

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

Том 26, № 3. С. 419-640

2024

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

МЕДИЦИНСКАЯ ИММУНОЛОГИЯ

ИЛЛЮСТРАЦИИ К СТАТЬЕ «ИНТЕГРАЦИОННЫЙ ДИАГНОСТИЧЕСКИЙ КРИТЕРИЙ, ОЦЕНИВАЮЩИЙ ТЯЖЕСТЬ ТЕЧЕНИЯ COVID-19 И РИСК ВОЗНИКНОВЕНИЯ ПОСТКОВИДНОГО СИНДРОМА» (АВТОРЫ: НЕСТЕРОВА И.В., АТАЖАХОВА М.Г., МАТУШКИНА В.А., ТЕТЕРИН Ю.В., ГОРОДИН В.Н., ЧУДИЛОВА Г.А. [с. 545-554])

ILLUSTRATIONS FOR THE ARTICLE "INTEGRATIVE DIAGNOSTIC CRITERION FOR EVALUATION OF COVID-19 SEVERITY AND THE RISK OF POST-COVID SYNDROME" (AUTHORS: NESTEROVA I.V., ATAZHAKHOVA M.G., MATUSHKINA V.A., TETERIN YU.V., GORODINA V.N., CHUDILOVA G.A. [pp. 545-554])

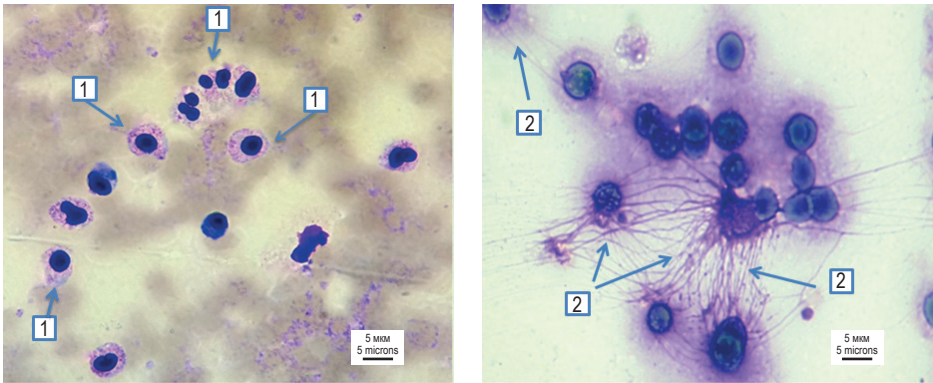


Рисунок 1. Нейтрофильные гранулоциты в апоптозе (1) и NETos (2) (указаны стрелками) 1000×, окраска по Романовскому–Гимзе
Figure 1. Neutrophilic granulocytes in apoptosis (1) and NETos (2) (indicated by arrows) 1000×, Romanowsky–Giemsa stain

ИЛЛЮСТРАЦИИ К СТАТЬЕ «ОПЫТ ПРИМЕНЕНИЯ ИММУНОМОДУЛИРУЮЩЕЙ ТЕРАПИИ В КОМПЛЕКСНОМ ЛЕЧЕНИИ НЕТЯЖЕЛОЙ ВНЕБОЛЬНИЧНОЙ ПНЕВМОНИИ И ЕЕ ОТДАЛЕННЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ» (АВТОРЫ: КОСТИНОВ М.П., ГАЙНИТДИНОВА В.В., КАЖАРОВА С.В., ВЛАСЕНКО А.Е., ПОЛИЩУК В.Б., АЛЛАБЕРДИНА Д.У. [с. 577-590])

ILLUSTRATIONS FOR THE ARTICLE "EXPERIENCE OF USING IMMUNOMODULATORY THERAPY IN THE COMPLEX TREATMENT OF MILD COMMUNITY-ACQUIRED PNEUMONIA AND ITS LONG-TERM RESULTS" (AUTHORS: KOSTINOV M.P., GAINITDINOVA V.V., KAZHAROVA S.V., VLASENKO A.E., POLISHCHUK V.B., ALLABERDINA D.U. [pp. 577-590])

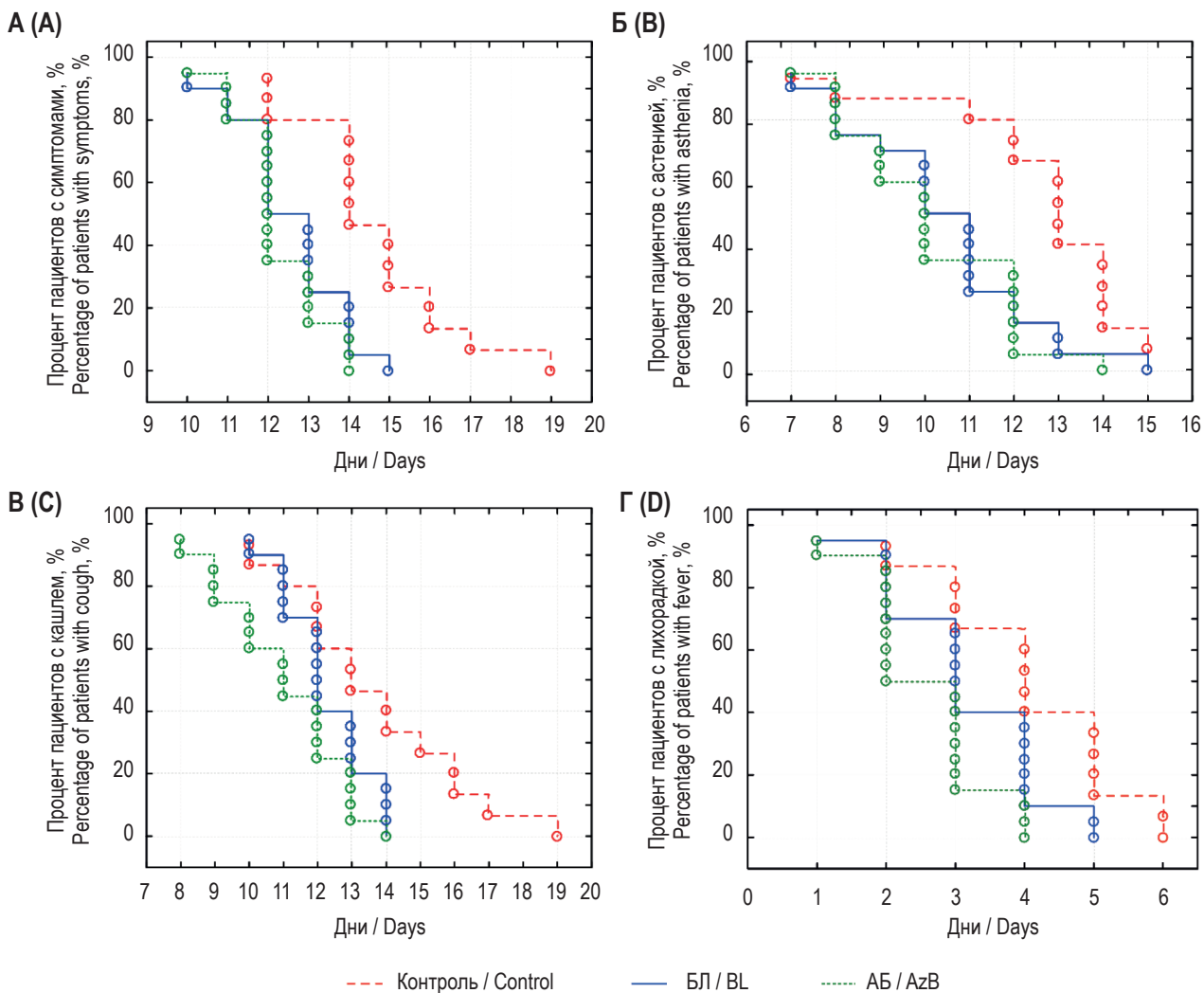


Рисунок 1. Кривые Каплана–Мейра для времени от начала лечения до исчезновения симптомов нетяжелой внебольничной пневмонии
Figure 1. Kaplan–Meir curves for the time from the start of treatment to the resolution of symptoms of non-severe community-acquired pneumonia

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

МЕДИЦИНСКАЯ ИММУНОЛОГИЯ

май-июнь

2024, том 26

№ 3

Основан в марте 1999 года

Главный редактор

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

Заместитель главного редактора

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

Редакционная коллегия

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

Кашкин Кирилл Павлович – доктор медицинских наук, профессор, академик РАН, заведующий кафедрой иммунологии Российской медицинской академии последиplomного 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@spb.aaci.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 №ФЦ77-60436 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 21.03.2024 г. Формат 60 x 90 1/8. Печать офсетная.

Усл. печ. л. 27,75. Тираж 2000 экз. (1-й завод – 1000 экз.) Заказ № 028

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

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

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

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

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

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

RUSSIAN ASSOCIATION OF ALLERGOLOGISTS AND CLINICAL IMMUNOLOGISTS,
ST. PETERSBURG REGIONAL BRANCH
(SPb RAACI)

MEDICAL IMMUNOLOGY/ MEDITSINSKAYA IMMUNOLOGIYA

May-June

2024, volume 26

No.3

Published since March 1999

Editor-in-Chief

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

Deputy Editor-in-Chief

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

Editorial Board

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

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

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

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

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

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

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

Managing Editor:

Natalia Rakitianskaia
E-mail: medimmun@spbraaci.ru

Translation editor:

Alexey B. Chukhlov, PhD, MD

Online version editorial manager:

Erofeeva V.S.

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

Address for correspondence:

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

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

© Medical Immunology

The Journal is registered at the North Western

Regional Administration for the Press Affairs

of the Russian Federation, March 26, 1999.

Certificate of registration PI № 77-15892

by the Ministry of Press, Television,

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

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

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

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 21.03.2024. Print format 60 x 90 1/8. Offset printing.

Printed sheets 27.75. Circulation 2000 copies. (1st edition – 1000 copies.)

Print in LLC «ARTEMIDA»

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

Phone: (812) 950-10-99

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

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

Boris V. Pinegin – PhD, MD, Professor, Institute of Immunology, Department of Immunodiagnostics 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

Жагулева А.С., Зементова М.С., Сельков С.А., Соколов Д.И.

МАКРОФАГИ M1/M2: ПРОИСХОЖДЕНИЕ, ФЕНОТИП, СПОСОБЫ ПОЛУЧЕНИЯ, ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ
С ЕСТЕСТВЕННЫМИ КИЛЛЕРАМИ И ТРОФОБЛАСТОМ..... 425

Топтыгина А.П.

РОЛЬ НЕКАНОНИЧЕСКИХ Т-КЛЕТОК В ГОМЕОСТАЗЕ И ПАТОЛОГИИ..... 449

Саидов М.З.

СТЕРИЛЬНОЕ ВОСПАЛЕНИЕ, КРОСС-ПРЕЗЕНТАЦИЯ, АУТОФАГИЯ И АДАПТИВНЫЙ ИММУНИТЕТ
ПРИ ИММУНОВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ РЕВМАТИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ..... 465

Оригинальные статьи

Старикова Э.А., Маммедова Дж.Т., Ожиганова А., Лебедева А.М., Левешко Т.А., Бузова Л.А., Кудрявцев И.В.

ВЛИЯНИЕ СТРЕПТОКОККОВОЙ АРГИНИНДЕИМИНАЗЫ НА ФУНКЦИОНАЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ CD4⁺ И CD8⁺ ПОПУЛЯЦИЙ
Т-ЛИМФОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА..... 503

Калашникова А.А., Бычкова Н.В.

МИНОРНАЯ ПОПУЛЯЦИЯ НК-ЛИМФОЦИТОВ С КОЭКСПРЕССИЕЙ CD19 513

Богомазова А.А., Решетникова И.Д., Скибо Ю.В., Абрамова З.И.

АССОЦИАЦИЯ ПОЛИМОРФИЗМА V α 1 ГЕНА NR3C1 С НАРУШЕНИЕМ ПРОГРАММИРУЕМОЙ КЛЕТОЧНОЙ ГИБЕЛИ
ЛИМФОЦИТОВ БОЛЬНЫХ АТОПИЧЕСКОЙ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМОЙ..... 523

Савлевиц Е.Л., Любимова Е.В., Зурочка А.В., Митрофанова Е.С., Шиловский И.П.

ЦИТОКИНОВЫЙ ПРОФИЛЬ ТКАНИ НОСОВЫХ ПОЛИПОВ И КЛИНИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ПАЦИЕНТОВ С РАЗНОЙ
СТЕПЕНЬЮ МЕДИКАМЕНТОЗНОГО КОНТРОЛЯ И ТЯЖЕСТИ ТЕЧЕНИЯ ПОЛИПОЗНОГО РИНОСИСУСИТА 533

Нестерова И.В., Атажахова М.Г., Матушкина В.А., Тетерин Ю.В., Горodin В.Н., Чудилова Г.А.

ИНТЕГРАЦИОННЫЙ ДИАГНОСТИЧЕСКИЙ КРИТЕРИЙ, ОЦЕНИВАЮЩИЙ ТЯЖЕСТЬ ТЕЧЕНИЯ COVID-19 И РИСК
ВОЗНИКНОВЕНИЯ ПОСТКОВИДНОГО СИНДРОМА..... 545

Владимиров И.С., Жданова А.С., Мухин В.Е., Макаров В.В., Юдин В.С., Краевой С.А.

