Введение цефепима также привело к снижению данных показателей соответственно на 14% (p > 0,05), 9% (p > 0,05) и 21% (p < 0,05) по отношению к контролю II.

Результаты оценки влияния производного пиримидина 3-[2-[(4,6-диметилпиримидин-2-ил)амино]-2-оксоэтил]хиназолин-4(3Н)-он на уровень противовоспалительных интерлейкинов в условиях стрептококковой раневой инфекции показано в таблице 2.

При развитии раневой инфекции в эксперименте наблюдалось снижение уровней IL-4 и IL-10 по сравнению с контролем I на 10% (p > 0,05) и 26% (p < 0,05) соответственно. Введение пиримидинового соединения и препарата

ТАБЛИЦА 1. ВЛИЯНИЕ ПРОИЗВОДНОГО ПИРИМИДИНА 3-[2-[(4,6-ДИМЕТИЛПИРИМИДИН-2-ИЛ)АМИНО]-2-ОКСОЭТИЛ]ХИНАЗОЛИН-4(3Н)-ОН НА УРОВЕНЬ ПРОВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ИНТЕРЛЕЙКИНОВ В УСЛОВИЯХ СТРЕПТОКОККОВОЙ РАНЕВОЙ ИНФЕКЦИИ

TABLE 1. EFFECT OF THE PYRIMIDINE DERIVATIVE 3-[2-[(4,6-DIMETHYLPYRIMIDIN-2-YL)AMINO]-2-OXOETHYL]QUINAZOLIN-4(3H)-ONE ON THE LEVEL OF PRO-INFLAMMATORY INTERLEUKINS IN CONDITIONS OF STREPTOCOCCAL WOUND INFECTION

Показатели, пг/мл Indicators, pg/mL (M \pm m)	Экспериментальные группы Experimental groups (n = 10)			
	Контроль I Control I	Контроль II Control II	VMA-13-14 (36 мг/кг) VMA-13-14 (36 mg/kg)	Цефепим (50 мг/кг) Cefepime (50 mg/kg)
IL-1 β	94,56 \pm 6,75	129,42 \pm 8,56*	108,24 \pm 6,59 [#]	111,54 \pm 9,18
IL-6	82,47 \pm 5,45	123,29 \pm 11,52*	113,82 \pm 8,53	112,59 \pm 7,57
IL-8	48,25 \pm 3,65	68,37 \pm 5,29*	57,78 \pm 3,61	53,93 \pm 4,26 [#]

Примечание. Сравнение с группой «контроль I»: * – p < 0,05; сравнение с группой «контроль II»: [#] – p < 0,05.

Note. Comparison with the “control I” group: *, p < 0.05; comparison with the group “control II”: [#], p < 0.05.

ТАБЛИЦА 2. ВЛИЯНИЕ ПРОИЗВОДНОГО ПИРИМИДИНА 3-[2-[(4,6-ДИМЕТИЛПИРИМИДИН-2-ИЛ)АМИНО]-2-ОКСОЭТИЛ]ХИНАЗОЛИН-4(3Н)-ОН НА УРОВЕНЬ ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ИНТЕРЛЕЙКИНОВ В УСЛОВИЯХ СТРЕПТОКОККОВОЙ РАНЕВОЙ ИНФЕКЦИИ

TABLE 2. EFFECT OF THE PYRIMIDINE DERIVATIVE 3-[2-[(4,6-DIMETHYLPYRIMIDIN-2-YL)AMINO]-2-OXOETHYL]QUINAZOLIN-4(3H)-ONE ON THE LEVEL OF ANTI-INFLAMMATORY INTERLEUKINS IN CONDITIONS OF STREPTOCOCCAL WOUND INFECTION

Показатели, пг/мл Indicators, pg/mL (M \pm m)	Экспериментальные группы Experimental groups (n = 10)			
	Контроль I Control I	Контроль II Control II	VMA-13-14 (36 мг/кг) VMA-13-14 (36 mg/kg)	Цефепим (50 мг/кг) Cefepime (50 mg/kg)
IL-4	3,15 \pm 0,42	2,86 \pm 0,24	2,89 \pm 0,31	2,98 \pm 0,25
IL-10	37,22 \pm 3,20	27,48 \pm 1,91*	41,73 \pm 3,45 ^{##}	32,67 \pm 2,97 [#]

Примечание. Сравнение с группой «контроль I»: * – p < 0,05; сравнение с группой «контроль II»: [#] – p < 0,05; ^{##} – p < 0,01.

Note. Comparison with the “control I” group: *, p < 0.05; comparison with the group “control II”: [#], p < 0.05; ^{##}, p < 0.01.

сравнения способствовало повышению уровня IL-4, однако статистической значимости данные изменения не имели. Исследуемое производное пиримидина привело к повышению IL-10 на 52% ($p < 0,01$); препарат сравнения вызвал увеличение уровня данного интерлейкина практически на 20% ($p < 0,05$) по отношению к нелеченому контролю.

Таким образом, в исследовании было установлено, что пиримидиновое производное 3-[2-[(4,6-диметилпиримидин-2-ил)амино]-2-оксоэтил]хиназолин-4(3H)-он в условиях стрептококковой раневой инфекции оказывает иммунорегуляторное действие, проявляющееся в снижении провоспалительных и увеличении противовоспалительных интерлейкинов. Результаты, полученные в ходе данного исследования, подтверждаются работами по изучению влияния нуклеотидных производных на уровень цитокинов. В исследованиях показано, что пиримидиновые производные оказывают иммунорегуляторное воздействие на процесс перераспределения и соотношения про- и противовоспалительных ци-

токинов, играющих ключевую роль в иммунном ответе и активации иммуноцитов [3, 8, 12, 13]. Следует отметить, что выраженное воздействие производного пиримидина относительно препарата сравнения на уровни интерлейкинов может быть связано с бактериостатическим действием исследуемого соединения, так как усиление интоксикации при быстрой гибели микроорганизмов в результате воздействия бактерицидных средств может усугублять течение инфекционно-воспалительного процесса [15, 16].

Заключение

Таким образом изучение влияния производного пиримидина 3-[2-[(4,6-диметилпиримидин-2-ил)амино]-2-оксоэтил]хиназолин-4(3H)-он на уровень про- (IL-1 β , IL-6, IL-8) и противовоспалительных интерлейкинов (IL-4, IL-10) в условиях экспериментальной стрептококковой раневой инфекции показало, что исследуемое соединение оказывает иммунорегуляторное воздействие на цитокиновый профиль сыворотки крови лабораторных животных.

Список литературы / References

1. Бурова Л.А., Суворов А.Н., Тотолян А.А. *Streptococcus pyogenes*: феномен неиммунного связывания иммуноглобулинов человека и его роль в патологии // Медицинская иммунология, 2022. Т. 24, № 2. С. 217-234. [Burova L.A., Suvorov A.N., Totolyan A.A. *Streptococcus pyogenes*: the phenomenon of non-immune binding of human immunoglobulins and its role in pathology. *Meditinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2022, Vol. 24, no. 2, pp. 217-234. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-SPP-2450.
2. Бурова Л.А., Тотолян А.А. Основные факторы патогенности *Streptococcus pyogenes* // Инфекция и иммунитет, 2022. Т. 12, № 1. С. 33-50. [Burova L.A., Totolyan A.A. The main pathogenicity factors of *Streptococcus pyogenes*. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2022, Vol. 12, no. 1, pp. 33-50. (In Russ.)] doi: 10.15789/2220-7619-MPF-1723.
3. Коваленко Л.П., Никитин С.В., Кузнецова О.С., Журиков Р.В., Сорокина А.В., Мирошкина И.А., Коржова К.В. Изучение противовоспалительных, иммуномодулирующих и противоопухолевых свойств СНК-411 // Экспериментальная и клиническая фармакология, 2018. Т. 81, № 5. С. 115. [Kovalenko L.P., Nikitin S.V., Kuznetsova O.S., Zhurikov R.V., Sorokina A.V., Miroshkina I.A., Korzhova K.V. Study of anti-inflammatory, immunomodulatory and antitumor properties of SNK-411. *Ekspierimentalnaya i klinicheskaya farmakologiya = Experimental and Clinical Pharmacology*, 2018, Vol. 81, no. 5, P. 115. (In Russ.)]
4. Красницкая А.С., Бочарова О.С., Первов Ю.Ю., Климкина Т.Н. Характеристика местного цитокинового профиля у больных хроническим тонзиллитом в зависимости от этиологии // Российский иммунологический журнал, 2019. Т. 22, № 2-1. С. 338-340. [Krasnitskaya A.S., Bocharova O.S., Pervov Yu.Yu., Klimkina T.N. Characteristics of the local cytokine profile in patients with chronic tonsillitis depending on the etiology. *Rossiyskiy immunologicheskiy zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2019, Vol. 22, no. 2-1, pp. 338-340. (In Russ.)] doi: 10.31857/S102872210006620-7.
5. Нурбоев Х.И. Производные пиримидина и их применение в медицине // Boshqaruv va etika qoidalari onlayn ilmiy jurnali, 2022. Т. 2, № 4. С. 32-35. [Nurbobev H.I. Pyrimidine derivatives and their use in medicine. *Boshqaruv va etika qoidalari onlayn ilmiy jurnali = Online Journal of Management and Ethics*, 2022, Vol. 2, no. 4, pp. 32-35. (In Russ.)]
6. Фрейдлин И.С., Старикова Э.А., Лебедева А.М. Преодоление защитных функций макрофагов факторами вирулентности *Streptococcus pyogenes* // Бюллетень сибирской медицины, 2019. Т. 18, № 1. С. 109-118. [Freidlin I.S., Starikova E.A., Lebedeva A.M. Overcoming the protective functions of macrophages by virulence factors of *Streptococcus pyogenes*. *Byulleten sibirskoy meditsiny = Bulletin of Siberian Medicine*, 2019, Vol. 18, no 1, pp. 109-118. (In Russ.)]
7. Цибизова А.А., Тюренков И.Н., Озеров А.А., Башкина О.А., Самотруева М.А. Регуляторное влияние производного хиназолина с альфа-нафтильным радикалом на уровень TNF- α , IL-6 и IL-10 в условиях экспериментальной генерализованной инфекции // Астраханский медицинский журнал, 2020. Т. 15, № 4. С. 97-107. [Tsibizova A.A., Tyurenkov I.N., Ozerov A.A., Bashkina O.A., Samotrueva M.A. Regulatory effect of a quinazoline derivative with an alpha-naphthyl radical on the level of TNF α , IL-6, and IL-10 under conditions of experimental generalized infection. *Astrakhanskiy meditsinskiy zhurnal = Astrakhan Medical Journal*, 2020, Vol. 15, no. 4, pp. 97-107. (In Russ.)]
8. Цибизова А.А., Ясенявская А.Л., Озеров А.А., Самотруева М.А., Тюренков, И.Н. Оценка острой токсичности нового пиримидинового производного // Астраханский медицинский журнал, 2021. Т. 16, № 1.

C. 82-87. [Tsybizova A.A., Yasenyavskaya A.L., Ozerov A.A., Samotrueva M.A., Tyurenkov I.N. Evaluation of the acute toxicity of a new pyrimidine derivative. *Astrakhanskiy meditsinskiy zhurnal = Astrakhan Medical Journal*, 2021, Vol. 16, no. 1, pp. 82-87. (In Russ.)]

9. Чиряпкин А.С. Обзор производных пиримидина как фармакологически активных соединений // *Juvenis Scientia*, 2022. Т. 8, № 5. С. 16-30. [Chiryapkin A.S. Review of pyrimidine derivatives as pharmacologically active compounds. *Juvenis Scientia = Juvenis Scientia*, 2022, Vol. 8, no 5, pp. 16-30. (In Russ.)]

10. Anderson D., Imran S., Frost H.R., Azzopardi K.I., Jalali S., Novakovich B., Pellicci D.G. The immune signature of acute pharyngitis in the study of *Streptococcus pyogenes* in humans. *Nat. Commun.*, 2022, Vol. 13, no. 1, 769. doi: 10.1038/s41467-022-28335-3.

11. Avire N.J., While H., Ross K. Review of *Streptococcus pyogenes*: public health risk factors, prevention and control. *Pathogens*, 2021, Vol. 10, no. 2, 248. doi: 10.3390/pathogens10020248.

12. Gonzales A.J., Bowman J.W., Fici G.J., Zhang M., Mann D.W., Mitton-Fry M. Oclacitinib (APOQUEL[®]) is a novel janus kinase inhibitor with activity against cytokines involved in allergy. *J. Vet. Pharmacol. Ther.*, 2014, Vol. 37, no. 4, pp. 317-324.

13. Morelli M., Scarponi C., Mercurio L., Facchiano F., Pallotta S., Madonna S., Girolomoni G., Albanesi C. Selective immunomodulation of inflammatory pathways in keratinocytes by the janus kinase(JAK) inhibitor tofacitinib: implications for the employment of JAK-targeting drugs in psoriasis. *J. Immunol. Res.*, 2018, Vol. 2018, 7897263. doi: 10.1155/2018/7897263.

14. Rath E., Palma Medina L.M., Jahagirdar S., Mosevoll K.A., Damås J.K., Madsen M.B., Svensson M., Hyldegaard O., Martins Dos Santos V.A.P.; INFECT Study group; Saccenti E., Norrby-Teglund A., Skrede S., Bruun T. Systemic immune activation profiles in streptococcal necrotizing soft tissue infections: A prospective multicenter study. *Clin. Immunol.*, 2023, Vol. 249, no. 9, 109276. doi: 10.1016/j.clim.2023.109276.

15. Singh S.B., Young K., Silver L.L. What is an “ideal” antibiotic? Challenges of discovery and the way forward. *Biochem. Pharmacol.*, 2017, no. 133, pp. 63-73.

16. Yilmaz Ç., Özcengiz G. Antibiotics: Pharmacokinetics, toxicity, resistance and multi-drug efflux pumps. *Biochem. Pharmacol.*, 2017, no. 133, pp. 43-62.

Авторы:

Цибизова А.А. — к.фарм.н., старший научный сотрудник Научно-исследовательского центра, доцент кафедры фармакогнозии, фармацевтической технологии и биотехнологии ФГБОУ ВО «Астраханский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Астрахань, Россия

Ясенявская А.Л. — к.м.н., доцент, руководитель, старший научный сотрудник Научно-исследовательского центра, доцент кафедры фармакогнозии, фармацевтической технологии и биотехнологии ФГБОУ ВО «Астраханский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Астрахань, Россия

Тюренков И.Н. — д.м.н., член-корр. РАН, профессор, заведующий кафедрой фармакологии и фармации, Институт непрерывного медицинского и фармацевтического образования ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Волгоград, Россия

Озеров А.А. — д.х.н., профессор, заведующий кафедрой фармацевтической и токсикологической химии ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Волгоград, Россия

Самотруева М.А. — д.м.н., профессор, главный научный сотрудник Научно-исследовательского центра, заведующая кафедрой фармакогнозии, фармацевтической технологии и биотехнологии ФГБОУ ВО «Астраханский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Астрахань, Россия

Authors:

Tsybizova A.A., PhD (Pharmacy), Senior Research Associate, Research Center, Associate Professor of Pharmacognosy, Pharmaceutical Technology and Biotechnology Department, Astrakhan State Medical University, Astrakhan, Russian Federation

Yasenyavskaya A.L., PhD (Medicine), Associate Professor, Head, Senior Research Associate, Research Center, Associate Professor of Pharmacognosy, Pharmaceutical Technology and Biotechnology Department, Astrakhan State Medical University, Astrakhan, Russian Federation

Tyurenkov I.N., PhD, MD (Medicine), Corresponding Member, Russian Academy of Sciences, Professor, Head, Pharmacology and Pharmacy Department, Institute of Continuing Medical and Pharmaceutical Education of the FAMT, Volgograd State Medical University, Volgograd, Russian Federation

Ozerov A.A., PhD, MD (Chemistry), Professor, Head, Pharmaceutical and Toxicological Chemistry Department, Volgograd State Medical University, Volgograd, Russian Federation

Samotrueva M.A., PhD, MD (Medicine), Professor, Chief Research Associate, Research Center, Head of the Pharmacognosy, Pharmaceutical Technology and Biotechnology Department, Astrakhan State Medical University, Astrakhan, Russian Federation

Поступила 07.04.2023

Отправлена на доработку 13.04.2023

Принята к печати 14.06.2023

Received 07.04.2023

Revision received 13.04.2023

Accepted 14.06.2023

ОПЫТ ПРИМЕНЕНИЯ ЦИТОКИНОТЕРАПИИ В ЛЕЧЕНИИ РЕЦИДИВНОГО РАКА ШЕЙКИ МАТКИ

Быкова Е.А.¹, Фалалеева Н.А.¹, Мясина С.А.¹, Шегай П.В.²,
Гривцова Л.Ю.¹

¹ Медицинский радиологический научный центр имени А.Ф. Цыба – филиал ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Министерства здравоохранения РФ, г. Обнинск, Россия

² ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии», Москва, Россия

Резюме. Рак шейки матки (РШМ) представляет собой наиболее частую злокачественную опухоль женских половых органов. В целом прогноз у пациенток с распространенным РШМ неблагоприятный. Вариантом выбора при IVB стадии заболевания и рецидивах является системная платиносодержащая химиотерапия. Ее эффективность составляет около 20-26%, продолжительность жизни – 12-13 месяцев. Несомненно поиск и разработка новых методов лечения данного заболевания представляют собой крайне актуальную задачу. Иммуноонкология возникла как потенциальная новая стратегия для улучшения результатов лечения пациентов со злокачественными новообразованиями. Большое исследовательское внимание сосредоточено на возможности использования для иммунотерапии опухолей интерлейкина-2, фактора некроза опухоли (TNF) и интерферона-гамма (IFN γ), поскольку эти цитокины играют особенно важную роль в противоопухолевой защите организма. Благодаря активному поиску новых гибридных молекул на основе TNF α в современную практику онкологов входят специально разработанные отечественные рекомбинантные генно-инженерные противоопухолевые препараты, в частности препараты «Рефнот» (TNF α -тимозин- α 1) и «Ингарон» (IFN γ). Нами проанализирован результат комбинированного лечения (стандартная ПХТ 1 линии с добавлением цитокинотерапии в режиме «Рефнот + Ингарон») 1 больной рецидивным РШМ. По данным контрольного обследования по завершении курса ПХТ зарегистрирован полный ответ опухоли согласно критериям Recist 1.1., пациентке было продолжено проведение терапии цитокинами в монорежиме в качестве поддержки. В настоящее время по данным контрольных обследований каждые 3 мес. сохраняется полный регресс рецидивной опухоли, время наблюдения от окончания ПХТ составляет 28 мес. Хочется отметить, что при мониторинге состояния иммунной системы в ходе проведения терапии препаратами «Рефнот» и «Ингарон» отмечено увеличение абсолютного и относительного количества Т-лимфоцитов до нормального уровня, повышение цитотоксического и противоопухолевого потенциала NK-клеток без увеличения их количества. Пациентка имеет хорошую переносимость терапии, наблюдается улучшение качества жизни, клинически значимых побочных эффектов не отмечено. Таким образом, в данном клиническом примере терапия препаратами «Рефнот» (TNF α -тимозин- α 1) и «Ингарон» (IFN γ) является безопасным методом поддерживающей терапии с положительным лечеб-