ИДЕНТИФИКАЦИЯ И ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА SARS-CoV-2-СПЕЦИФИЧНЫХ Т-ЛИМФОЦИТОВ
У ПЕРЕНЕСШИХ COVID-19 ПАЦИЕНТОВ В ПЕРИОД ДО 16 МЕСЯЦЕВ ОТ НАЧАЛА ЗАБОЛЕВАНИЯ..... 555

Черепович Б.С., Кудряшова А.М., Карташова Н.П., Грачева А.В., Мануйлов В.А., Ленева И.А., Борисова О.В., Свитич О.А.

ПСЕВДОНЕЙТРАЛИЗУЮЩИЙ ТЕСТ ДЛЯ ДОКЛИНИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ ВАКЦИН ПРОТИВ SARS-CoV-2..... 569

Костинов М.П., Гайнитдинова В.В., Кажарова С.В., Власенко А.Е., Полищук В.Б., Аллабердина Д.У.

ОПЫТ ПРИМЕНЕНИЯ ИММУНОМОДУЛИРУЮЩЕЙ ТЕРАПИИ В КОМПЛЕКСНОМ ЛЕЧЕНИИ НЕТЯЖЕЛОЙ
ВНЕБОЛЬНИЧНОЙ ПНЕВМОНИИ И ЕЕ ОТДАЛЕННЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ..... 577

Копать В.В., Рябенкова А.А., Чирак Е.Л., Чирак Е.Р., Саенко А.И., Кудрявцев И.В., Трулев А.С., Савин Т.В., Зуева Е.В.,

Симбирцев А.С., Тополян Арс А., Духовлинов И.В.

РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ ОЧИСТКИ, БИОХИМИЧЕСКАЯ И ИММУНОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РЕКОМБИНАНТНОГО
ХИМЕРНОГО АНТИГЕНА ДЛЯ ОЦЕНКИ Т-КЛЕТОЧНОГО ИММУНИТЕТА ПРОТИВ КОРОНАВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ..... 591

Краткие сообщения

Шепелькова Г.С., Зайцева А.С., Евстифеев В.В., Адамовская Е.Н., Шмелев Е.И., Еремеев В.В.

МИКРОРНК КАК МАРКЕРЫ ФИБРОЗИРОВАНИЯ У ПАЦИЕНТОВ С ГИПЕРЧУВСТВИТЕЛЬНЫМ ПНЕВМОНИТОМ 607

Альпидовская О.В.

УРОВЕНЬ ЦИТОКИНОВ IL-6, IL-10, IL-18, TNF α В УСЛОВИЯХ ТАБАЧНОЙ ИНТОКСИКАЦИИ И ПОСЛЕ
ВВЕДЕНИЯ АМИНОФАЛГИДРАЗИДА 613

Тюмина О.В., Овчинников П.А., Трусова Л.М., Тюмин И.В., Давыдкин И.Л.

ОСОБЕННОСТИ ЛЕЙКОЦИТАРНОГО ПУЛА КОНЦЕНТРАТА КЛЕТОК ПУПОВИННОЙ КРОВИ, ЗАГОТОВЛЕННОГО
ДЛЯ ДОЛГОСРОЧНОГО КРИОХРАНЕНИЯ..... 617

Случай из практики

Шабалдин А.В., Мухамадияров Р.А., Кошелев В.А., Ведерникова А.В., Ровда Ю.И., Гришачева Е.О., Халивопуло И.К.,

Миняйлова Н.Н., Ляпин А.А.

ВОЗМОЖНОСТИ СКАНИРУЮЩЕЙ ЭЛЕКТРОННОЙ МИКРОСКОПИИ В ОБРАТНО-РАССЕЯННЫХ ЭЛЕКТРОНАХ
ДЛЯ МОРФОЛОГИЧЕСКОЙ И ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ ОЦЕНКИ ТИМУСА, ВЫНУЖДЕННО УДАЛЕННОГО У ДЕТЕЙ ПЕРВЫХ
НЕДЕЛЬ ЖИЗНИ С ВРОЖДЕННЫМИ ПОРОКАМИ СЕРДЦА..... 625

Правила для авторов 637

Авторский указатель..... 640

Предметный указатель..... 640

CONTENTS

Reviews

Zhguleva A.S., Zementova M.S., Selkov S.A., Sokolov D.I.

M1/M2 MACROPHAGES: ORIGIN, PHENOTYPE, METHODS OF PRODUCTION, INTERACTION WITH NATURAL KILLER CELLS AND TROPHOBLAST	425
--	-----

Toptygina A.P.

ROLE OF NON-CANONICAL T CELLS IN HOMEOSTASIS AND PATHOLOGY	449
--	-----

Saidov M.Z.

STERILE INFLAMMATION, CROSS-PRESENTATION, AUTOPHAGY AND ADAPTIVE IMMUNITY IN IMMUNOINFLAMMATORY RHEUMATIC DISEASES	465
--	-----

Original articles

Starikova E.A., Mammedova J.T., Ozhiganova A., Lebedeva A.M., Leveshko T.A., Burova L.A., Kudryavtsev I.V.

EFFECT OF STREPTOCOCCAL ARGININE DEIMINASE ON THE FUNCTION OF CD4 ⁺ AND CD8 ⁺ T LYMPHOCYTES	503
---	-----

Kalashnikova A.A., Bychkova N.V.

MINOR POPULATION OF NK LYMPHOCYTES WITH CD19 COEXPRESSION	513
---	-----

Bogomazova A.A., Reshetnikova I.D., Skibo Yu.V., Abramova Z.I.

ASSOCIATION OF NR3C1 Bcl1 GENE POLYMORPHISM WITH IMPAIRED PROGRAMMED CELL DEATH OF LYMPHOCYTES IN PATIENTS WITH ATOPIC BRONCHIAL ASTHMA	523
---	-----

Savlevich E.L., Lyubimova E.V., Zurochka A.V., Mitrofanova E.S., Shilovskiy I.P.

CYTOKINE PROFILE OF NASAL POLYPS AND CLINICAL CHARACTERISTICS OF PATIENTS WITH POLYPOUS RHINOSINUSITIS AT DIFFERENT DEGREE OF THERAPEUTIC CONTROL AND DISEASE SEVERITY	533
--	-----

Nesterova I.V., Atazhakhova M.G., Matushkina V.A., Teterin Yu.V., Gorodina V.N., Chudilova G.A.

INTEGRATIVE DIAGNOSTIC CRITERION FOR EVALUATION OF COVID-19 SEVERITY AND THE RISK OF POST-COVID SYNDROME	545
--	-----

Vladimirov I.S., Zhdanova A.S., Mukhin V.E., Makarov V.V., Yudin V.S., Kraevoy S.A.

IDENTIFICATION AND FUNCTIONAL CHARACTERISTIC OF SARS-CoV-2-SPECIFIC T LYMPHOCYTES IN COVID-19 PATIENTS UP TO 16 MONTHS AFTER DISEASE ONSET	555
--	-----

Cherepovich B.S., Kudryashova A.M., Kartashova N.P., Gracheva A.V., Manuilov V.A., Leneva I.A., Borisova O.V., Svitich O.A.

PSEUDONEUTRALIZING TEST FOR PRECLINICAL STUDIES OF VACCINES AGAINST SARS-CoV-2	569
--	-----

Kostinov M.P., Gainitdinova V.V., Kazharova S.V., Vlasenko A.E., Polishchuk V.B., Allaberdina D.U.

EXPERIENCE OF USING IMMUNOMODULATORY THERAPY IN THE COMPLEX TREATMENT OF MILD COMMUNITY-ACQUIRED PNEUMONIA AND ITS LONG-TERM RESULTS	577
--	-----

Kopat V.V., Riabchenkova A.A., Chirak E.L., Chirak E.R., Saenko A.I., Kudryavtsev I.V., Trulioff A.S., Savin T.V., Zuyeva E.V., Simbirtsev A.S., Totolian Areg A., Dukhovlinov I.V.

PURIFICATION TECHNOLOGY DESIGN, BIOCHEMICAL AND IMMUNOLOGICAL CHARACTERISTICS OF THE RECOMBINANT CHIMERIC ANTIGEN FOR EVALUATION OF T CELL IMMUNITY AGAINST CORONAVIRUS INFECTION	591
---	-----

Short communications

Shepelkova G.S., Zaytseva A.S., Evstifeev V.V., Adamovskaya E.N., Shmelev E.I., Yermeev V.V.

MICRORNAs AS FIBROSIS MARKERS IN PATIENTS WITH HYPERSENSITIVITY PNEUMONITIS	607
---	-----

Alpidovskaya O.V.

PLASMA LEVELS OF IL-6, IL-10, IL-18, TNF α UNDER THE CONDITIONS OF TOBACCO INTOXICATION AND AFTER TREATMENT WITH AMINOPHTHALHYDRAZIDE	613
--	-----

Tyulina O.V., Ovchinnikov P.A., Trusova L.M., Tyumin I.V., Davydkin I.L.

FEATURES OF THE LEUKOCYTE POOL OF UMBILICAL CELL BLOOD CELL CONCENTRATE PREPARED FOR LONG-TERM CRYOSTORAGE	617
--	-----

Clinical case

Shabaldin A.V., Mukhamadiyarov R.A., Koshelev V.A., Vedernikova A.V., Rovda Yu.I., Grishacheva E.O., Khalivopulo I.K., Minyailova N.N., Lyapin A.A.

APPLICATIONS OF EMBEDDING AND BACKSCATTERED SCANNING ELECTRON MICROSCOPY FOR MORPHOLOGICAL AND FUNCTIONAL ASSESSMENT OF THE THYMUS FORCEDLY REMOVED IN CHILDREN WITH CONGENITAL HEART DEFECTS DURING THE FIRST WEEKS OF LIFE	625
--	-----

Instructions to Authors	637
-------------------------------	-----

Author index	640
--------------------	-----

Subject index	640
---------------------	-----

МАКРОФАГИ М1/М2: ПРОИСХОЖДЕНИЕ, ФЕНОТИП, СПОСОБЫ ПОЛУЧЕНИЯ, ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ С ЕСТЕСТВЕННЫМИ КИЛЛЕРАМИ И ТРОФОБЛАСТОМ

Жгулева А.С.¹, Зементова М.С.¹, Сельков С.А.^{1,2}, Соколов Д.И.^{1,2}

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

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

Резюме. В настоящем обзоре представлены современные данные о происхождении моноцитов/макрофагов, условиях, необходимых для дифференцировки моноцитов в макрофаги М1 или М2. Описаны три субпопуляции моноцитов периферической крови: 1) классические – основная субпопуляция (85-90%), эффективно осуществляющая фагоцитоз; 2) промежуточные моноциты (5-10%) – участвуют в процессинге и презентации антигена, в ангиогенезе, восстановлении эндотелия сосудов; 3) неклассические моноциты (10%) – «патрулируют» сосудистую сеть, удаляют клеточный дебрис, участвуют в ремоделировании тканей. В обзоре приведены подробные характеристики для каждого подкласса макрофагов: провоспалительные (М1) и противовоспалительные (М2), играющие разные роли в инициации и разрешении воспаления; описаны их фенотип, спектр секретируемых цитокинов, экспрессия транскрипционных факторов, выполняемые функции. Для популяции М2 подробно описаны особенности субпопуляции: М2а, М2b, М2с, М2d. В обзоре приведены методы и подходы к получению поляризованных макрофагов в условиях *in vitro* как из моноцитов периферической крови, так и из клеток перевиваемых культур, основанные на сигналах, получаемых макрофагами в условиях *in vivo*; приведены фенотип, продукция цитокинов и функциональные свойства искусственно поляризованных макрофагов в зависимости от условий их получения. В обзоре подробно рассматриваются особенности контактного и дистантного взаимодействия макрофагов различных подклассов с клетками микроокружения на примере естественных киллеров и клеток трофобласта, приводятся сведения об изменении фенотипа, транскрипционного и секреторного профиля взаимодействующих клеток. Описаны механизмы контроля трофобластом дифференцировки макрофагов в уникальную М2-популяцию децидуальных макрофагов, контролирующей как развитие и функционирование трофобласта, так и его апоптоз. В обзоре подробно рассматриваются известные на сегодняшний день варианты взаимодействия субпопуляций макрофагов с естественными киллерами. Влияние Мφ на НК-клетки проявляется в изменении экспрессии последними транскрипционных факторов, определяющих не только их дифференцировку, но и функциональную активность. Макрофаги рассма-

Адрес для переписки:

Зементова Мария Сергеевна
ФГБНУ «Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии имени Д.О. Отта»
199034, Россия, Санкт-Петербург,
Менделеевская линия, 3.
Тел.: 8 (951) 650-25-28.
E-mail: marizementova@mail.ru

Address for correspondence:

Maria S. Zementova
D. Ott Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductology
3 Mendeleevskaya Line
St. Petersburg
199034 Russian Federation
Phone: +7 (951) 650-25-28.
E-mail: marizementova@mail.ru

Образец цитирования:

А.С. Жгулева, М.С. Зементова, С.А. Сельков, Д.И. Соколов «Макрофаги М1/М2: происхождение, фенотип, способы получения, взаимодействие с естественными киллерами и трофобластом» // Медицинская иммунология, 2024. Т. 26, № 3. С. 425-448. doi: 10.15789/1563-0625-ММО-2877

© Жгулева А.С. и соавт., 2024

Эта статья распространяется по лицензии Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

A.S. Zhguleva, M.S. Zementova, S.A. Selkov, D.I. Sokolov "M1/M2 macrophages: origin, phenotype, methods of production, interaction with natural killer cells and trophoblast", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2024, Vol. 26, no. 3, pp. 425-448. doi: 10.15789/1563-0625-ММО-2877

© Zhguleva A.S. et al., 2024

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

DOI: 10.15789/1563-0625-ММО-2877

триваются как клетки, активно влияющие на функциональное состояние и дифференцировку естественных киллеров. В обзоре рассматриваются механизмы взаимоотношений всех трех типов клеток: макрофагов, трофобласта и естественных киллеров в зоне маточно-плацентарного контакта. Изучение взаимодействий этих клеток прольет свет не только на особенности межклеточных взаимоотношений в зоне маточно-плацентарного контакта, но и на взаимоотношения клеток опухолей с НК-клетками и макрофагами.