Адрес для переписки:

Быкова Екатерина Александровна
Медицинский радиологический научный центр
имени А.Ф. Цыба
249036, Россия, Калужская обл., г. Обнинск,
ул. Королёва, 4.
Тел.: 8 (920) 617-09-33.
E-mail: bykawayekaterina@yandex.ru

Address for correspondence:

Ekaterina A. Bykova
A. Tsyb Medical Radiological Research Center
4 Korolev St
Obninsk, Kaluga Region
249036 Russian Federation
Phone: +7 (920) 617-09-33.
E-mail: bykawayekaterina@yandex.ru

Образец цитирования:

Е.А. Быкова, Н.А. Фалалеева, С.А. Мясина,
П.В. Шегай, Л.Ю. Гривцова «Опыт применения
цитокинотерапии в лечении рецидивного рака шейки
матки» // Медицинская иммунология, 2024. Т. 26, № 2.
С. 407-414. doi: 10.15789/1563-0625-EOC-2665

© Быкова Е.А. и соавт., 2024

Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

E.A. Bykova, N.A. Falaleeva, S.A. Myalina, P.V. Shegai,
L.Yu. Grivtsova "Experience of cytokine therapy
in the treatment of recurrent cervical cancer", *Medical
Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2024,
Vol. 26, no. 2, pp. 407-414.
doi: 10.15789/1563-0625-EOC-2665

© Bykova E.A. et al., 2024

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

DOI: 10.15789/1563-0625-EOC-2665

ным эффектом, позволяющим эффективно контролировать рецидивный рак шейки матки на протяжении более 2 лет, а также значительно улучшить качество жизни пациентки. Данный вид терапии может быть рекомендован для применения в клинической онкологии.

Ключевые слова: рак шейки матки, иммуноонкология, цитокины, TNF α , TNF α -тимозин- α 1, IFN γ

EXPERIENCE OF CYTOKINE THERAPY IN THE TREATMENT OF RECURRENT CERVICAL CANCER

Bykova E.A.^a, Falaleeva N.A.^a, Myalina S.A.^a, Shegai P.V.^b, Gritsova L.Yu.^a

^a A. Tsyb Medical Radiological Research Center, a Branch of the National Medical Research Radiological Center, Obninsk, Russian Federation

^b National Medical Research Radiological Center, Moscow, Russian Federation

Abstract. Cervical cancer is the most common malignant tumor of the female genital organs. In general, the prognosis in patients with advanced cervical cancer is unfavorable. The option of choice for stage IV of the disease and relapses is systemic platinum-containing chemotherapy. Its effectiveness is about 20-26%, life expectancy is 12 to 13 months. Undoubtedly, the search and development of new methods of treating this disease is an extremely urgent task. Immuno-oncology has emerged as a potential new strategy to improve the treatment outcomes of patients with malignant neoplasms. Much attention in research is focused on the opportunity of using interleukin-2, tumor necrosis factor (TNF) and interferon-gamma (IFN γ) for tumor immunotherapy, since these cytokines play a special role in antitumor protection. Due to the active search for new hybrid molecules based on TNF α , some domestically developed recombinant antitumor drugs are implicated into modern practice of clinical oncologists, in particular, "Refnot" (TNF α -thymosin- α 1) and "Ingaron" (IFN γ preparation). We analyzed the result of combined treatment (standard polychemotherapy at the 1st line augmented with cytokinotherapy including Refnot + Ingaron therapy) in one patient with recurrent cervical cancer. According to the control examination, upon completion of the polychemotherapy course, a complete tumor response was registered according to the Recist 1.1 criteria. The patient continued to receive cytokines as supporting therapy. Currently, according to control quarterly examinations, a complete regression of recurrent tumor persists from the end of polychemotherapy to 28 months of observation. One should note that when monitoring the state of the immune system during therapy with Refnot and Ingaron, we noted an increase in absolute and relative numbers of T cells to normal levels along with higher cytotoxic and antitumor potential of NK cells without increasing their number. The patient well tolerates the therapy, improved quality of life is documented, and there are no clinically significant side effects. Hence, the therapy with "Refnot" (TNF α -thymosin- α 1) and "Ingaron" (IFN γ) in this clinical case proved to be a safe method of maintenance therapy with a positive therapeutic effect thus allowing effective control of recurrent cervical cancer for more than 2 years, as well as significantly improve quality of life of the patient. This type of therapy may be recommended for usage in clinical oncology.

Keywords: cervical cancer, immuno-oncology, cytokines, TNF α , TNF α -тимозин- α 1, IFN γ

Введение

Рак шейки матки (РШМ) — наиболее частое злокачественное новообразование женских половых органов — оно составляет 9% от всех злокачественных опухолей у женщин. Основной причиной развития РШМ является генитальная папилломавирусная инфекция. Гистологически чаще всего наблюдается плоскоклеточный рак (около 90%), а также аденокарцинома (около 10%). Крайне редко в биоптатах опухоли РШМ встречается аденоплоскоклеточный и мелкоклеточный рак. При начальных стадиях заболевания

(карцинома *in situ*, IA стадия) возможно ограничиться хирургическим лечением в различных вариантах. При стадиях заболевания IB1 и IIA1 возможно и только проведение хирургического лечения, и только лучевой/химиолучевой терапии. Лечение IB2 и IIA2 стадий является самым diskutabelnym — возможны варианты хирургического лечения в самостоятельном виде и с неoadъювантной химиотерапией, а также химиолучевая терапия в самостоятельном варианте. Стандартом лечения РШМ IIB-IVA является проведение химиолучевой терапии с еженедельным

введением цисплатина [4]. В целом прогноз у пациенток с распространенным РШМ неблагоприятный. При местнораспространенных формах заболевания, требующих либо хирургического, либо химиолучевого лечения, пятилетняя общая выживаемость составляет 75-85% [13, 14, 18]. При метастатическом и рецидивирующем РШМ данный показатель не превышает 15%. При IVB стадии и рецидивах заболевания рекомендовано системное противоопухолевое лечение – химиотерапия с включением препаратов платины, эффективность которой колеблется в пределах 20-26% при продолжительности жизни пациенток в 12-13 месяцев [12, 13, 14, 17, 18, 22, 26, 27]. В исследовании GOG 240 рекомбинантное гуманизированное моноклональное антитело к рецепторам сосудистого эндотелиального фактора роста бевацизумаб, добавленный к химиотерапии первой линии при рецидивирующем или метастатическом РШМ, продемонстрировал 36-48% эффективность. На фоне применения бевацизумаба общая выживаемость пациенток выросла до 17 месяцев [23]. Хотя результаты проведения второй линии химиотерапии у данной когорты пациенток также остаются неудовлетворительными. Несомненно, разработка новых методов терапии РШМ представляют собой крайне актуальную задачу в настоящее время.

Иммуноонкология – новый способ лечения злокачественных новообразований. Последние десятилетия изучения состояния иммунной системы пациентов с опухолями подтвердили связь нарушений функционирования иммунной системы с развитием злокачественных новообразований и зависимость выраженности угнетения специфического противоопухолевого иммунного ответа от объема опухолевого образования, что обосновало применение иммунотерапии и средств, меняющих биологический ответ организма на опухолевые клетки, – модификаторов биологических реакций – при комплексном подходе к лечению онкологических больных. Такими препаратами являются цитокины (интерлейкины (IL), интерфероны (IFN), фактор некроза опухолей (TNF), колониестимулирующие факторы), таргетные модуляторы иммунного ответа, иммуноконъюгаты и неспецифические иммуномодуляторы [4].

Цитокины – это малые растворимые белковые молекулы, секретируемые лимфоцитами, а также макрофагами, гранулоцитами, дендритными и некоторыми другими клетками в экстрацеллюлярное пространство. Они являются мощными и важнейшими медиаторами нормального функционирования иммунной системы. Выделяют 2 вида цитокинов: тип 1 – они оказывают иммуностимулирующее действие на Т-клетки, и

тип 2 – в значительной степени иммуносупрессивны. IL-2 и IFN γ являются прототипическими цитокинами 1-го типа, тогда как IL-10 считается важным цитокином 2-го типа [21]. Регуляция гемопоэза, ангиогенеза, эмбриогенеза, апоптоза, хемотаксиса, воспаления и других иммунных реакций – основные функции цитокинов. Развитие многих патологий опосредовано этими белковыми молекулами, что ставит резонный вопрос о применении цитокинов в медицинской практике, в том числе в онкологическом секторе [4].

Терапевтическое использование рекомбинантных человеческих цитокинов представляло собой принципиальное доказательство в области иммунотерапии рака и умеренно успешную противоопухолевую стратегию в течение многих лет, особенно с HD-IL-2 (терапия высокими дозами IL-2), который считался с 1990-х годов примерно до 2010 года единственной одобренной FDA терапией с лечебным потенциалом для прогрессирующей меланомы и почечно-клеточного рака [21].

В настоящее время большой исследовательский интерес сосредоточен на возможности применения для иммунотерапии опухолей IL-2, TNF и IFN γ , поскольку именно эти цитокины играют важную роль в противоопухолевой защите организма. В исследованиях *in vitro* и *in vivo* были обнаружены множественные биологические эффекты данных цитокинов, что позволяет расценивать их действие как противоопухолевое [1, 5, 9]. IL-2 является одним из ключевых медиаторов иммунного ответа, а также проявляет противоопухолевые эффекты как в самостоятельном варианте при воздействии на организм опухоленосителей, так и в сочетании с противоопухолевой лекарственной терапией [2, 7, 8].

Интересен тот факт, что в онкологии терапевтическая эффективность цитокиновых лекарственных препаратов активно изучалась ещё в конце прошлого столетия, но широкого медицинского внедрения методы не получили в связи с неприемлемым профилем безопасности [19, 20].

TNF α был впервые обнаружен в 1975 г. в сыворотке мышей, инфицированных БЦЖ, и инъецированных липополисахаридом (LPS), как гликопротеин, способный вызывать геморрагический некроз сарком, трансплантированных мышам подкожно [11]. В 1984 г. после клонирования ДНК TNF был создан рекомбинантный человеческий фактор некроза опухолей [15]. TNF способен индуцировать апоптоз, некроз и аутофагию опухолевых клеток различного происхождения. При определенных же условиях TNF также может вызывать избирательное разрушение кровеносных сосудов в опухоли, что играет большую роль в его противоопухолевом эффекте [16, 28, 29]. В усло-

виях *in vitro* TNF усиливает цитотоксическое и апоптотическое действие химиопрепаратов в отношении клеток злокачественных опухолей [6]. Этот цитокин синтезируется главным образом клетками иммунной системы (макрофагами, дендритными клетками, лимфоцитами) и оказывает значительное влияние, как на врожденный, так и на адаптивный иммунитет. Он способен активировать Т-клетки и дендритные клетки, что приводит к усилению противоопухолевого адаптивного иммунного ответа [28]. Таким образом, TNF является основным регулятором иммунного и воспалительного ответа на опухоль, обладает выраженным цитотоксическим, цитостатическим и иммуномодулирующим эффектами [10].

Однако было показано, что рекомбинантный TNF высокотоксичен для человека при системном введении, что в свою очередь не позволяет достичь необходимых терапевтических доз. Исходя из этого, применение TNF в медицине оказалось ограничено его побочными эффектами и было временно прекращено.

Тем не менее, благодаря активной непрекращающейся разработке инновационных гибридных молекул, в основу которых положен TNF α , в современную практику онкологов постепенно входят созданные генно-инженерными методами отечественные рекомбинантные противоопухолевые препараты, в частности такие препараты, как «Рефнот» (TNF α -тимозин- α 1) и «Ингарон» (IFN γ) [3].

Препарат «Рефнот» прошел все фазы регистрационных клинических исследований в ведущих онкологических исследовательских центрах и в 2009 г. получил регистрационное удостоверение лекарственного средства, выданное Министерством здравоохранения РФ, для применения в онкологии [24, 25, 30]. «Рефнот» является оригинальной молекулой, содержащей два биологически активных соединения: TNF α и тимозин- α 1. Важной отличительной чертой препарата «Рефнот» является его низкая системная токсичность при сохранении противоопухолевых эффектов, характерных для TNF. Препарат обладает специфическим прямым действием на опухолевую клетку через TNF-рецепторы, запуская процесс запрограммированной клеточной смерти (апоптоз), в результате чего клетка-мишень погибает [24, 25, 30].

В настоящее время наиболее эффективное действие препарата «Рефнот» продемонстрировано в сочетании с препаратом «Ингарон» [24, 25, 30]. «Ингарон» также прошел весь цикл необходимых клинических исследований и с 2005 г. разрешен к медицинскому применению на территории РФ.

Ингарон – IFN γ выполняет значимую функцию в регуляции иммунной системы, балансе клеточного и гуморального ответов, смещая реактивность в сторону первого, функционально связывая между собой лимфоциты с макрофагами, усиливая выработку цитокинов IL-1 и IL-12 макрофагами, стимулируя презентацию антигенов на поверхности измененных клеток и их последующий апоптоз, что подтверждено в экспериментах *in vitro* и *in vivo* и обеспечивает прямой антипролиферативный эффект. Повышение цитотоксичности Т-лимфоцитов и активация естественных киллеров (NK-клеток) также играет немаловажную роль в повышении противоопухолевой активности комплексного воздействия IFN γ . Помимо прочего, препарат обладает способностью блокировать ангиогенез. Особенностью действия препарата «Ингарон», как рекомбинантного иммунного IFN γ человека, является его потенцирующее действие по активации рецепторов на поверхности опухолевых клеток, с которыми соединяется «Рефнот» [24, 25, 30].

Таким образом, при комбинации этих двух цитокиновых препаратов («Рефнот» и «Ингарон») достигается двойной терапевтический эффект: иммуномодуляция на уровне макроорганизма и прямое противоопухолевое действие, – что говорит о целесообразности их сочетания [24, 25, 30].

Материалы и методы

Проанализирован результат комбинированного лечения (стандартная ПХТ с добавлением цитокиноterapiи в режиме «Рефнот + Ингарон») 1 больной рецидивным раком шейки матки.

Описание клинического случая

Пациентка А. 1981 г.р. (37 лет) в сентябре 2018 года обратилась за медицинской помощью с жалобами на появление кровянистых выделений из половых путей. При дообследовании по месту жительства был установлен диагноз: рак шейки матки cT2bN1M0, IIb ст. Диагноз был установлен на основании анамнеза, проведенного обследования и гистологического заключения (плоскоклеточный рак с признаками ороговения). С 21.09.2018 по 22.10.2018 г. проведен 1-й этап химиолучевого лечения: конформная ДЛТ на область малого таза, регионарного лимфоотока на ЛУЭ Halcyon Varian, с применением технологии ротационной лучевой терапии с модуляцией интенсивности пучка излучения (VMAT) и ежедневным контролем укладки пациента (СВСТ) РОД 2 Гр, СОД 46 Гр на фоне еженедельного введения цисплатина 40 мг/м² (СД 294 мг) в/в. С 29.10.2018 по 17.11.2018 г. – проведен курс Брахитерапии на аппарате «Гаммед» (HDR, Ir192) РОД 7 Гр ДО

СОД 28 Гр. СКТ-топометрия, планирование параметров лечения.

Далее пациентка находилась под активным динамическим наблюдением у онколога по месту жительства. В августе 2019 года пациентка отметила появление отека правой нижней конечности, примесь крови в моче эпизодически различной интенсивности. В октябре обратилась за медицинской помощью, при обследовании установлен диагноз «лучевой цистит 3-й ст., постлучевой ректит, постлучевая язва мочевого пузыря» и выявлен тромбоз подвздошных вен справа с переходом на начальный отдел нижней полой вены. Консультирована сосудистым хирургом – назначена терапия антикоагулянтами. По данным МРТ органов малого таза от 03.10.2019 г. зарегистрировано прогрессирование заболевания в виде появления опухолевого инфильтрата вдоль наружных подвздошных сосудов справа.

Пациентка обратилась в МРНЦ им. А.Ф. Цыба. На консилиуме с учетом прогрессирования заболевания, иммунофенотипа опухоли, характера предшествующего лечения и отмеченной ранее в анамнезе у пациентки истинной аллергической реакции на паклитаксел рекомендовано начать проведение ПХТ в режиме «Цисплатин» 50 мг/м² в 1-й день + «Гемцитабин» 1000 мг/м² в 1-й, 8-й дни с интервалом 3 недели (без таргетного препарата «Бевацизумаб» в связи с высоким риском развития кровотечения). С 01.11.2019 г. начато проведение вышеназванной ПХТ. По результатам контрольного обследования от 10.01.2020 г. после 3 циклов ПХТ согласно критериям Recist 1.1 у пациентки зарегистрирована стабилизация заболевания. Анализ состояния иммунной системы пациентки показал наличие лимфоцитопе-

нии, повышение процента В-лимфоцитов, снижение абсолютного и относительного количества Т-лимфоцитов, а также снижение количества НК-клеток и повышение процента регуляторных Т-клеток.

Пациентке было продолжено проведение стандартной ПХТ с добавлением цитокинотерапии в режиме «Рефнот» по 100 000 ЕД ежедневно п/к в живот или в плечо + «Ингарон» через день в/м в ягодичную область или п/к в живот по 500 000 МЕ» (согласно методическим рекомендациям по применению препаратов «Рефнот» и «Ингарон»). По данным контрольного обследования от 23.03.2020 г. после суммарно 6 циклов ПХТ в комбинации с цитокинотерапией зарегистрирован полный ответ опухоли согласно критериям Recist 1.1.

Результаты

Хочется отметить тот факт, что с 03.2020 г. и по настоящее время пациентка продолжает получать вышеописанную терапию цитокинами в монорежиме в качестве поддержки, по данным контрольных обследований каждые 3 мес. сохраняется полный регресс рецидивной опухоли (рис. 1, 2, 3). При мониторинге состояния иммунной системы в ходе проведения терапии препаратами «Рефнот» и «Ингарон» отмечено увеличение абсолютного и относительного количества Т-лимфоцитов до нормального уровня, повышение цитотоксического и противоопухолевого потенциала НК-клеток без увеличения их количества. Пациентка имеет хорошую переносимость терапии, наблюдается улучшение качества жизни, клинически значимых побочных эффектов не отмечено.