Ключевые слова: макрофаг, моноцит, НК-клетки, трофобласт, беременность, плацента, раковые опухоли

M1/M2 MACROPHAGES: ORIGIN, PHENOTYPE, METHODS OF PRODUCTION, INTERACTION WITH NATURAL KILLER CELLS AND TROPHOBLAST

Zhguleva A.S.^a, Zementova M.S.^a, Selkov S.A.^{a, b}, Sokolov D.I.^{a, b}

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

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

Abstract. This review presents current data on the origin of monocytes/macrophages, the conditions necessary for the differentiation of monocytes into M1 or M2 macrophages. Three subpopulations of peripheral blood monocytes are described: (I) classical – the main subpopulation (85-90%), effectively carrying out phagocytosis; (II) intermediate monocytes (5-10%) – participate in antigen processing and presentation, in angiogenesis, vascular endothelium restoration; (III) non-classical monocytes (10%) – "patrol" vascular network, remove cellular debris, participate in tissue remodeling. The review provides detailed characteristics for each subclass of macrophages: pro-inflammatory (M1) and anti-inflammatory (M2), which play different roles in the initiation and resolution of inflammation; their phenotype, the spectrum of secreted cytokines, the expression of transcription factors, and the functions performed are described. For the M2 population, the features of the subpopulation are described in detail: M2a, M2b, M2c, M2d. The review presents methods and approaches to obtaining polarized macrophages *in vitro* from both peripheral blood monocytes and cells of transplanted cultures based on signals received by macrophages *in vivo*; the phenotype, cytokine production and functional properties of artificially polarized macrophages depending on the conditions of their production are given. The review examines in detail the features of contact and distant interaction of macrophages of various subclasses with microenvironment cells on the example of natural killer cells and trophoblast cells, provides information on changes in the phenotype, transcriptional and secretory profile of interacting cells. The mechanisms of trophoblast control of macrophage differentiation into a unique M2 population of decidual macrophages controlling both the development and functioning of the trophoblast and its apoptosis are described. The review examines in detail the currently known variants of the interaction of macrophage subpopulations with natural killers. The influence of Mφ on NK cells manifests itself in a change in the expression of transcription factors by the latter, which determine not only their differentiation, but also their functional activity. Macrophages are considered as cells that actively influence the functional state and differentiation of natural killers. The review examines the mechanisms of the relationship of all three types of cells: macrophages, trophoblast and natural killers in the area of uteroplacental contact. The study of the interactions of these cells will shed light not only on the features of intercellular relationships in the area of uteroplacental contact, but also on the relationship of tumor cells with NK cells and macrophages.

Keywords: macrophage, monocyte, NK cells, trophoblast, pregnancy, placenta, cancerous tumors

Работа поддержана государственной программой поисковых научных исследований № 1022040700815-2-3.2.2;3.1.3-1-11 (FGWN-2023-0006).

1. Моноцитарно-макрофагальная система

1.1. Происхождение моноцитов и макрофагов и их роль в организме

Моноциты (Мн) и макрофаги (Мφ) являются ключевыми компонентами врожденной иммун-

ной системы и играют важную роль как в регуляции возникновения, развития и разрешения воспаления в организме, так и в иммунорегуляции, регенерации, восстановлении тканей. Образование клеток моноцитарной линии ведется от гемопоэтических стволовых клеток (HSC) в красном костном мозге через несколько миелоидных предшественников и приводит к появлению Мн, циркулирующих в крови [40]. Клетки системы

мононуклеарных фагоцитов [106] включают Мн, дендритные клетки, тканевые Мф, способные регулировать воспалительные реакции в организме.

У человека среди Мн периферической крови выделяют следующие субпопуляции, различающиеся по функции и экспрессии рецепторов CD14 и CD16 [51, 76]: 1) классические Мн (CD14⁺⁺/CD16⁻ или CD14⁺/CD16⁻), основная субпопуляция (85-90%), экспрессируют рецепторы CD36, CD64, CCR2^{high}CX3CR1^{low}, эффективно осуществляют фагоцитоз, продуцируют IL-10 [45, 97]; 2) промежуточные Мн (CD14⁺⁺/CD16⁺ или CD14⁺/CD16⁺), составляет 5-10% от всех Мн, характеризуются высокой экспрессией молекул CCR2^{low}CX3CR1^{high} [97], CCR5 и HLA-DR, участвуют в процессинге и презентации антигена, а также в ангиогенезе, восстановлении эндотелия сосудов [45, 116]; 3) неклассические Мн, составляют примерно 10% Мн, характеризуются высоким уровнем экспрессии CD16 при низком уровне CD14 [45, 116], экспрессируют CCR2^{low}CX3CR1^{high} [97], «патрулируют» сосудистую сеть, удаляют клеточный дебрис, могут рекрутироваться в невоспаленные ткани CX3CR1-зависимым образом [45, 116], участвуют в ремоделировании тканей, способствуют ангиогенезу благодаря секреции VEGF [51], экспрессируют TLR7/8 [116], HLA-DR, осуществляют презентацию антигенов [51]. Неклассические и промежуточные Мн продуцируют провоспалительные цитокины, такие как IL-1 β , TNF α , IL-12, а также активные формы кислорода (ROS) и оксид азота (NO) [51, 91]. Сравнительно недавно было обнаружено подмножество Мн с фенотипом (CD14⁺⁺/CD56⁺) [48]. Они составляют небольшое (около 5%) количество от всех Мн крови у здоровых людей, однако их количество увеличивается с возрастом [105], а также при некоторых аутоиммунных заболеваниях (болезнь Крона, ревматоидный артрит) [48]. Обнаружено, что CD56⁺ Мн преимущественно CD16⁻ и, следовательно, принадлежат к субпопуляции классических Мн (CD14⁺CD16⁻CD56⁺) [48]. Сообщалось, что подмножество CD56⁺ Мн продуцирует повышенные уровни цитокинов TNF α , IL-23, IL-10 в ответ на стимуляцию LPS и имеет более высокую спонтанную продукцию ROS в сравнении с CD56⁻ классическими Мн [48].

Конечной стадией дифференцировки клеток моноцитарного ряда являются мононуклеарные фагоциты — макрофаги, которые находятся вне сосудистого русла, мигрируя в ткани: кишечника, селезенки, альвеол легких, матки. Миграция моноцитов из кровотока в ткани обычно наблюдается при инфекциях [33], аутоиммунных заболеваниях [13], других физиологических состояниях. Также установлена возможность конечной дифференцировки Мн в дендритные клетки [97].

Макрофаги обладают уникальными способностями уничтожать патогенные микроорганизмы или восстанавливать повреждения, связанные с воспалением в организме [92]. Они модулируют воспалительные процессы от распознавания и уничтожения патогенов до окончательной стадии фагоцитоза апоптотических тел и заживления ран. В местах повреждения Мн и Мф могут также стимулировать ангиогенез, фиброгенез, секретировать факторы роста, которые направляют дифференцировку и пролиферацию клеток-предшественников, высвобождают медиаторы воспаления, которые рекрутируют другие иммунные клетки [73]. Свойство Мф менять фенотип при воздействии сигналов тканевого микроокружения позволяет регулировать иммунный ответ и воспалительные процессы. Таким образом, во время заболевания или повреждения тканей в организме гетерогенные популяции Мн рекрутируются из кровотока, где они могут временно пребывать в виде Мн или дифференцироваться в Мф, варьирующие по фенотипу от M1-типа до M2-типа [26, 73, 117].

1.2. Парадигма M1/M2 поляризации Мф

В соответствии с традиционной парадигмой Мф подразделяются на провоспалительные (M1), неактивированные (M0) и противовоспалительные (M2) субпопуляции, которые играют разные роли в инициации и разрешении воспаления [122]. Неактивированные («наивные», интактные) M0 макрофаги при различных условиях поляризуются, превращаясь либо в макрофаги M1, либо в макрофаги M2 [64]. Активированные Мф разделяют на два фенотипа: M1 (классические, провоспалительного типа) и M2 (альтернативные, противовоспалительного типа). Поляризация Мф происходит под контролем различных программ активации метаболизма аргинина в клетках. Основное различие в метаболизме между субпопуляциями состоит в том, что у клеток M1 метаболизм L-аргинина определяет способность генерировать «атакующую» молекулу NO, способствующую резобции патогенов; у макрофагов M2 метаболизм L-аргинина направлен на трансформацию в «восстановленную» молекулу орнитин [75], которая затем используется для синтеза пролина, коллагена, пролиферации клеток, стимуляции фиброза. Факторы, определяющие, какой путь активации будет являться доминирующим, основаны на окружающих сигналах, которым подвергаются Мф, и доступном пуле аргинина [136]. Макрофаги M1 и M2 имеют разные функции и профили транскрипции [92]. Фенотип и функциональная поляризация Мф регулируются множеством факторов. У активированных макрофагов M1 и M2 появляются специфические маркеры в результате приобретения ими того или другого фенотипа под контролем активации внутриклеточных сигналов. Это активаторы транс-

крипции, адаптерные и сигнальные молекулы, которые влияют на поляризацию Мф: преобразователи сигналов и активаторы транскрипции (STAT), регуляторные факторы интерферонов (IRF), ядерный фактор-каппа В (NF-κB), рецепторы, регулируемые пролифератором пероксисом (PPAR), факторы, индуцируемые гипоксией (HIF) и другие. Они взаимодействуют друг с другом, регулируют фенотип Мф [56]. Поляризация Мф в М1-фенотип регулируется активацией внутриклеточных сигналов NF-κB, STAT1/2, STAT5, HIF-1α, IRF3, IRF5 [3, 125]. В поляризации к М2-фенотипу задействованы STAT3, STAT6, HIF-2α, IRF4, PPAR, PPARγ, PI3K, SMAD3 и другие [3, 105, 125]. Внутри классически и альтернативно активированных Мф также выделяют субпопуляции, обладающие уникальным фенотипом, секрецией цитокинов и функциями (табл. 1).

1.3. Макрофаги М1

Активация Мф LPS и/или цитокинами Th1 (включая IFNγ и TNFα) [122], либо GM-CSF приводит к М1-поляризации – классическая активация Мф [6, 17, 52, 126]. М1-макрофаги являются провоспалительными, поскольку они играют весомую роль в уничтожении бактерий и инициируют воспаление. Они уничтожают патогенные микроорганизмы, высвобождая активные формы кислорода и азота. При активации рецептора CD14 значительно усиливается секреция TNFα, IL-1α, IL-1β, IL-6, IL-12, IL-15, IL-18, IL-23; циклооксигеназы-2 (Cox-2) [4, 47], способствующих воспалению. М1-макрофаги также осуществляют противоопухолевую функцию [118]. В соответствии с воздействием воспалительных стимулов выделяют три подтипа Мф с провоспалительным М1-подобным фенотипом [75].

Первый подтип – М1, активируемый IFNγ, играет важную роль в активации Th1-ответа, характеризуется высокой антигенпрезентирующей и бактерицидной активностью [52]. IFNγ через путь JAK1/2-STAT1 индуцирует высокий уровень экспрессии молекул локуса MHC II, индуцибельной оксидазы азота (iNOS), хемокинов CXCL9 и CXCL12 (аттрактанты для Th1), противовирусных факторов у Мф фенотипа М1 [15, 52, 56]. Эти Мф обладают усиленной продукцией активных форм кислорода и азота [14].

Второй подтип – М1, индуцируемый LPS или другими патоген-ассоциированными молекулярными паттернами (PAMP), которые вызывают активацию NF-κB и связанную с ним экспрессию генов провоспалительных цитокинов, стимулируя устойчивую секрецию IL-1, IL-2, IL-3, IL-5, IL-8, IL-6, цитокинов семейства IL-12, Cox-2, CCL5, NO, TNFα^{high}, а также IL-10^{low} [6, 17].