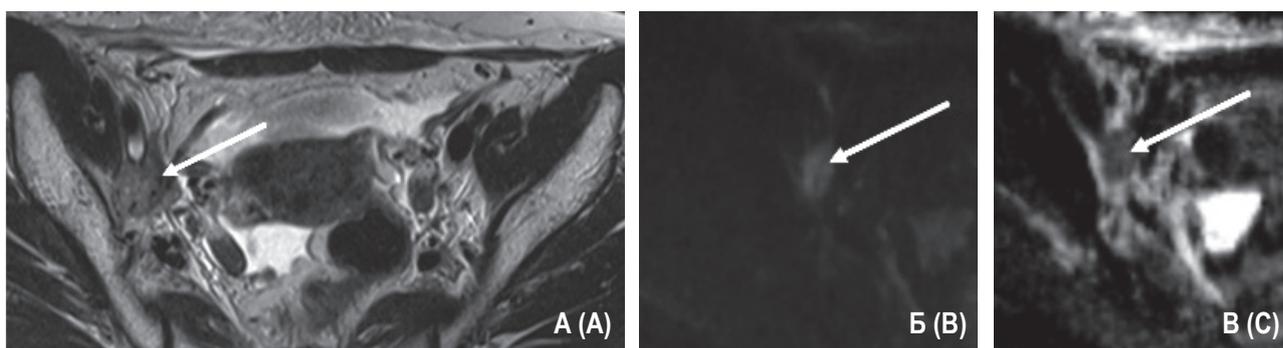


Рисунок 1. МР-изображение пациентки А. до начала лечения (03.10.2019), T2-ВИ, ак (А) и DWI (Б) с построением ADC-карты (В)

Примечание. По ходу наружных подвздошных сосудов (НПС) справа определяется конгломерат увеличенных лимфатических узлов, размерами около 2,7 × 2 × 4,2 см (А – стрелка) с признаками высокого сигнала на ДВИ (Б) и низкого сигнала на ADC-картах (В – стрелка).

Figure 1. MRI image of patient A. before treatment (October 3, 2019), T2-WI, ax (A) and DWI (B) with ADC card connection (C)

Note. Along the course of the external iliac vessels (IJV), a conglomerate of enlarged lymph nodes measuring about 2.7 × 2 × 4.2 cm (A, arrow) with signs of a high signal on DWI (B) and a low signal on ADC cards (C, arrow) are determined on right.

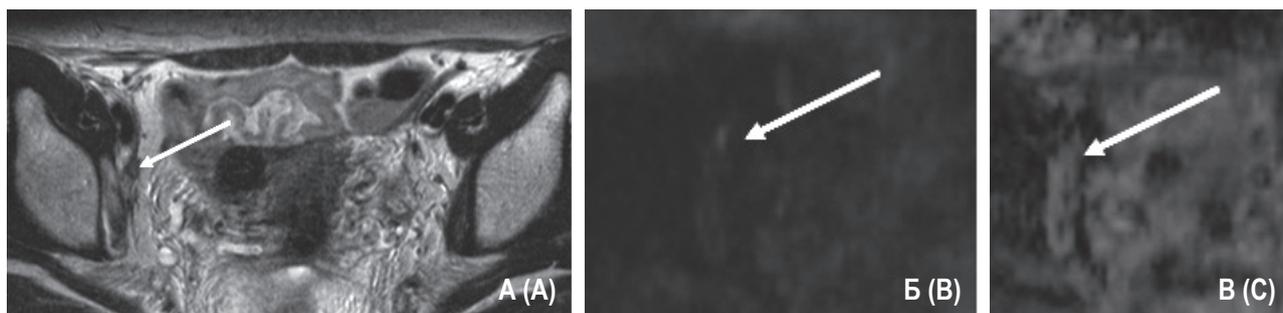


Рисунок 2. МР-изображение через 3 курса ПХТ (10.01.2020), T2-ВИ, ак (А) и DWI (Б) с построением ADC-карты (В)
Примечание. На месте определявшегося конгломерата по ходу НПС визуализируется участок уплотнения размерами около 2,1 × 0,6 × 3,1 см (А – стрелка), без достоверных признаков ограничения диффузии (Б, В – стрелка).

Figure 2. MR image after 3 courses of PCT (January 10, 2020), T2-WI, ax (A) and DWI (B) with the construction of an ADC map (C)
Note. In the place of the identified conglomerate along the LSL, a compaction area is visualized with dimensions of about 2.1 × 0.6 × 3.1 cm (A, arrow), without reliable signs of diffusion limitation (B, C, arrow).

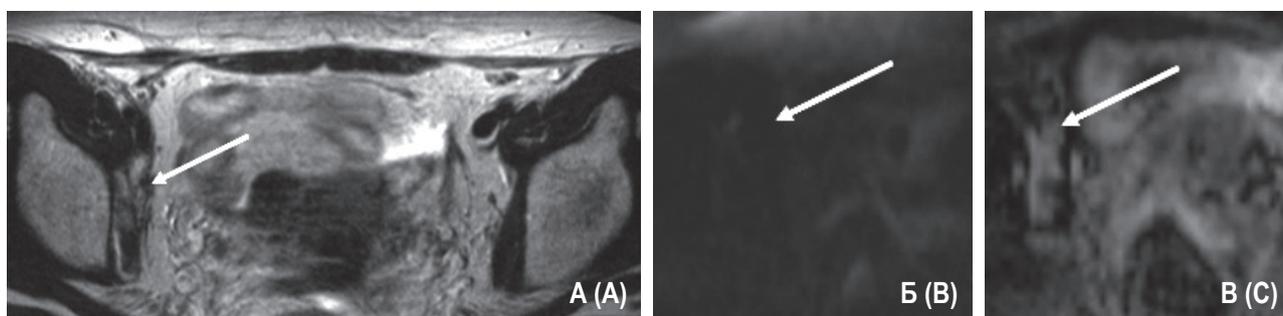


Рисунок 3. МР-изображение пациентки через 28 мес. после окончания ПХТ (15.03.2022), T2-ВИ, ак (А) и DWI (Б) с построением ADC-карты (В)

Примечание. В проекции ранее определявшегося конгломерата визуализируется зона фиброзно-рубцовых изменений (А) без признаков ограничения диффузии (Б, В – стрелка).

Figure 3. MR image of the patient after 28 months. after the end of PCT (March 15, 2022), T2-WI, ax (A) and DWI (B) with the construction of an ADC-map (C)

Note. In the projection of the previously determined conglomerate, a zone of fibrous-cicatricial changes is visualized (A) without signs of diffusion limitation (B, C, arrow).

Обсуждение

В данном клиническом примере терапия препаратами «Рефнот» (TNF α -тимозин- α 1) и «Ингарон» (IFN γ) является безопасным методом поддерживающей терапии с положительным лечебным эффектом, позволяющим эффективно

контролировать рецидивный рак шейки матки на протяжении более 2 лет, а также значительно улучшить качество жизни пациентки. Данный вид терапии может быть рекомендован для применения в клинической онкологии.

Финансирование

Работа выполнена без спонсорской поддержки.

Список литературы / References

1. Бережная Н.М. Роль клеток системы иммунитета в микроокружении опухоли. II. Взаимодействие клеток системы иммунитета с другими компонентами микроокружения // Онкология, 2009. Т. 11, № 2. С. 86-93. [Berezhnaya N.M. Role of immune system cells in tumor microenvironment. II. Interaction of the immune system cells with other microenvironment components. *Onkologiya = Oncology*, 2009, Vol. 11, no. 2, pp. 86-93. (In Russ.)]
2. Платинский Л.В., Брюзгин В.В., Подпетое Ю.И., Соколова В.Д., Алексеева И.С., Завольская Ж.А., Маркович А.А., Рахманкулова З.П. Возможности иммунотерапии в онкологической практике // Российский биотерапевтический журнал, 2008. № 4. С. 86-94. [Platinskiy L.V., Bryuzgin V.V., Podistov Yu.I., Sokolova V.D., Alekseeva I.S., Zavolskaya Zh.A., Markovich A.A., Rakhmankulova Z.P. The opportunity of immunotherapy in cancer. *Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Biotherapeutic Journal*, 2008, no. 4, pp. 86-94. (In Russ.)]

3. Решетников А.В., Присяжная Н.В., Соболев К.Э. Медико-социологическая оценка качества жизни онкологических больных, получающих терапию отечественными цитокинами // Социология медицины, 2016. Т. 15, № 1. С. 52-57. [Reshetnikov A.V., Prisiazhnaya N.V., Sobolev K.E. The medical sociological evaluation of quality of life of oncologic patients receiving therapy with national cytokines. *Sotsiologiya meditsiny = Sociology of Medicine*, 2016, Vol. 15, no. 1, pp. 52-57. (In Russ.)]
4. Руководство по химиотерапии опухолевых заболеваний / Под ред. Н.И. Переводчиковой, В.А. Горбуновой. 4-е изд. Расш. и доп. М.: Практическая медицина, 2018, с. 271-277, 58-65. [Guidelines for chemotherapy of tumor diseases. Ed. by N.I. Perevodchikova, V.A. Gorbunova. 4th ed. Expanded and supplemented]. Moscow: Prakticheskaya meditsina, 2018, pp. 271-277, 58-65.
5. Симбирцев А.С. Цитокины в иммуногенезе и лечении аллергии // Российский аллергологический журнал, 2007. № 1. С. 5-19. [Simbirtsev A.S. Cytokines in immunogenesis and allergy treatment. *Rossiyskiy allergologicheskiy zhurnal = Russian Allergological Journal*, 2007, no. 1, pp. 5-19. (In Russ.)]
6. Славина Е.Г., Бигвава Х.А., Заботина Т.Н., Борунова Т.Н., Морозова Л.Ф., Черткова А.И., Нуртдинова В.А., Кадагидзе З.Г. Модификация фактором некроза опухоли (ФНО) цитотоксического и апоптотического действия противоопухолевых лекарств в клетках меланомы человека // Российский биотерапевтический журнал, 2009. Т. 8, № 4. С. 37-44. [Slavina E.G., Biguava H.A., Zabolina T.N., Borunova F.F., Morozova L.F., Chertkova A.I., Nurtdinova V.A., Kadagidze Z.G. The interaction of tumor necrosis factor (tnf- α) with antitumor drugs at the induction of cytotoxicity and apoptosis in the human melanoma cells. *Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Biotherapeutic Journal*, 2009, Vol. 8, no. 4, pp. 37-44. (In Russ.)]
7. Славина Е.Г., Черткова А.И., Абрамов М.Е., Кадагидзе З.Г. Рефнот – новый иммуномодулятор в онкологии // Российский биотерапевтический журнал, 2016. Т. 15, № 1. С. 100-101. [Slavina E.G., Chertkova A.I., Abramov M.E., Kadagidze Z.G. Refnot – a new immunomodulator in oncology. *Rossiyskiy Bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Biotherapeutic Journal*, 2016, Vol. 15, no. 1, pp. 100-101. (In Russ.)]
8. Титов К., Шамилов Ф., Рябчиков Д., Егорова А., Киселевский М., Тупицын Н., Сельчук В. Современные возможности иммунотерапии при раке молочной железы // Врач, 2015. № 7. С. 37. [Titov K., Shamilov F., Ryabchikov D., Egorova A., Kiselevsky M., Tupitsyn N., Selchuk V. Current possibilities of immunotherapy for breast cancer. *Vrach = Doctor*, 2015, no. 7, p. 37. (In Russ.)]
9. Ярилин А.А. Иммунология: учебник. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2010. 752 с. [Yarilin A.A. Immunology: textbook]. Moscow: GEOTAR-Media, 2010. 752 p.
10. Alexander H.R.Jr, Bartlett D.L., Libutti S.K., Pingpank J.F., Fraker D.L., Royal R., Steinberg S.M., Helsabeck C.B., Beresneva T.H. Analysis of factors associated with outcome in patients undergoing isolated hepatic perfusion for unresectable liver metastases from colorectal center. *Ann. Surg. Oncol.*, 2009, Vol. 16, no. 7, pp. 1852-1859.
11. Carswell E.A., Old L.J., Kassel R.L., Green S., Fiore N., Williamson B. An endotoxininduced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 1975, Vol. 72, pp. 3666-3670.
12. Hreshchyshyn M.M., Aron B.S., Boronow R.C., Franklin E.W. 3rd, Shingleton H.M., Blessing J.A. Hydroxyurea or placebo combined with radiation to treat stages IIIB and IV cervical cancer confined to the pelvis. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 1979, Vol. 5, no. 3, pp. 317-322.
13. Keys H.M., Bundy B.N., Stehman F.B., Muderspach L.I., Chafe W.E., Suggs C.L. 3rd, Walker J.L., Gersell D. Cisplatin, radiation, and adjuvant hysterectomy compared with radiation and adjuvant hysterectomy for bulky stage IB cervical carcinoma. *N. Engl. J. Med.*, 1999, Vol. 340, no. 15, pp. 1154-1161.
14. Morris M., Eifel P.J., Lu J., Grigsby P.W., Levenback C., Stevens R.E., Rotman M., Gershenson D.M., Mutch D.G. Pelvic radiation with concurrent chemotherapy compared with pelvic and para-aortic radiation for high-risk cervical cancer. *N. Engl. J. Med.*, 1999, Vol. 340, no. 15, pp. 1137-1143.
15. Pennica D., Nedwin G.E., Hayflick J.S., Seeburg P.H., Derynck R., Palladino M.A., Kohr W.J., Aggarwal B.B., Goeddel D.V. Human tumour necrosis factor: precursor structure, expression and homology to lymphotoxin. *Nature*, 1984, Vol. 312, pp. 724-729.
16. Petersen S.L., Wang L., Yalcin-Chin A., Li L., Peyton M., Minna J., Li L., Peyton M., Minna J., Harran P., Wang X. Autocrine TNF alpha signaling renders human cancer cells susceptible to Smac-mimetic-induced apoptosis. *Cancer Cell.*, 2007, Vol. 12, pp. 445-456.
17. Randall L.M., Monk B.J., Darcy K.M., Tian C., Burger R.A., Liao S.Y., Peters W.A., Stock R.J., Fruehauf J.P. Markers of angiogenesis in high-risk, early-stage cervical cancer: A Gynecologic Oncology Group study. *Gynecol. Oncol.*, 2009, Vol. 112, no. 3, pp. 583-589.
18. Rose P.G., Bundy B.N., Watkins E.B., Thigpen J.T., Deppe G., Maiman M.A., Clarke-Pearson D.L., Insalaco S. Concurrent cisplatin-based radiotherapy and chemotherapy for locally advanced cervical cancer. *N. Engl. J. Med.*, 1999, Vol. 340, no. 15, pp. 1144-1153.
19. Scott N.W., Fayers P.M., Bottomley A., Aaronson N.K., de Graeff A., Groenvold M., Koller M., Petersen M.A., Sprangers M.A. Comparing translations of the EORTC QLQ-C30 using differential item functioning analysis. *Quality Life Res.*, 2006, Vol. 15, pp. 1103-1115.
20. Shumaker S.A., Naughton M.J. The international assessment of health related quality of life: a theoretical perspective. In: the international assessment of health related quality of life: theory, translation, measurement and analysis. Oxford, England, 1995, pp. 34-42.
21. Silk A.W., Margolin K. Cytokine Therapy. *Hematol. Oncol. Clin. North Am.*, 2019, Vol. 33, no. 2, pp. 261-274.

22. Stehman F.B., Ali S., Keys H.M., Muderspach L.I., Chafe W.E., Gallup D.G., Walker J.L., Gersell D. Radiation therapy with or without weekly cisplatin for bulky stage 1B cervical carcinoma: follow-up of a Gynecologic Oncology Group trial. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 2007, Vol. 197, no. 5, pp. 503.e1-503.e6.
23. Tewari K.S., Sill M.W., Long H.J. 3rd, Penson R.T., Huang H., Ramondetta L.M., Landrum L.M., Oaknin A., Reid T.J., Leitao M.M., Michael H.E., Monk B.J. Improved survival with bevacizumab in advanced cervical cancer. *N. Engl. J. Med.*, 2014, Vol. 370, no. 8, pp. 734-743.
24. Tracey K.J., Beutler B., Lowry S.F., Merryweather J., Wolpe S., Milsark I.W., Hariri R.J., Fahey T.J., Zentella A., Albert J.D., Shires G.T., Cerami A. Shock and tissue injury induced by recombinant human cachectin. *Science*, 1986, pp. 470-474.
25. Tracey K.J., Wei H., Manogue K.R., Fong Y., Hesse D.G., Nguyen H.T., Kuo G.C., Beutler B., Cotran R.S., Cerami A. Cachectin/tumor necrosis factor induces cachexia, anemia, and inflammation. *J. Exp. Med.*, 1988, Vol. 167, pp. 1211-1217.
26. Vale C.L., Tierney J.F., Davidson S.E., Drinkwater K.J., Symonds P. Substantial improvement in UK cervical cancer survival with chemoradiotherapy: results of a Royal College of Radiologists' audit. *Clin. Oncol. (R. Coll. Radiol.)*, 2010, Vol. 22, no. 7, pp. 590-601.
27. Varia M.A., Bundy B.N., Deppe G., Mannel R., Averette H.E., Rose P.G., Connelly P. Cervical carcinoma metastatic to para-aortic nodes: extended field radiation therapy with concomitant 5-fluorouracil and cisplatin chemotherapy: a Gynecologic Oncology Group study. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 1998, Vol. 42, no. 5, pp. 1015-1023.
28. Wang X., Lin Y. Tumor necrosis factor and cancer, buddies or foes? *Acta Pharmacol. Sin.*, 2008, Vol. 29, no. 11, pp. 1275-1288.
29. Wang X. The expanding role of mitochondria in apoptosis. *Genes Dev.*, 2001, Vol. 15, pp. 2922-2933.
30. Ware J.E., Sherbourne C.D. The MOS 36-Item Short-Form Health Survey (SF-36): I. Conceptual framework and item selection. *Med. Care*, 1992, Vol. 30, pp. 473-483.