Третий подтип – М1, стимулированный GM-CSF. При стимуляции рецептора к GM-CSF происходит индукция IRF5 [52]. Действие GM-CSF усиливает антигенпредставляющую функцию,

фагоцитоз, антимикробную активность и выработку провоспалительных цитокинов (IL-1β, IL-6, IL-8, TNFα) и факторов роста (M-CSF, GM-CSF) в активированных Мф [75]. М1-активация макрофагов индуцируется также при гипоксии, которая может быть связана как с бактериальными инфекциями [75], так и с начальными этапами формирования плаценты [58]. В условиях гипоксии стабилизируется функция транскрипционного фактора HIF-1α, который активирует экспрессию NF-κB-связанных генов и продукцию провоспалительных медиаторов [124].

Фенотипически Мф М1 характеризуются высокой экспрессией MHC II (HLA-DR), CD80 и CD86, CD64, CD32, iNOS [69]. Кроме этого, М1 отличаются экспрессией TLR4 и TLR2, секрецией IFNγ и TNFα, а также CXCL9, CXCL10. Эти цитокины вызывают дальнейшую поляризацию М1 посредством положительной обратной связи [125].

Классически активированные Мф, таким образом, связаны с повышенной бактерицидной активностью в местах воспаления и эффективной антигенпрезентирующей функцией; они активируются при вирусных, бактериальных инфекциях или повреждениях тканей.

1.4. Макрофаги М2

Макрофаги М2 секретируют противовоспалительные цитокины (IL-12^{low}IL-10^{high}TGF-β) [64], способствуя подавлению воспаления, направляют иммунный ответ в сторону Th2 или регуляторного IL-10-ассоциированного иммунитета. Функционально М2-макрофаги способствуют ремоделированию тканей сильной способностью к фагоцитозу, индуцируют фиброз, ангиогенез, васкулогенез, способствуют опухолевой прогрессии [114]. Все это возможно благодаря широкому спектру секретируемых ими функциональных молекул: цитокинов, факторов роста, компонентов внеклеточного матрикса (табл. 1).

Активируются М2 Мф при воздействии широкого спектра стимулов: цитокинов Th2, G-CSF, гормонов, в микроокружении опухолей или паразитарных инвазий. Специфические факторы могут вызывать дифференцировку Мф как минимум на четыре подтипа М2-подобных Мф [9, 114]: М2а, М2б, М2с и М2д, – каждый из которых продуцирует альтернативные репертуары цитокинов (табл. 1).

Благодаря такому разнообразию подтипов, альтернативно активированные Мф выполняют широкий спектр функций в тканях. Так, макрофаги М2а являются противовоспалительными, истинно противоположными М1 – играют важную роль в Th-2-ответе и восстановлении тканей путем секреции TGF-β, фибронектина, секретируют IL-10^{high} [133]. Макрофаги М2б осуществляют регуляцию иммунного ответа за счет

ТАБЛИЦА 1. РАЗЛИЧИЯ БИОЛОГИЧЕСКИХ И ФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ ОСОБЕННОСТЕЙ СУБПОПУЛЯЦИЙ МАКРОФАГОВ M1 И M2 [11, 13, 15, 31, 42, 50, 70, 78, 90, 92, 124, 132, 133]

TABLE 1. DIFFERENCES IN BIOLOGICAL AND PHYSIOLOGICAL CHARACTERISTICS OF M1 AND M2 MACROPHAGE SUBPOPULATIONS [11, 13, 15, 31, 42, 50, 70, 78, 90, 92, 124, 132, 133]

Популяция Population	Активаторы Activators	Фенотип Phenotype	Секретируемые цитокины Secreted cytokines	Функции Functions
M1	LPS, IFN γ , TNF α , GM-CSF	CD80, CD86, CD68, CD16, CD32, CD64, IL-1R, TLR2, TLR4, IL-12, CCR7 ^{high} , CCR11, CCR17, CCR22, HLA-DR	TNF α , IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-12 ^{high} , IL-15, IL-16, IL-18, IL-23 ^{high} , IL-27, IL-10 ^{low} , INF γ , MIP-3a, MCP-1, CXCL1, CXCL2, CXCL3, CXCL5, CXCL9, CXCL10, CXCL11, CXCL12, CXCL16, CCL5, NO, ROS, CCL2, CCL3, CCL4	Провоспалительный ответ, антимикробная защита, противоопухолевая активность, содействие имплантации эмбриона Pro-inflammatory response, antimicrobial protection, antitumor activity, promotion of embryo implantation
M2a	IL-4, IL-13, IL-33, G-CSF, грибковые и паразитарные инфекции IL-4, IL-13, IL-33, G-CSF, fungal and parasitic infections	CD206, IL-1ra, CD163, CD209 (DC-SIGN), Dectin-1 ^{high} , CD86 ^{low} , CD14 ^{low-medium} , IL-1R	IL-10 ^{high} , TGF- β , CCL14, CCL17, CCL18, CCL22, CCL23, CCL24, CCL26, CCL13, fibronectin, TNF α ^{low} , IL-1ra, IGF, EPGF, IL-4	Противовоспалительное действие, активация Th2-ответа, фагоцитоз, аллергические реакции, восстановление, ремоделирование тканей Anti-inflammatory effect, activation of Th2-response, phagocytosis, allergic reactions, restoration, tissue remodeling
M2b	Иммунные комплексы, лиганды TLR, агонисты IL-1β Immune complexes, TLR ligands, IL-1 β agonists	CD86, CD206, HLA-DR, CD163 ^{low} , CD14 ^{medium}	TNF α , IL-1 β , IL-1ra, IL-6, IL-10 ^{high} , CCL1, IL-12 ^{low} , IL-10, SPHK1, LIGHT, IL-1	Иммунорегуляция, Th2-ответ, презентация антигенов Immunoregulation, Th2 response, presentation of antigens
M2c	IL-10, TGF-β, глюкокортикоиды IL-10, TGF- β , glucocorticoids	TLR1, TLR8, CD150, CD163 ^{high} , CD14 ^{medium} , CD206 ^{low-medium} , CD86 ^{medium} , MerTK ^{medium-high} , CD16	IL-10, TGF-β, CCL16, CCL18, CXCL13, компоненты ВКМ, CCL13 IL-10, TGF- β , CCL16, CCL18, CXCL13, components of ICM, CCL13	Фагоцитоз, иммуносупрессия, ремоделирование тканей, перестройка ВКМ Phagocytosis, immunosuppression, tissue remodeling, ICM restructuring
M2d	Лиганды TLR + агонисты рецептора аденозина TLR ligands + adenosine receptor agonists (A _{2A} R), IL-6, LIF	CD163, CD68, CD206, CD86 ^{low} , CD14 ^{high}	IL-10 ^{high} , VEGF, TGF- β , CCL5 (RANTES), CXCL10, CXCL16, IL-12 ^{low} , TNF α ^{low} , MMPs	Ангиогенез, опухолевая прогрессия, перестройка ВКМ Angiogenesis, tumor progression, ICM restructuring

своей способности секретировать как провоспалительные цитокины (IL-1 β , IL-6 и TNF α), так и регуляторный цитокин IL-10, участвуют в гуморальном иммунном ответе, презентации антигена и аллергических реакциях [3, 132]. Макрофаги M2c эффективно осуществляют фагоцитоз

апоптотических тел, ремоделирование тканей, на повышенном уровне секретируя TGF- β и IL-10, а также компоненты внеклеточного матрикса [133]. Наконец, макрофаги M2d — это Мф, ассоциированные с опухолью (tumor associated macrophages — TAM). Секреторными маркерами

этого подтипа являются повышенные количества IL-10, фактора роста эндотелия сосудов (VEGF), но низкие количества IL-12 [3], что обуславливает ангиогенез вблизи опухоли, метастазирование. Поляризованные ТМФ обладают иммуносупрессивными функциями, низкой антигенпрезентирующей способностью, продуцируют ММР и факторы роста, стимулирующих ангиогенез [44].

Таким образом, дифференцировка Мн в Мф зависит от сигналов клеток микроокружения. Фенотип и состояние активации зрелых популяций Мф определяются сигналами, встречающимися в процессе дифференцировки, которые включают факторы роста, РАР, опухолевые продукты, внеклеточный матрикс и другие. Воздействовать на клетки предшественников Мф можно *in vitro* с помощью определенных поляризационных стимулов и получать субпопуляции активированных Мф, воспроизводящих тот или иной фенотип для изучения межклеточных взаимодействий.

2. Методы и подходы к получению поляризованных макрофагов *in vitro*

Существует несколько методов получения Мф для исследования *in vitro*. Часто в таких моделях используют первичные мононуклеарные клетки периферической крови (РВМС) и клеточные линии Мн различной степени дифференцировки [23]. Для изучения поляризации Мф широко применяют модели *in vitro* с использованием клеточных линий, происходящих из раковых клеток [19]. С помощью таких моделей удастся изучать фенотипы, функции, сигнальные пути и воздействие различных веществ на клетки. Одной из таких моделей являются клетки линии ТНР-1, представляющие собой лейкоэмическую клеточную линию с моноцитарными характеристиками по экспрессии поверхностных рецепторов, секреторных продуктов, фагоцитозу; линия получена из крови мальчика, больного острым моноцитарным лейкозом в 1980 году Tsuchiya и соавт. [103]. Клетки линии ТНР-1 воспроизводят характеристики Мн, по многочисленным критериям, таким как морфология, секреторные продукты, экспрессия онкогенов, экспрессия мембранных антигенов и экспрессия генов участвующих в липидном обмене [10].

В условиях *in vitro* при добавлении поляризационных сигналов можно получить М1- и М2-макрофаги через интактные М0. Клетки линии ТНР-1 имеют свойство прикрепляться к культуральному пластику после добавления к культуре фобол-12-миристан-13-ацетата (РМА). Неоднократно было показано, что РМА является эффективным агентом дифференцировки для Мн [10, 23, 32], и его можно использовать в качестве надежной модели *in vitro*. Под действием РМА клетки экспрессируют маркеры Мф, такие как CD68, CD71, CD14 [34]. Макрофаги, полученные из клеток линии ТНР-1, сходны с Мф, про-

исходящими из моноцитов периферической крови [23]. Дифференцированные в модели с РМА Мф характеризуются увеличением цитоплазмы и цитоплазматических органелл (митохондрии и лизосомы), устойчивостью к апоптозу, чувствительностью к лигандам TLR2 и представляют собой аналог тканевых Мф *in vitro* [23]. У клеток РМА-индуцированных Мн активируются рецепторы адгезии, что позволяет им прилипать к культуральному пластику и приобретать характерную морфологию, представленную распластанной формой цитоплазмы, повышенной зернистостью и неправильной формой ядра [32].

Из РМА-индуцированных Мф можно получать классически и альтернативно активированные Мф. Поляризованные *in vitro* Мф могут использоваться в дальнейших исследованиях. Несомненно, что поляризация Мф является жестко контролируемым процессом, затрагивающим посттранскрипционные, эпигенетические и метаболические механизмы с вовлечением внутриклеточных сигнальных путей [2]. Что касается поляризационных стимулов, IFN γ и LPS широко используются для индукции поляризации макрофагов в М1-фенотип *in vitro*. IFN γ активирует путь JAK-STAT1 в Мф. LPS специфически активирует TLR4, который может влиять на активацию NF- κ B через адаптерные белки MyD88 либо TRIF, участвуя как в немедленной (первичной), так и в отсроченной (вторичной) активации экспрессии LPS-зависимых целевых генов. За счет IRF3-STAT1 пути LPS поддерживает активацию STAT1 в макрофагах М1 и секрецию провоспалительных цитокинов [83]. Таким образом, клетки, стимулированные LPS, накапливают сильный потенциал в качестве вторичного провоспалительного ответа. Повышенная активность STAT1 способствует поляризации М1 с образованием NO и секрецией провоспалительных цитокинов, таких как интерлейкины IL-1 β , IL-6, IL-12, IL-23 и TNF α . Кроме того, при стимуляции LPS в Мф активируются пути NF- κ B и MAPK [53].

Альтернативная активация макрофагов *in vitro* может быть достигнута как ответ на воздействие Th2-родственных цитокинов: IL-4, IL-10, IL-13, IL-33 и/или TGF- β [136], M-CSF. Как IL-4, так и IL-13 активируют путь JAK-STAT, приводя к активации STAT6, который приводит к экспрессии маркеров макрофагов М2 [136]. При стимуляции TGF- β пути PI3K/AKT, Smad2/3, NF- κ B и MAPK были активированы в макрофагах, полученных из ТНР-1 [128]. Было показано, что применение других цитокинов (IL-10, IL-6, IL-33) индуцирует JAK-STAT3-зависимые сигнальные пути [2, 27].

Еще одним подходом к получению *in vitro* М2-Мф является совместное культивирование Мн или интактных Мф с некоторыми культурами опухолевых клеток. Поляризация Мф в такой модели достигается воздействием на них растворимых

факторов, секретируемых опухолью. В результате Мф приобретают M2-подобный фенотип, характерный для TAM. Например, в исследовании Kamoshida и соавт. (2012) наблюдалась поляризация клеток Мн, культивируемых совместно с клеточными линиями A-172 (glioblastoma) и MKN-1 (human gastric adenocarcinoma cell line) в опухольассоциированные Мф. Моноциты, культивируемые в такой модели, становились распластанными и адгезивными, продуцировали MMP-9 [44].