Авторы:

Быкова Е.А. — врач-онколог отдела противоопухолевого лекарственного лечения, Медицинский радиологический научный центр имени А.Ф. Цыба — филиал ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Министерства здравоохранения РФ, г. Обнинск, Россия

Фалалеева Н.А. — д.м.н., заведующая отделом лекарственного лечения злокачественных новообразований, Медицинский радиологический научный центр имени А.Ф. Цыба — филиал ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Министерства здравоохранения РФ, г. Обнинск Россия

Мялина С.А. — врач-рентгенолог, младший научный сотрудник отделения лучевой диагностики, Медицинский радиологический научный центр имени А.Ф. Цыба — филиал ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Министерства здравоохранения РФ, г. Обнинск, Россия

Шегай П.В. — к.м.н., заместитель генерального директора по науке ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии», Москва, Россия

Грицова Л.Ю. — д.б.н., заведующая отделом лабораторной медицины, Медицинский радиологический научный центр имени А.Ф. Цыба — филиал ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Министерства здравоохранения РФ, г. Обнинск, Россия

Authors:

Bykova E.A., Oncologist, Department of Antitumor Drug Treatment, A. Tsyb Medical Radiological Research Center, a Branch of the National Medical Research Radiological Center, Obninsk, Russian Federation

Falaleeva N.A., PhD, MD (Medicine), Head, Department of Drug Treatment of Malignant Neoplasms, A. Tsyb Medical Radiological Research Center, a Branch of the National Medical Research Radiological Center, Obninsk, Russian Federation

Myalina S.A., Clinical Radiologist, Junior Research Associate, Department of Radiation Diagnostics, A. Tsyb Medical Radiological Research Center, a Branch of the National Medical Research Radiological Center, Obninsk, Russian Federation

Shegai P.V., PhD (Medicine), Deputy Director for Research, National Medical Research Radiological Center, Moscow, Russian Federation

Gritsova L.Yu., PhD, MD (Biology), Head, Department of Laboratory Medicine, A. Tsyb Medical Radiological Research Center, a Branch of the National Medical Research Radiological Center, Obninsk, Russian Federation

Поступила 10.03.2023
Отправлена на доработку 16.03.2023
Принята к печати 26.03.2023

Received 10.03.2023
Revision received 16.03.2023
Accepted 26.03.2023

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, кДа 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 представится также в переводе на английский язык. В отдельных случаях, по решению редакционной коллегии, может быть затребован развернутый вариант резюме на английском языке.
- 5) Рисунки, если они есть - каждый отдельным файлом (при загрузке в систему каждому рисунку присваивается имя «Рисунок. Название рисунка (где название рисунка соответствует содержащемуся в файле рисунку. Порядковый номер рисунка)»)

6) Файл в формате .doc, .docx, rtf, с названиями рисунков

7) Таблицы, если они есть - каждая отдельным файлом (Название каждой таблицы должно быть приведено заголовком в файле с самой таблицей)

8) Файл с цитируемой литературой (при загрузке в систему ему присваивается имя «Литература»), по следующей форме: таблица из четырех столбцов (альбомная ориентация), где:

Порядковый номер ссылки	Авторы, название публикации и источника, где она опубликована, выходные данные	ФИО, название публикации и источника на английском	Полный интернет-адрес (URL) цитируемой статьи
Размещаются в таблице в алфавитном порядке, вначале русскоязычные, затем на языках с латинской графикой	Указывать по библиографическому стандарту, представленному выше	Официальное англоязычное название публикации и источника, где она опубликована - для русскоязычных статей. В редких случаях, когда не существует официальных англоязычных названий (это возможно для таких типов публикаций, как тезисы, книги и др.) - редакция просит предоставить их перевод, используя красный цвет шрифта. Для англоязычных публикаций и источников в этом столбце ставится прочерк	В том случае, если информация о статье не размещена на официальном сайте издания, допустимо использовать URL статьи со сторонних сайтов, в том числе системы www.e-library.ru

Текст должен быть набран с одинарным межстрочным интервалом; используется кегль шрифта в 14 пунктов; для выделения используется курсив, а не подчеркивание; все ссылки на иллюстрации, графики и таблицы расположены в соответствующих местах в тексте, а не в конце документа.

Текст соответствует стилистическим и библиографическим требованиям.

Если вы отправляете статью в рецензируемый раздел журнала, то вы согласны с требованиями слепого рецензирования, подробнее о котором можно узнать на сайте журнала (<http://mimmun.ru>) из рубрики **Рецензирование**, в разделе **«О Журнале»**.

Вы можете оформить подписку на журнал «Медицинская иммунология» через отделения связи: Каталог «УРАЛ-ПРЕСС» — индекс 42311. Подписка на электронную версию журнала на сайте www.elibrary.ru

АВТОРСКИЙ УКАЗАТЕЛЬ

Абдрахимова А.Р. 291	Вараксин Н.А. 329	Крюкова Н.О. 355	Осипцов В.Н. 355	Хасанова А.А. 355
Авальян Я.С. 263	Варюшина Е.А. 379	Кузнецова В.В. 303	Павлова И.Е. 281	Хижинский С.П. 291
Аксёнов В.В. 313	Ганковская Л.В. 263	Кузьмина Л.А. 291	Паровичникова Е.Н. 291	Хлусов И.А. 237
Александрова А.Д. 253	Ганковский В.А. 263	Кузьминова Е.П. 291	Пахомов Д.В. 355	Хромова Е.А. 355
Александрова Т.Н. 329	Глухова Т.Н. 389	Кузьмич Е.В. 281	Покровская О.С. 291	Цибизова А.А. 401
Артюшкин С.А. 379	Голиков А.В. 313	Курбатова Е.А. 355	Поспелова Т.И. 329	Чернов А.В. 313
Аутеншлюс А.И. 329	Гривцова Л.Ю. 407	Леонов Е.А. 291	Потапов В.Н. 313	Чистова Н.П. 321
Афлитнова М.А. 379	Дятлова Л.И. 389	Липатова Т.Е. 313	Савочкина А.Ю. 337	Шавкута Г.В. 313
Барычева Л.Ю. 303	Евсегнеева И.В. 271	Литвинова Л.С. 237	Самотруева М.А. 401	Шатохин М.Н. 355
Безрукова Е.В. 379	Зинина Е.В. 263	Лямкина А.С. 329	Стрельникова Е.Г. 379	Шегай П.В. 407
Беляева Е.В. 281	Изюрова Н.В. 337	Макарчук И.В. 271	Студеникина А.А. 329	Шлык И.Ф. 271
Беседина Д.Ю. 271	Какулия Д.М. 303	Малашенко В.В. 237	Судаков О.В. 313	Шурыгин С.Н. 313
Бирюкова М.И. 367	Карпова Е.П. 263	Меркушова Е.Д. 263	Сходова С.А. 355	Юрова К.А. 237
Бишева И.В. 355	Каштанова Т.Н. 345	Минасян М.М. 303	Тодосенко Н.М. 237	Якунченко Т.И. 313
Бодитнова Г.М. 321	Клюева С.Н. 345	Михайлова Е.С. 329	Тюреников И.Н. 401	Ясеняевская А.Л. 401
Боровиков И.О. 367	Кожевников В.А. 345	Могиленских А.С. 253	Узунова А.Н. 337	Aleksandrov A.V. 393
Боровикова О.И. 367	Козлов В.А. 231	Моисеева Е.А. 379	Фабрикантов О.Л. 313	Aleksandrov V.A. 393
Бубнова Л.Н. 281	Козьмова Н.А. 303	Мулина И.И. 329	Фадеев Ф.А. 253	Cherkesova E.G. 393
Буторкова С.А. 345	Костинов М.П. 355	Мялина С.А. 407	Фалалеева Н.А. 407	Osmanova G.Ya. 393
Булгакова В.П. 367	Кравцов А.Л. 345	Нохрин Д.Ю. 337	Хазиахматова О.Г. 237	Shilova L.N. 393
Быкова Е.А. 407	Кравцова Е.И. 367	Озеров А.А. 401	Хамаганова Е.Г. 291	Zborovskaya I.A. 393

ПРЕДМЕТНЫЙ УКАЗАТЕЛЬ

актикоагулянты 238	коронарный атеросклероз 272	стентирование коронарных артерий 272
ангиопоэтин-подобный белок 4-го типа 394	лимфопения 356	стимуляция созревания 254
антитела против циклического цитруллинового пептида 394	логистическая регрессия 314	сыворотка крови 330
артериальная гипертензия 321	локальное воспаление 380	татары 282
бактериальная терапевтическая вакцина 356	локальный иммунный статус 368	тимус 231
биомаркеры пневмонии 337	метастазирование 238	топические глюкокортикостероиды 380
большой молекулярный ответ 330	метод САТРСА 337	трансплантация 292
вибрационная болезнь 321	миграция Т-клеток 231	тяжелая внебольничная пневмония 337
внебольничная пневмония 337	минеральная плотность кости 394	хемокины 238
внутриматочная кавитация 368	неравновесное сцепление 292	хронический миелолейкоз 330
врожденный иммунитет 264, 272	низкотравматичные переломы 394	хронический полипозный риносинусит 380
высокоэффективная жидкостная хроматография 380	НСТ-тест 272	хронический эндометрит 368
гемопоэтические стволовые клетки 282	ожирение 321	циткиновый профиль 337
генный полиморфизм 304	онкогенез 238	циткины 231, 254, 314, 321, 330, 346, 389, 408
гепарин 238	онкология 238	экспериментальная стрептококковая инфекция 402
гипертрофия небных миндалин 264	остеопороз 394	COVID-19 346, 356
глаукома 314	пептидная вакцина 346	HLA-DPB1 292
гранзим В 272	первичная открытоугольная глаукома 304	HLA-гаплотип 292
двусторонняя тонзиллотомия 264	повторные неудачи имплантации 368	HLA-гаплотипы 282
дендритные клетки моноцитарного происхождения 254	потенциальный донор 282	HLA-гены 282
дети 337	предимплантационная подготовка 368	IFN γ 408
дородовое излитие околоплодных вод 389	преждевременные роды 389	IL1 264
иммунный статус 356	производное пиримидина 402	IL-5 380
иммуномодулятор 356	противомикробная активность 402	IL-2 368
иммуноонкология 408	противомикробные пептиды 264	SARS-CoV-2 346
иммунопатология 231	рак шейки матки 408	<i>Streptococcus pyogenes</i> 402
иммунотропное действие 402	ревматоидный артрит 394	S белок SARS-CoV-2 346
иммунофенотипирование 254	регистр доноров 282	T-клетки памяти 346
ингибиторы тирозинкиназ 330	резистентность 330	T-регуляторные клетки 231
индекс массы тела 321	резистентность к момегазону 380	T-эффекторные клетки 231
интерлейкины 402	рецепторы 254	TNF α 408
ишемическая болезнь сердца 314	русские 282	TNF α -тимозин- α 1 408
клеточный иммунитет 356	секвенирование следующего поколения 292	Toll-подобные рецепторы 264, 272
коморбидность 321	секреторный профиль 254	
	семья 292	
	сочетанная кардиопатология 314	
	сочетанная офтальмопатология 314	
	старение 231	