В модели совместного культивирования M0-Мф с клетками трофобласта установлена индукция альтернативной M2-поляризации. Совместное культивирование клеток линии HTR-8/SVneo (клетки инвазивного трофобласта 1-го триместра) с M0-макрофагами, полученными из THP-1 значительно увеличивало экспрессию маркеров M2-поляризации CD206, IL-10, CCL18, TGF- β у последних [27]. Более того, была доказана ключевая роль растворимых факторов, прежде всего IL-6, секретируемого трофобластом, в приобретении Мф *in vitro* M2-фенотипа, что схоже с результатами исследований сокультивирования Мн с культурами раковых клеток [27].

Установлено, что после взаимодействия выделенных из периферической крови Мн и клеток линии Swan-71 (клетки трофобласта 7-й недели беременности) у первых происходила индукция регуляторного фенотипа CD14⁺CD16⁺CD39⁺, сопровождавшаяся увеличением синтеза IL-10, но не IL-12, а также снижением продукции IL-1 β и TNF α [36].

Индукция поляризации Мф под действием трофобласта показана также в модели как с THP-1-полученными Мф, так и с Мф, полученными из периферической крови. Исследователи продемонстрировали, что под действием растворимых факторов трофобласта первого триместра беременности Мн становятся адгезивными с выраженными псевдоподиями; подобно TAM они экспрессируют TGF- β , MMP-9, CD14, CD163. Однако, в отличие от TAM и периферических Мн, децидуальные Мф, образованные в присутствии трофобласта, не продуцируют VEGF и RANTES [7] (табл. 2).

В целом можно отметить, что макрофаги в условиях *in vitro* выглядят как прикрепившиеся клетки с типичной морфологией: выступающим ядром с плоско распростертой цитоплазмой и множественными псевдоподиями. При получении Мф *in vitro* индукция Мн с использованием LPS/IFN γ приводит к образованию M1-дифференцированных Мф с фенотипом CD64⁺CD80⁺, а при воздействии на Мн IL-4/IL-13 образуются M2-дифференцированные Мф с фенотипом CD11b⁺CD209⁺CD80⁻ [2]. Полученные таким образом Мф воспроизводят фенотип активированных Мф, которые могут присутство-

вать при различных патологических и физиологических процессах в организме, например Мф децидуальной оболочки при беременности.

3. Децидуальные макрофаги (dМф)

3.1. Происхождение и развитие dМф и их роль при беременности

Макрофаги являются второй по численности популяцией лейкоцитов, присутствующих в децидуальной оболочке, и при наступлении беременности этим клеткам необходимо осуществлять важные функции. С одной стороны, нужно противостоять инфекциям, оберегать от них полуаллогенный, но непрерывно развивающийся в течение 9 месяцев плод, а с другой — контролировать интенсивность воспалительных процессов, способных индуцировать преждевременное прерывание беременности [121]. В период беременности иммунные клетки эмбрионального и материнского организмов взаимодействуют, чтобы обеспечить адекватную защиту в случае инфекции и поддерживать оптимальную среду для развития плода [74].

В материнском организме Мн периферической крови рекрутируются в матку и формируют пул децидуальных Мф. Количество dМф может меняться на протяжении менструального цикла, их количество растет с момента имплантации эмбриона в эндометрий матки [39]. Полагают, что пул тканевых децидуальных Мф пополняется за счет миграции Мн из периферической крови. Стромальные клетки децидуальной оболочки и трофобласт активно синтезируют хемокины, привлекающие Мн в децидуальную оболочку, эндометрий и миометрий. Количество Мф увеличивается в секреторной фазе цикла и сохраняется на ранних сроках беременности [107]. Процесс миграции Мн в децидуальную оболочку матки находится под контролем нескольких факторов, а именно: MCP-1 (CCL2), MIP-1 α (CCL3), MIP-1 β , MCP-3 (CCL7), LCC-1 (CCL16), CXCL10, MIP-2 γ (CXCL14), RANTES (CCL5), M-CSF и fractalkine (CX3CL1) [4].

Децидуальные лейкоциты на протяжении всего гестационного процесса включают как M1-подобные, так и M2-подобные Мф. Однако соотношение между субпопуляциями активированных Мф не константно и меняется на протяжении беременности; это соотношение должно быть контролируемо, а дисбаланс между M1 и M2 может приводить к патологиям беременности [136]. Так, например, смещение баланса активированных Мф при беременности в сторону M1 обуславливает высокий уровень провоспалительных цитокинов и низкий уровень противовоспалительных цитокинов в плаценте при преэклампсии; кроме того, отмечено смещение в сторону CD68⁺ M1-макрофагов при самопроизвольных абортах или привычном невынашивании [3], преждевременных родах [46], задержке

ТАБЛИЦА 2. РАЗЛИЧИЯ В ПРОФИЛЕ ЦИТОКИНОВ МЕЖДУ ПЕРИФЕРИЧЕСКИМИ МН ПО СРАВНЕНИЮ С Мф, ПОЛЯРИЗОВАННЫМИ КЛЕТКАМИ ТРОФОБЛАСТОМ [7]

TABLE 2. DIFFERENCES IN CYTOKINE PROFILE BETWEEN PERIPHERAL MN COMPARED TO Мф, POLARIZED BY TROPHOBLAST CELLS [7]

Цитокины Cytokines	Продукция моноцитами в периферической крови Production of monocytes in peripheral blood	Продукция макрофагами, индуцированными трофобластом в децидуальной оболочке Production by macrophages induced by trophoblast in the decidual membrane
IL-1 β	низкая low	высокая high
IL-10	низкая low	высокая high
IL-8	низкая low	высокая high
IL-6	низкая low	высокая high
GRO α	низкая low	высокая high
CXCL10	низкая low	высокая high
G-CSF	низкая low	низкая low
VEGF	высокая high	отсутствует no
RANTES	высокая high	отсутствует no

роста плода [12], а также бесплодии, вызванном эндометриозом [18].

Пространственно-временное соотношение M1- и M2-активированных dMф меняется на протяжении беременности (рис. 1). Во время различных этапов беременности Мф претерпевают динамические изменения, преимущественно демонстрируя фенотип M1 или M2 [136]. В преимплантационном периоде поляризация Мф децидуальной оболочки смещена в сторону M1, индуцируя провоспалительные реакции и способствуя прикреплению эмбриона к децидуальной оболочке. Блостоциста в момент имплантации должна прорвать эпителиальную выстилку матки, после чего происходит инвазия в эндометрий с последующим замещением трофобластом эндотелия и гладких мышц кровеносных сосудов матери для обеспечения адекватного кровоснабжения [66]. Повышенный уровень провоспалительных цитокинов (IL-12, IL-6, IL-8, IFN γ , IL-1 β , TNF α), NO в матке характеризует раннюю имплантацию [25, 66, 136]. Далее, в период формирования плаценты по мере проникновения трофобласта в строму матки, когда децидуальная оболочка обогащается кровеносными сосудами и похожа на «открытую рану» [66], картина

поляризации dMф начинает представлять собой смешанную популяцию M1/M2. Поскольку M2-макрофаги способствуют ремоделированию тканей, dMф в этот период участвуют в инвазии трофобласта и ремоделировании спиральных артерий. Они инфильтрируют спиральные артерии, участвуют в ангиогенезе при имплантации и развитии плаценты за счет фагоцитарной активности, продукции MMP, фибронектина, PIGF, EGF, FGF4, ангиопоэтинов, при сохранении продукции провоспалительных цитокинов [1, 30]. Таким образом, dMф могут играть важную роль на самых ранних стадиях развития плаценты, в то же время предотвращая чрезмерную инвазию клеток трофобласта. В течение первого и до ранней фазы второго триместра dMф представляют собой смешанную популяцию M1/M2 или, возможно, смесь подтипов M2, что поддерживает толерантность и предотвращает отторжение эмбриона. На этом этапе dMф активно вырабатывают IL-10, VEGF, фагоцитируют апоптотические тела, осуществляют регуляторные функции в отношении клеток микроокружения. После завершения развития плаценты продукция прогестерона способствует смещению в сторону преимущественно противовоспалительной среды. В этот период в

матке устанавливается поддерживающая преобладающими M2-Мф среда, благодаря повышенной продукции противовоспалительных цитокинов IL-10 и TGF- β , что предотвращает отторжение плода и обеспечивает его развитие вплоть до родов (рис. 1) [16, 136].

Макрофаги M1 вновь становятся преобладающей субпопуляцией в период родов [42, 131]. Физиологические роды – это контролируемый воспалительный процесс, характеризующийся повышенной продукцией IL-1 β , IL-6, TNF α , IFN γ и IL-8, а также миграцией лейкоцитов в шейку матки, плодные оболочки, децидуальную оболочку и миометрий [16], содержание ранее преобладавших IL-10 и TGF- β снижается (рис. 1). M1-макрофаги начинают проникать в децидуальную оболочку за несколько дней перед родами, что, как и в первом триместре, совпадает с увеличением выработки хемокинов CCL2 (MCP-1), CCL4 (MIP-1 β), CCL5, CXCL8 (IL-8) и CXCL10. Привлеченные макрофаги M1 способствуют сокращению матки, инициации родов, отхождению плаценты и инволюции матки [136].

Таким образом, макрофаги M1 являются преобладающим типом как во время имплантации и ранней беременности, так и во время физиологических родов. Макрофаги M2 главенствуют в течение второго и начале третьего триметра и, соответственно, способствуют поддержанию противовоспалительной среды в децидуальной оболочке и сохранению беременности. Каждая

из субпопуляций dMф важна в течение беременности, так как их функциональные особенности поддерживают маточно-плацентарный гомеостаз.

3.2. Факторы, влияющие на Мф эндометрия при беременности и их особенности

Децидуализация эндометрия матки контролируется эндокринными сигналами. Стероидные гормоны регулируют количество и фенотип иммунных клеток матки, влияя на локальный синтез цитокинов и хемокинов [107]. Гормональные сигналы, следовательно, важны с точки зрения развития и поддержания подходящей среды для развивающегося плода, формирования толерантности матери к полуаллогенному плоду. Физиологическая беременность требует строгой временной регуляции функций материнской иммунной и эндокринной систем для подготовки к имплантации и развитию полуаллогенного плода [79]. Эстрадиол, прогестерон и хорионический гонадотропин человека (ХГЧ) являются тремя основными гормонами во время беременности. Последний, секретируемый синцитиотрофобластом плаценты, вызывает выработку прогестерона желтым телом. Прогестерон секретируется желтым телом во время секреторной стадии менструального цикла и на раннем сроке беременности, а затем главным источником прогестерона становится плацента [136]. Установлено, что прогестерон может опосредованно влиять на увеличение притока Мф и естественных киллеров

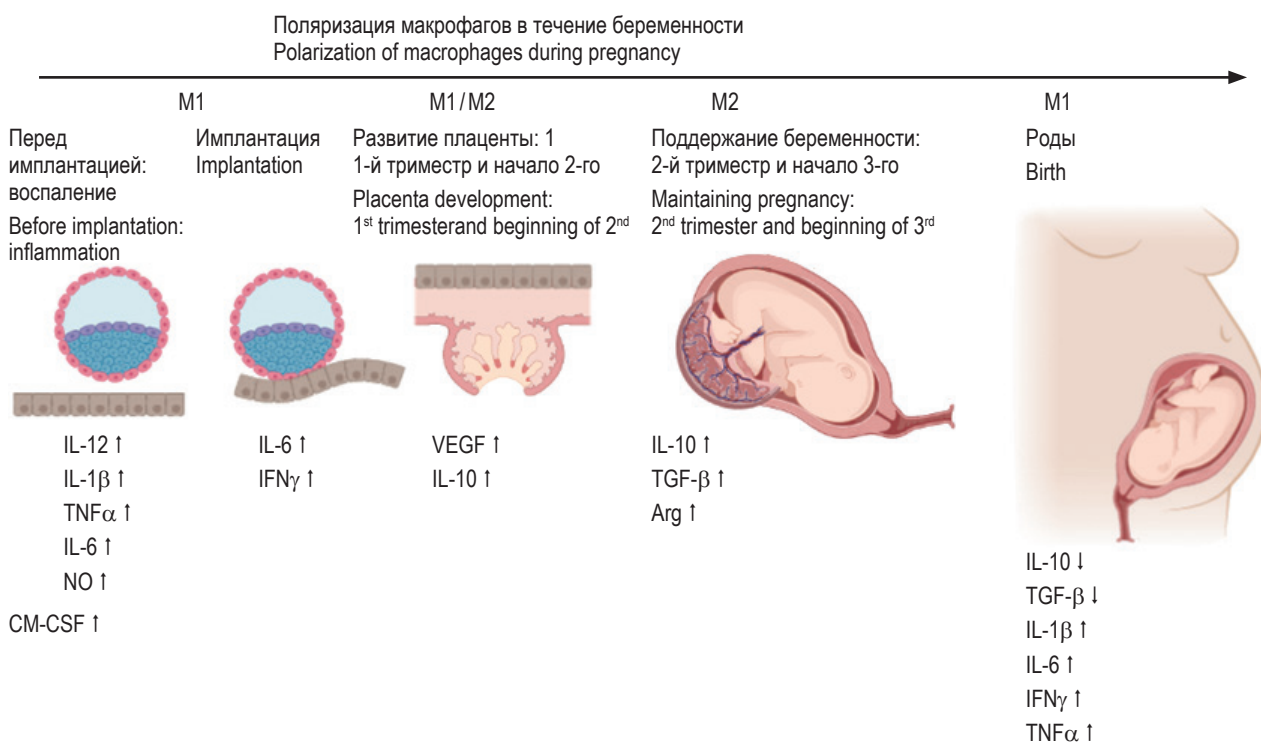


Рисунок 1. Динамика поляризации M1/M2 Мф на протяжении беременности. Модифицировано из [136]

Figure 1. Dynamics of M1/M2 Мф polarization during pregnancy. Modified from [136]

(NK-клеток) в место имплантации, модулирует иммунный ответ матери, чтобы предотвратить отторжение эмбриона [24]. Кроме того, имеются сведения, что добавление дигидрогестерона или прогестерона к культуре мононуклеаров периферической крови приводило к значительному снижению продукции цитокинов $IFN\gamma$ и $TNF\alpha$ [86], поддерживая противовоспалительный профиль. Эстрогены — еще одна группа гормонов, регулирующих физиологическую деятельность женской репродуктивной системы. Макрофаги, дендритные клетки экспрессируют рецепторы к эстрогену ($ER\alpha$ и $ER\beta$), что свидетельствует о прямом действии этого гормона на фенотип и функции иммунных клеток [108, 136]. Эстроген, прогестерон, глюкокортикоидные гормоны могут ингибировать секрецию NF- κ B-индуцирующих провоспалительных цитокинов и активность Cox-2 [88]. В дополнение к этому установлено, что эстрогены участвуют в качестве положительного регулятора альтернативной M2-поляризации, но доподлинно неизвестно, характерно ли это для децидуальной оболочки [108].

На протяжении беременности в течение длительного времени Мф воспроизводят M2-подобный и, вместе с тем, особый функциональный фенотип ($CD14^{high}CD163^{high}CD206^{high}CD209^{high}IL-10^{high}TNF\alpha^{low}$), секретируют IL-1 β , IL-8, IL-6, CXCL-10, GRO α , IDO [100], G-CSF и CCL4 [92, 132]. Благодаря CD206, CD209 и CD163 dMф способны распознавать потенциально опасны патогены, а благодаря высокому уровню продукции IL-10, GRO α и IDO они стимулируют пролиферацию и подавляют апоптоз клеток трофобласта [39]. Более того, исследователями была отмечена роль секретируемого макрофагами G-CSF в поддержании инвазии, миграции трофобласта посредством активации пути PI3K/Akt/Erk1/2, что поддерживает развивающуюся беременность [28]. Кроме того, IL-10, продуцируемый dMф, способствует созданию иммуносупрессивной среды [78]. В дополнение, колониестимулирующий фактор макрофагов (M-CSF) и IL-10 рассматриваются как весомаые индукторы экспрессии маркеров M2, таких как CD14, CD163, CD206 и CD209, на dMф [92]. Подобно TAM, которые способствуют росту и развитию опухоли, dMф способствуют росту и развитию плаценты [29].

Таким образом, dMф в большинстве своем представляют M2-подобный, но особенный функциональный фенотип. Взаимодействуя с окружающими клетками децидуальной оболочки, они играют важную роль в поддержании микроокружения, способствующего иммунологической толерантности в системе мать-плод [84].

3.3. Взаимодействие dMф и трофобласта

Имплантации и физиологическое течение беременности сопровождается контролируемым

состоянием иммунной системы с преобладанием Th2/Th17-типа иммунного ответа [111]. В такой среде, где децидуальные Мф контролируют воспалительные процессы, плод развивается физиологически даже в присутствии цитотоксических Т-лимфоцитов и естественных киллеров, привлекаемых в плаценту и выделяющих немалый спектр различных цитокинов [35, 78, 127].

Клетки трофобласта продуцируют хемокины и цитокины, стимулируя как привлечение Мн в децидуальную оболочку, так и активацию Мф и приобретение ими M2 фенотипа, поддерживающего иммунологическую толерантность. Это происходит путем секреции трофобластом IL-6 и активации в макрофагах M0 сигнального пути IL-6/JAK-STAT3, а поляризованные M2-подобные dMф, у которых повышается секреция CCL18, IL-10, TGF- β , в свою очередь в режиме обратной связи стимулируют процессы инвазии и миграции трофобласта (рис. 2) [27].

Кроме того, на ранних сроках беременности (7-9-я неделя) клетки трофобласта продуцируют большое количество хемокина CXCL16, что играет важную роль в привлечении Мф и индукции M2 поляризации Мф [114]; CXCL16 также аутокринно стимулирует пролиферацию и инвазию трофобласта в первом триместре [134]. Дополнительные факторы, присутствующие в децидуальной оболочке, которые влияют на поляризацию привлекаемых в нее Мф, также способствуют иммунологической толерантности [27]. Например, продуцируемые трофобластом факторы, такие как VEGF, TGF- β , растворимый HLA-G5, растворимый PD-L1 [135], направляют поляризацию Мф в сторону M2-подобного фенотипа с более высокой фагоцитарной активностью и повышенной экспрессией IDO, что подавляет экспрессию $IFN\gamma$ в Т-клетках и способствует инвазии и миграции трофобласта [115]. Сообщалось, что клетки трофобласта увеличивают также и миграцию Мн, индуцируют значительное увеличение секреции провоспалительных цитокинов и хемокинов IL-1 β , IL-8, IL-6, GRO α , CXCL10 [7, 66].

Клетки трофобласта таким образом могут регулировать иммунное микроокружение в децидуальной оболочке и способствовать дифференцировке клеток иммунной системы в фенотип, оказывающий благотворное влияние на развитие трофобласта. В этом взаимодействии можно выделить три важных процесса: 1) привлечение: клетки трофобласта выделяют хемокины, привлекают Мн в децидуальную оболочку; 2) обучение: клетки трофобласта продуцируют регуляторные цитокины, которые модулируют процесс поляризации децидуальных клеток; и 3) ответ: Мф, поляризованные («обученные») клетками трофобласта, обеспечивают как его развитие и функционирование, так и апоптоз, обеспечивая защиту

от чрезмерной инвазии [68]. Таким образом, свой уникальный функциональный фенотип децидуальные Мф приобретают путем взаимодействия с клетками трофобласта, который поддерживает их M2-подобную поляризацию. Приобретая такой фенотип, децидуальные Мф, помимо экспрессии генов цитокинов, характерных для M2, также выделяют провоспалительные цитокины. Децидуальные Мф, активируемые цитокинами и другими факторами, вырабатываемыми стромальными клетками матки, естественными киллерами и трофобластом, окружают спиральные артерии децидуальной оболочки и выделяют широкий спектр цитокинов, включая IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-13 и TNF α , которые приводят к поддержанию воспалительной реакции и стимуляции активации NK-клеток [99]. Важной функцией dМф является секреция матриксных протеиназ, что обуславливает перестройку внеклеточного матрикса и фагоцитоз апоптотических тел при формировании гладкомышечных сосудов (vascular smooth muscle cells – VSMC) и трофобласта [96]. Хотя сообщалось, что дифференцированные из M0 Мф в присутствии трофобласта Мф напрямую не влияют на миграцию и апоптоз VSMC, перестройка внеклеточного матрикса облегчает процесс формирования спиральных артерий, а фагоцитоз апоптотических тел уменьшает высвобождение ассоциированных с повреждениями молекулярных паттернов (DAMP), что наряду с секрецией IL-10 сдержи-

вает чрезмерную воспалительную реакцию, которая может нарушать процесс ремоделирования сосудов [96]. Формирующийся под влиянием трофобласта фенотип децидуальных Мф поддерживает иммунологическую толерантность к плоду, участвует в рекрутировании и модулировании функций других клеток децидуальной оболочки.

Таким образом, успешная беременность определяется иммунно-эндокринными взаимодействиями, происходящими в децидуальной оболочке. Временной и пространственный баланс между привлекаемыми в децидуальную оболочку активированными Мф и их кооперация с окружающими клетками способствуют в организме матери успешной имплантации, развитию плаценты, прогрессированию роста плода, родам в срок. Эстроген, прогестерон, хемокины и другие факторы, выделяемые трофобластом и децидуальными стромальными клетками (ДСК), могут способствовать экспрессии IDO, CD206, IL-10 и других маркеров dМф, поддерживая их M2-подобную поляризацию [39, 102]. Это в свою очередь способствует иммунной толерантности матери к плоду, выживанию трофобласта, поддержанию физиологической беременности вплоть до родов. Клетки моноцитарно-макрофагальной системы и клетки трофобласта вступают в тесное взаимодействие и с другими иммунными клетками матки – в частности с Т-клетками и NK-клетками. Существует тесный пространственный контакт и связь между клетками тро-

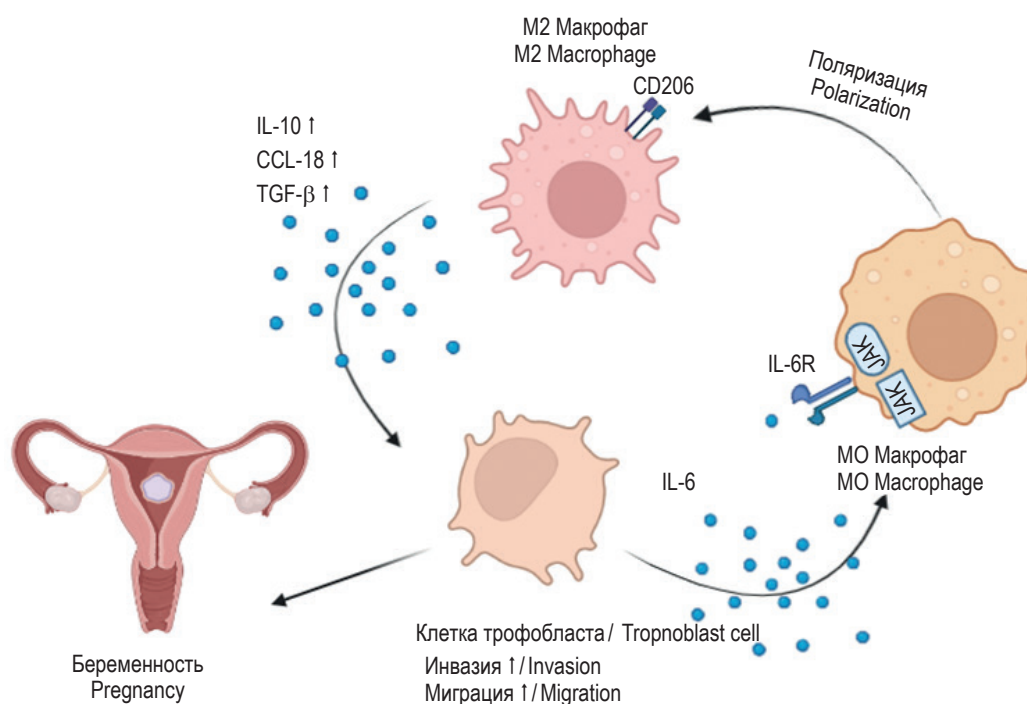


Рисунок 2. Схематическое изображение взаимодействия между трофобластом и Мф в децидуальной оболочке. Модифицировано из [27]

Figure 2. Schematic representation of the interaction between the trophoblast and Mφ in the decidual shell. Modified from [27]

фобласта, децидуальными Мф и децидуальными НК, сгруппированными вокруг спиральных артерий [43]. Спектр молекулярных взаимодействий между этими типами клеток, несомненно, влияет на течение беременности.

4. Взаимодействия между макрофагами и естественными киллерами

4.1. Контактный и дистантный уровень взаимодействий Мф и НК-клеток

Естественные киллеры представляют собой лимфоидные клетки врожденного иммунитета, которые участвуют иммунном ответе против вирус-инфицированных, опухолевых клеток. Они могут проявлять цитотоксичность, действуя на зараженные или опухолевые клетки за счет секреции гранул, содержащих литические ферменты или факторы индукции апоптоза. Активированные НК-клетки уничтожают клетку-мишень, высвобождая цитотоксические гранулы (такие как перфорин и гранзим В) и провоспалительные цитокины (IFN γ , TNF α и другие) [87]. Функционирование НК-клеток регулируется как активирующими, так и ингибирующими рецепторами, воспринимающими различные медиаторы иммунного ответа в организме. Активация НК-клеток опосредуется взаимодействием рецепторов активации на поверхности НК-клеток с их лигандами на клетках-мишенях. В свою очередь, взаимодействие ингибирующего рецептора со своим лигандом снижает цитотоксическую активность НК-клеток. Естественные киллеры могут продуцировать IFN γ в ответ на стимуляцию определенными комбинациями цитокинов [82], существующих в клеточном микроокружении. Антигенпрезентирующие клетки, включая Мф, могут регулировать функциональные ответы НК-клеток посредством мембраносвязанных молекул и секреции растворимых медиаторов [119]. Для созревания НК-клеток требуются воздействие различных факторов, таких как IL-15, а цитокины IL-12 или IL-18 требуются для достижения достаточной эффекторной функции НК-клеток [110]. Эти факторы продуцируются Мф или дендритными клетками, что подчеркивает тесные регуляторные взаимодействия между НК-клетками и миелоидными клетками. Макрофаги М1 играют роль в инициации цитотоксической активности НК-клеток и стимуляции секреции ими IFN γ несколькими путями — при действии растворимых медиаторов и при межклеточном контакте (рис. 3).