ИЛЛЮСТРАЦИИ К СТАТЬЕ «ФЕНОТИПИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ДЕНДРИТНЫХ КЛЕТОК ПРИ РАЗЛИЧНЫХ ВАРИАНТАХ СТИМУЛЯЦИИ СОЗРЕВАНИЯ» (АВТОРЫ: ФАДЕЕВ Ф.А., АЛЕКСАНДРОВА А.Д., МОГИЛЕНСКИХ А.С. [с. 253-262])

ILLUSTRATIONS FOR THE ARTICLE "PHENOTYPIC FEATURES OF DENDRITIC CELLS WHEN USING DIFFERENT MODES OF THEIR STIMULATED MATURATION" (AUTHORS: FADEYEV F.A., ALEKSANDROVA A.D., MOGILENSKIKH A.S. [pp. 253-262])

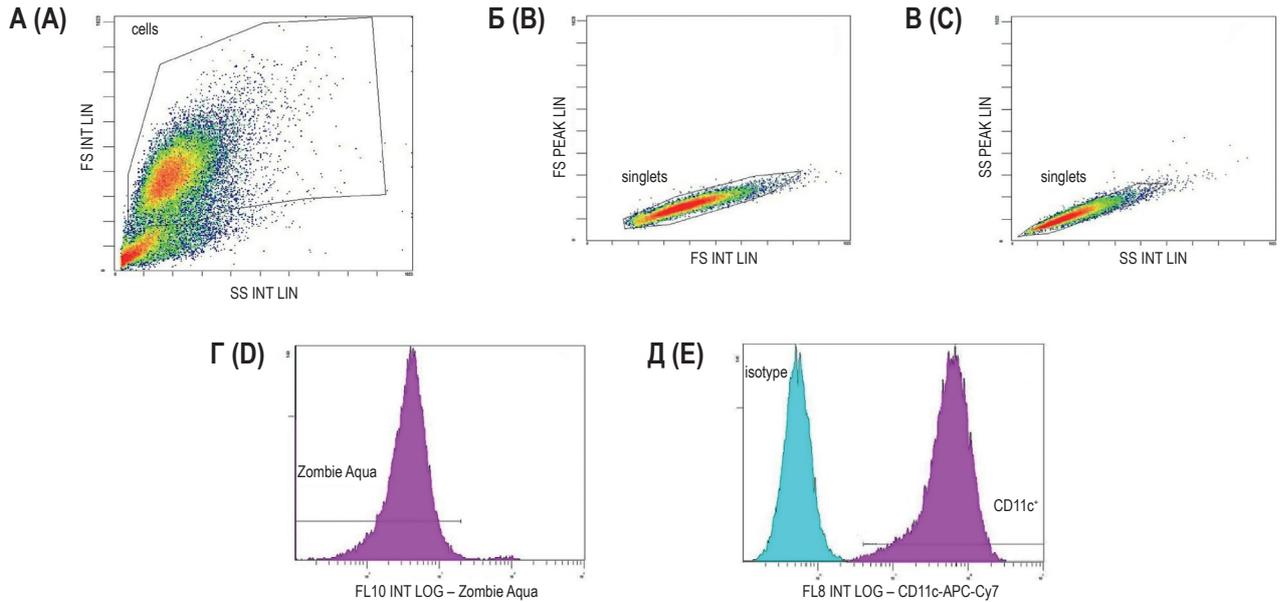


Рисунок 2. Схема гейтирования дендритных клеток (репрезентативный пример)

Примечание. А – выделение гейта по параметрам прямого (FS) и бокового (SS) светорассеяния. Б и В – исключение дуплетов по FS и SS соответственно. Г – исключение погибших клеток после окрашивания Zombie Aqua. Д – выделение популяции CD11c⁺ клеток (бирюзовый цвет – изотипический контроль). Анализ событий осуществляется последовательно, для каждого очередного гейтирования используется материал из предыдущего гейта.

Figure 2. Gating of dendritic cells (representative example)

Note. A, gating by forward (FS) and side scatter (SS). B and C, exclusion of doublets by FS and SS, respectively. D, exclusion of dead cell after Zombie Aqua staining. E, isolation of CD11c⁺ cells (turquoise color – isotype). Analysis of events was done sequentially, the material from previous gate was used for next gating.

ИЛЛЮСТРАЦИИ К СТАТЬЕ «НЕЛИНЕЙНЫЕ ГЛАВНЫЕ КОМПОНЕНТЫ ЦИТОКИНОВОГО ПРОФИЛЯ У ДЕТЕЙ С ВНЕБОЛЬНИЧНОЙ ПНЕВМОНИЕЙ» (АВТОРЫ: ИЗЮРОВА Н.В., НОХРИН Д.Ю., САВОЧКИНА А.Ю., УЗУНОВА А.Н. [с. 337-344])

ILLUSTRATIONS FOR THE ARTICLE "NONLINEAR MAIN COMPONENTS OF THE CYTOKINE PROFILE IN CHILDREN WITH COMMUNITY-ACQUIRED PNEUMONIA" (AUTHORS: IZIUROVA N.V., NOKHRIN D.YU., SAVOCHKINA A.YU., UZUNOVA A.N. [pp. 337-344])

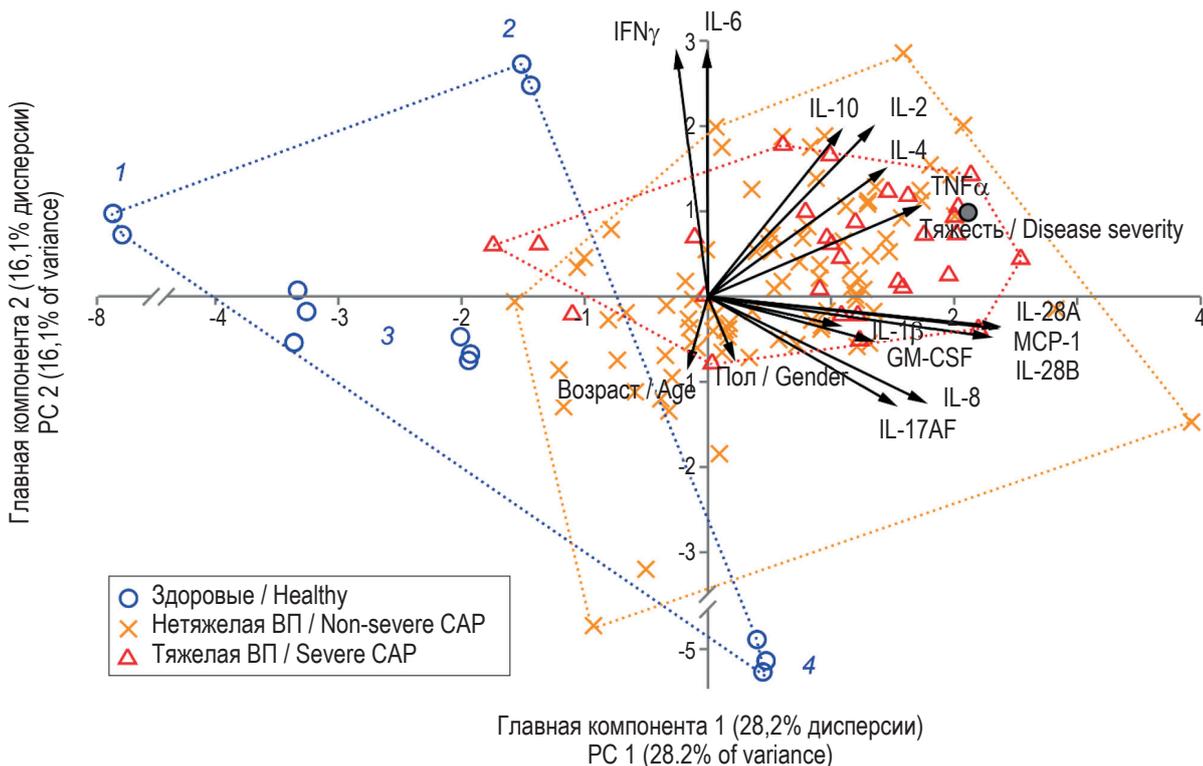


Рисунок 2. Здоровые дети и дети с внебольничной пневмонией (ВП) в пространстве двух первых нелинейных главных компонент

Figure 2. Healthy children and children with community-acquired pneumonia (CAP) in the space of the first two nonlinear principal components

**ПОДПИСНОЙ ИНДЕКС:
УРАЛ-ПРЕСС – 42311**

ISSN 1563-0625



9 771563 062002 >