Выделяют несколько типов взаимодействий М1 и НК-клеток [60]. Во-первых, поляризация М1 сопровождается экспрессией CD48 на Мф. Связывание CD48 с 2B4 на НК-клетках при воспалительных заболеваниях запускает продукцию IFN γ НК-клетками (контактное взаимодействие, рис. 3). Во-вторых, секреция макрофагами М1 IFN β индуцирует продукцию IL-15 в НК-клетках

в составе мембраносвязанного комплекса IL-15/IL-15R α . Этот комплекс по аутокринному механизму действует на рецепторный комплекс IL-15R β /IL-15R γ НК-клеток, что усиливает ими секрецию IFN γ (рис. 3). В-третьих, цитокины М1 макрофагов, такие как IL-1 β , IFN β или IL-23 (а также IL-12, IL-18, TNF α), индуцируют усиление экспрессии цитотоксических рецепторов NKp44 и NKG2D, что, в свою очередь, может увеличивать цитотоксичность НК-клеток в отношении клеток-мишеней — опухолей (рис. 3). В-четвертых, мембраносвязанный комплекс IL-15/IL-15R α , экспрессируемый М1, по механизму транс-презентации действует на рецепторный комплекс IL-15R β /IL-15R γ окружающих НК-клеток. Это контактное межклеточное взаимодействие индуцирует активацию НК-клеток и усиливает цитотоксическую функцию в отношении мишеней (рис. 3).

Таким образом, провоспалительные сигналы IL-12, IL-18, IL-15, IFN β клеток миелоидного ряда М1 непосредственно могут влиять на усиление цитотоксичности, литической активности, пролиферацию НК-клеток. В дополнение к этим цитокинам также отмечено, что IL-27, продуцируемый М1, может напрямую запускать секрецию IFN γ посредством активации STAT1 и способствовать активации НК-клеток благодаря экспрессии CD25 и CD69 [8, 137].

Влиянию растворимых медиаторов подвержена также группа рецепторов естественной цитотоксичности НК-клеток, а именно NKp30, NKp44 и NKp46. Рецепторы NKp46 и NKp30 экспрессируются и на активированных НК-клетках, и на неактивированных, в то время как NKp44 — только на активированных. Примечательно, что IL-27, являющийся членом семейства IL-12, способствует усилению экспрессии NKp46 и последующей NKp46-зависимой цитотоксичности, опосредованной НК-клетками против клеток-мишеней [137]. Комбинация цитокинов IL-15/IL-18/IL-27 повышает экспрессию НК-клетками рецепторов NKp30 и NKp44 [20]. Таким образом, в условиях провоспалительной стимуляции рецепторы естественной цитотоксичности могут опосредовать литическую активность НК-клеток.

Еще одним звеном взаимодействия лимфоидных НК и Мф является активирующий рецептор NKG2D. Цитокины IL-2, IL-12 и IL-15, усиливают экспрессию НК-клетками рецептора NKG2D [98]. Макрофаги при активации через TLR начинают экспрессировать лиганды NKG2D: при стимуляции LPS — MICA, при инфицировании вирусами — MICB, а НК-клетки, находящиеся в контакте с TLR-активированными Мф, экспрессируют повышенные уровни NKG2D [61]. Активация NKG2D ведет к секреции IFN γ НК-клетками. Отмечено также, что в присутствии

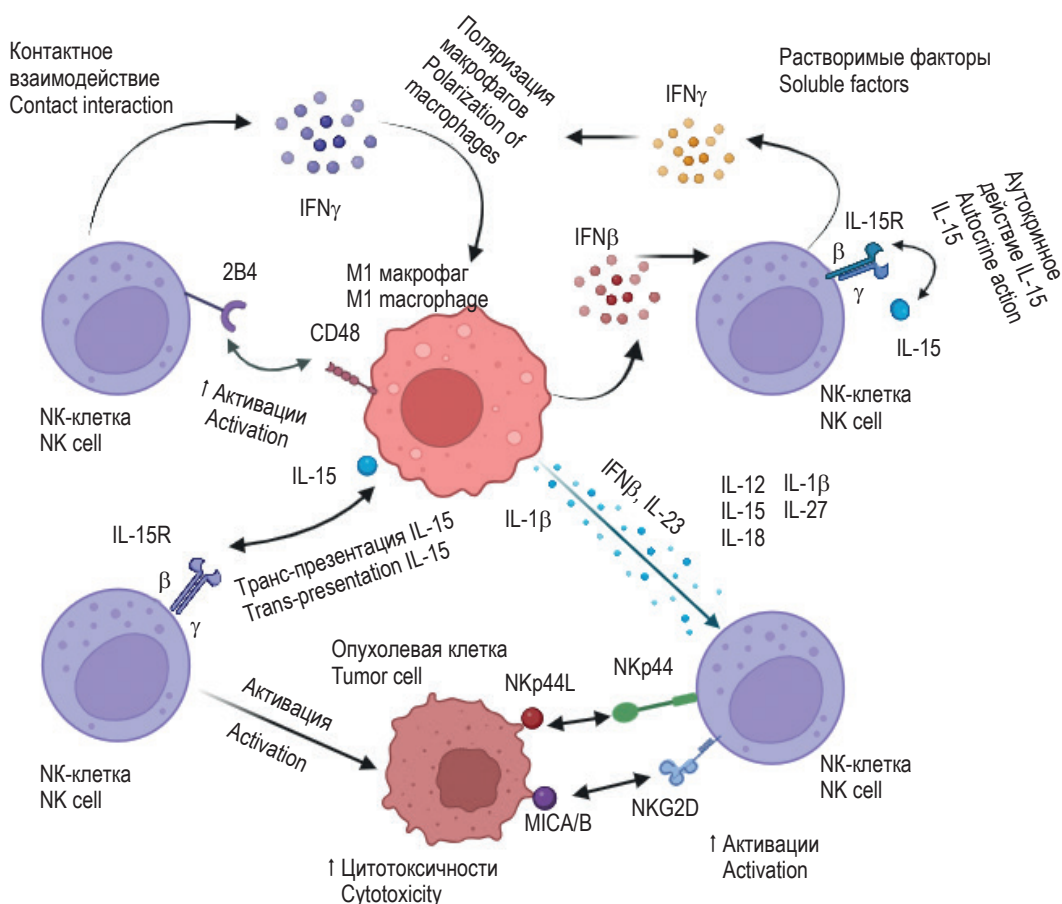


Рисунок 3. Взаимодействия между NK-клетками и макрофагами M1. Модифицировано из [60]

Figure 3. Interactions between NK cells and M1 macrophages. Modified from [60]

катаболитов IDO, выделяемой в том числе TAM и dMφ, у NK-клеток снижается экспрессия рецепторов NKp46 и NKG2D, что означает выключение распознавания лигандов на поверхности опухолевых клеток через эти рецепторы [77].

Таким образом, взаимодействие NK-клеток с классически активированными макрофагами M1 при инфекции имеют большое значение для продукции IFNγ в NK-клетках, а IFNγ, в свою очередь, затем облегчает активацию Mφ. Это взаимодействие являет собой петлю положительной обратной связи, которая усиливает TLR-индуцированную активацию NK-клеток [71], так как активированные NK-клетки, в свою очередь, действуют на антимикробные функции Mφ, продуцируя IFNγ и TNFα. Хотя эти петли положительной обратной связи между NK-клетками и Mφ способствуют защите от патогенов, избыточная продукция провоспалительных цитокинов может вызывать системное воспаление *in vivo* [71].

С другой стороны, клетки моноцитарно/макрофагального ряда могут снижать активность NK-клеток. В частности, в микроокружении опухоли Mφ обладают репертуаром иммуносупрессивных молекул. Ассоциированные с опухолью

Mφ, как было отмечено выше, проявляют свойства, сходные со свойствами M2-поляризованных Mφ в отношении секреции цитокинов, экспрессии рецепторов и ремоделирования тканей, ангиогенеза и опухолевой прогрессии. Опосредованное макрофагами TAM подавление NK-клеток может быть опосредовано TGF-β, который ингибирует экспрессию NKp30 и NKG2D [109]. Установлено, что экспрессия IFNγ и TNFα в NK-клетках, сокультивированных с TAM, была значительно ниже, чем в NK-клетках, которые культивируются с Mφ/Mφ из неопухолевых тканей; кроме того, TAM значительно подавляли пролиферацию NK-клеток. В модели совместного культивирования установлено, что NK-клетки, сокультивируемые с M2-макрофагами, проявляли более низкую дегрануляционную и цитотоксическую активность, чем NK-клетки, сокультивируемые с M1 [72]. В другом исследовании также показано, что после контактного взаимодействия NK-клеток с TAM NK-клетки изменяли фенотип в сторону CD27^{low}CD11b^{high}, что демонстрирует их сниженную активацию [49]. В целом исследования показывают, что опухолевые Mφ снижают эффекторные функции NK-клеток [81].

Что касается децидуальной оболочки, то иммунные клетки привлекаются в нее в немалом количестве при беременности и взаимодействуют друг с другом, определяют молекулярную среду, влияют на трофобласт. Взаимодействие между NK-клетками и антигенпрезентирующими клетками (АПК), прежде всего Мф, играет ключевую роль в установлении адаптивного иммунитета на границе взаимодействия матери и плода. В секреторной фазе менструального цикла активация большого количества хемокинов привлекает NK-клетки и клетки моноцитарно-макрофагальной системы в децидуальную оболочку и место имплантации. NK-клетки составляют преобладающую популяцию в децидуальной оболочке (65-70%), следом выделяются dМф (20-30%). В меньшем количестве представлены Т-клетки и дендритные клетки (2-4%). Макрофаги M1/M2 могут влиять на NK-клетки децидуальной оболочки. Исследования показывают, что на протяжении беременности dМф, которые экспрессировали CD14 и CD206, в большом количестве присутствуют в децидуальной оболочке и могут ингибировать цитотоксичность естественных киллеров [21]. Децидуальные NK-клетки человека (dNK) демонстрируют уникальный фенотип с высоким уровнем экспрессии CD56, и в то же время отсутствием экспрессии CD16. Хотя dNK экспрессируют некоторые активирующие рецепторы и имеют цитолитический механизм, они проявляют слабую цитотоксичность [114]. Эта особенность, по-видимому, опосредуется в том числе присутствующими в децидуальной оболочке макрофагами. Хемокин CXCL16, секретируемый клетками трофобласта, индуцирует поляризацию макрофагов в направлении фенотипа M2. В свою очередь M2 dМф, поляризованные CXCL16, ослабляют цитотоксичность NK-клеток, уменьшая секрецию IL-15, что способствует формированию иммунной толерантности [114]. Примечательно также, что IL-15, способен вызывать созревание незрелых NK-клеток, присутствующих в эндометрии и децидуальной оболочке. Установлено, что IL-15 индуцирует экспрессию группы рецепторов KIR на предшественниках NK-клеток, когда они дифференцируются в зрелые NK-клетки в условиях *in vitro*. В условиях *in vivo* микроокружение матки влияет на репертуар рецепторов NK-клеток [59]. Ингибирующие рецепторы KIR включают KIR2DL1, KIR2DL2, KIR2DL3, KIR2DL5 и KIR3DL1, KIR3DL2, KIR3DL3 и связываются с пептидсвязывающей областью молекул HLA, способствуют толерантности NK-клеток к собственным тканям [80]. Необычный репертуар KIR характеризует dNK, которые склонны к распознаванию HLA-C трофобласта [59]. Рецептор NKG2A/CD94 представляет собой еще один ингибирующий рецептор NK-клеток. Этот рецептор специфически

распознает неклассические молекулы MHC на клетках-мишенях, а именно HLA-E и защищает организм от чрезмерной активации NK-клеток. В децидуальной оболочке присутствует несколько цитокинов, которые могут модулировать экспрессию NKG2A и влиять на функцию NK-клеток [80], включая IL-21, IL-15, IL-12, IL-10 и TGF- β [112]. Экспрессия NKG2A в основном наблюдается на CD56^{bright} NK-клетках и снижается при постепенном созревании NK-клеток [112].

Большинство NK-клеток децидуальной оболочки имеют фенотип CD56^{bright}CD16⁻KIR⁺CD9⁺CD49a⁺NKG2A⁺, таким образом, они фенотипически отличаются от подмножеств CD56^{bright} и CD56^{dim}, циркулирующих в периферической крови NK-клеток CD56^{dim}CD16⁺CD160⁺. Они демонстрируют более низкую цитотоксичность и более высокую секрецию цитокинов, хемокинов и ангиогенных факторов (рис. 4) [55, 123]. Отмечены такие особенности dNK, как сниженная способность к дегрануляции, снижение функционирования активирующих рецепторов NKp30, NKp44, NKp80, NKG2D [22, 85].

В настоящее время нет единого мнения о путях появления dNK. Полагают, что пул dNK пополняется из периферической крови или пролиферирует и дифференцируется *in situ* из предшественников. Так или иначе, любой из путей пополнения пула dNK связан с дифференцировкой в условиях микроокружения, которое создает трофобласт и dМф. Дифференцировка и развитие NK-клеток регулируется несколькими цитокинами (рис. 4), сопровождается изменением фенотипа и функциональной активности [63, 120].

Последовательная экспрессия рецепторов для различных цитокинов подразумевает функциональное созревание NK-клеток [120]. Для пролиферации и дифференцировки гемопоэтической стволовой клетки требуются FL, KL, IL-3 и IL-7. Приобретение экспрессии CD122 свидетельствует о созревании NK-клеток. IL-15 необходим для дифференцировки NK-клеток от общего лимфоидного предшественника до зрелых NK-клеток [120]. Присутствие IL-15 не только повышает цитотоксичность NK-клеток и индуцирует их пролиферацию, но и защищает NK-клетки от апоптоза [41]. Функциональный фенотип зрелых NK-клеток формируется под воздействием цитокинов микроокружения тканей, в которых они находятся [80]. В периферической крови или селезенке обилие стимулирующих цитокинов, таких как IL-2, IL-12, IL-15, IL-18 и IL-21, может поддерживать NK-клетки в цитотоксическом состоянии для борьбы с инфекциями. Толерогенные NK-клетки и регуляторные NK-клетки матки образуются под действием TGF- β и IL-10 или TGF- β и IL-15 соответственно (рис. 4) [120]. Цитокины TGF- β и IL-10, активно выделяемые M2-

dMφ в матке, поддерживают фенотип NK-клеток со сниженной цитотоксической функцией [78].

Уникальной особенностью децидуальных NK-клеток является то, что во время беременности они подвергаются воздействию как материнских, так и отцовских молекул HLA на клетках трофобласта [93]. Децидуальные Mφ и NK-клетки в синергии способствуют ремоделированию сосудов плаценты, развитию беременности [84]. Однако большое количество воспалительных цитокинов, таких как IFN γ и TNF α , может повреждать плаценту и развивающийся плод либо непосредственно вызывая апоптоз клеток трофобласта [67], либо путем активации цитотоксических клеток, включая dNK-клетки или Т-клетки [89]. Следовательно, взаимодействие NK-клеток и Mφ, присутствующих в децидуальной оболочке, и высвобождение цитокинов TNF α , IFN γ , индукция экспрессии цитотоксических рецепторов являются потенциальными участниками цитокин-индуцированного патогенеза осложнений беременности, которые могут снижаться противовоспалительным эффектом TGF- β или IL-10 [94]. С другой стороны, значительное снижение активности NK-клеток с нарушением про-

дукции TNF α и IFN γ может угрожать чрезмерной инвазией клеток трофобласта и последующими осложнениями этого процесса. Влияние Mφ на NK-клетки проявляется в изменении экспрессии последними транскрипционных факторов, определяющих не только их дифференцировку, но и функциональную активность.

4.2. Влияние Mφ на экспрессию транскрипционных факторов NK-клетками.

Факторы транскрипции (TF) модулируют гены, участвующие в специфических для того или иного клеточного типа свойствах, метаболических особенностях, функциях. NK-клетки претерпевают по пути своего развития несколько стадий, и известно, что на каждой из стадий играют роль определенные TF, ответственные за регуляцию экспрессии тех или иных важных генов. Важно отметить влияние цитокинового микроокружения на эти факторы, ведь именно межклеточные сигналы участвуют в регуляции на разных стадиях созревания клеток, влияя на активацию транскрипционных факторов. Конкретный функционально-фенотипический вклад каждого фактора определяется пространственно-временным контролем их проявления [62, 63].

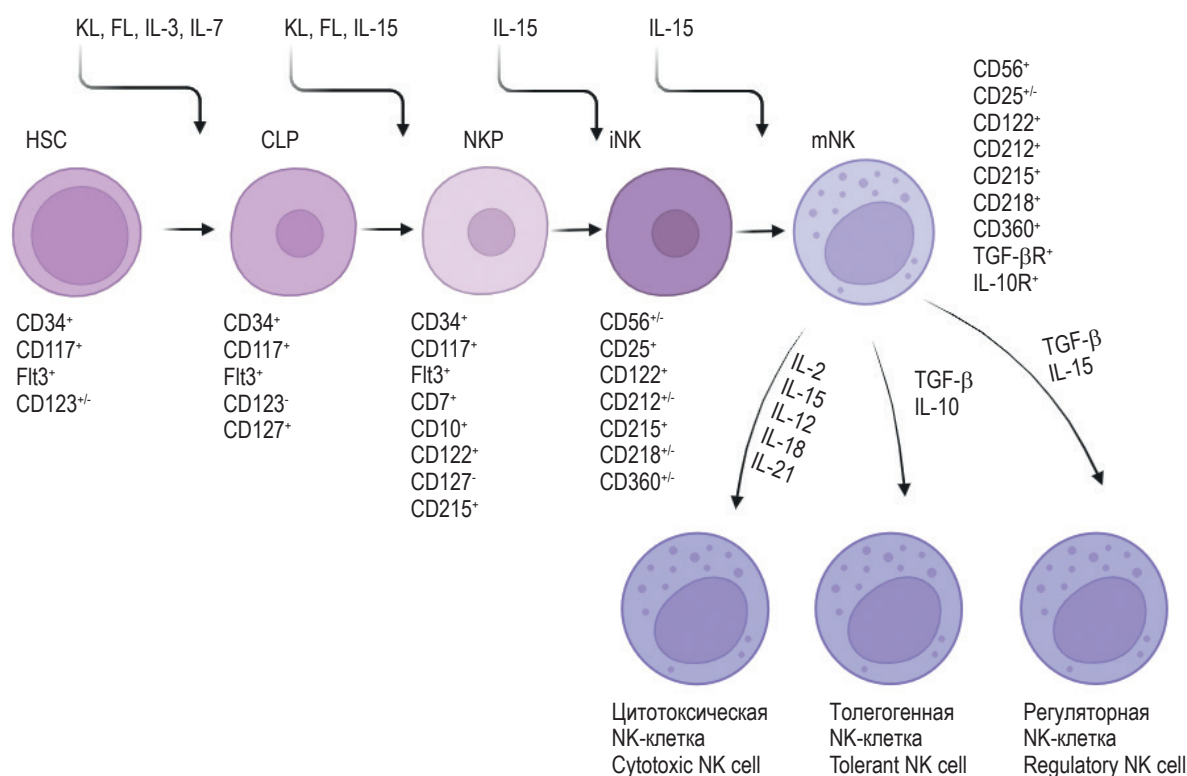


Рисунок 4. Дифференцировка и развитие NK-клеток

Примечание. Сокращения: HSC – гемопоэтическая стволовая клетка, KL – kit ligand; FL – fms-like tyrosine kinase 3 ligand; CLP – общий лимфоидный предшественник; NKP – natural killer progenitor – пре-NK-клетка; iNK – immature NK cell – незрелая NK-клетка; mNK – mature NK cell – зрелая NK-клетка. Модифицировано из [120].

Figure 4. Differentiation and development of NK cells

Note. Abbreviations: HSC, hematopoietic stem cell; KL, kit ligand; FL, fms-like tyrosine kinase 3 ligand; CLP, common lymphoid precursor; NKP, natural killer progenitor, pre-NK cell; iNK, immature NK cell; mNK, mature NK cell. Modified from [120].

Развитие и созревание НК-клеток управляется сетью TF, включая родственные факторы T-bet и Eomes. Они обладают схожими свойствами связывания ДНК из-за их высоко гомологичных ДНК-связывающих доменов T-box, которые в большой степени идентичны [129]. В незрелых НК-клетках доминирующей является экспрессия транскрипционного фактора Eomes. Ранняя индукция этого фактора связана с эпигенетическими изменениями в характерных локусах генов, таких как *prf1* (перфорин), *gzmA* (гранзима) [130], выживанием, пролиферацией, дифференцировкой НК-клеток [38]. T-bet является центральным фактором транскрипции для зрелых НК-клеток, ответственным за стадии терминальной дифференцировки, но не участвует в раннем развитии. Регулирует спектр процессов, включая развитие, созревание и функционирование НК-клеток, а именно поддержание их эффекторных функций: T-bet необходим и для устойчивой продукции $\text{IFN}\gamma$ НК-клетками, и для высвобождения гранул с цитотоксическими молекулами [38]. Фактор T-bet определяет чувствительность НК-клеток к IL-12, IL-21, их цитотоксичность, замедление клеточного цикла и жизнеспособность [101, 130]. Важным индуктором T-bet является IL-12. Этот цитокин независимо от $\text{IFN}\gamma$ индуцирует

экспрессию T-bet посредством активации JAK-STAT4 [82]. $\text{IFN}\gamma$ связывается со своим рецептором $\text{IFN}\gamma\text{R}$ и регулирует экспрессию T-bet через путь JAK-STAT1 [82].

Таким образом, в ответ на инфекции и стимуляцию TLR макрофагов выделяемый ими IL-12 влияет на НК-клетки и в основном индуцирует активацию STAT4. STAT4 транслируется в ядро и способствует транскрипции гена $\text{IFN}\gamma$ при участии T-bet [37]. Более того, было показано, что стимуляция комбинациями цитокинов IL-12+IL-15 или IL-12+IL-18, $\text{IFN}\beta$ вызывает активацию T-bet и Eomes, что ведет к стабильной продукции $\text{IFN}\gamma$. В дополнение к этому показано, что синергетические взаимодействия между цитокинами IL-15, IL-18 и IL-27 усиливают цитотоксичность $\text{CD3}^+\text{CD56}^+$ НК-клеток путем накопления гранул перфорина и также поддерживают экспрессию $\text{IFN}\gamma$ [20]. TGF- β , напротив, подавляет экспрессию T-bet и Eomes в НК-клетках [130]. Таким образом, Eomes и T-bet регулируют эффекторные функции НК-клеток, совместно контролируя продукцию $\text{IFN}\gamma$ в НК-клетках, в то время как T-bet, по-видимому, является решающим регулятором их цитотоксической активности во время преобразования в зрелые НК-клетки. Тем не менее в НК-клетках челове-

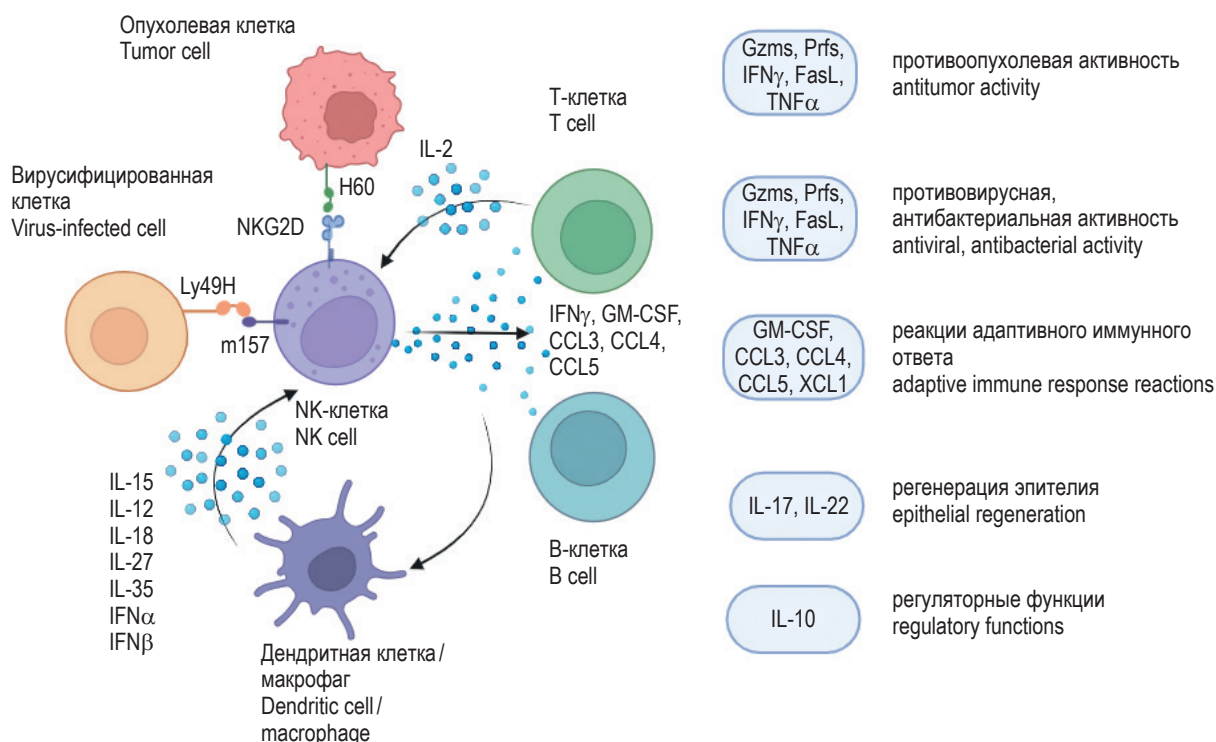


Рисунок 5. Краткая иллюстрация взаимодействий между НК-клетками и миелоидными клетками

Примечание. Gzrms – гранзимы, Prfs – перфорины, XCL1 – хемокиновый лиганд 1 C-мотива, FasL – Fas-лиганд. Модифицировано из [5].

Figure 5. Brief illustration of the interactions between NK cells and myeloid cells

Note. Gzrms, granzymes; Prfs, perforins; XCL1, chemokine ligand of 1 C-motif; FasL, Fas-ligand. Modified from [5].

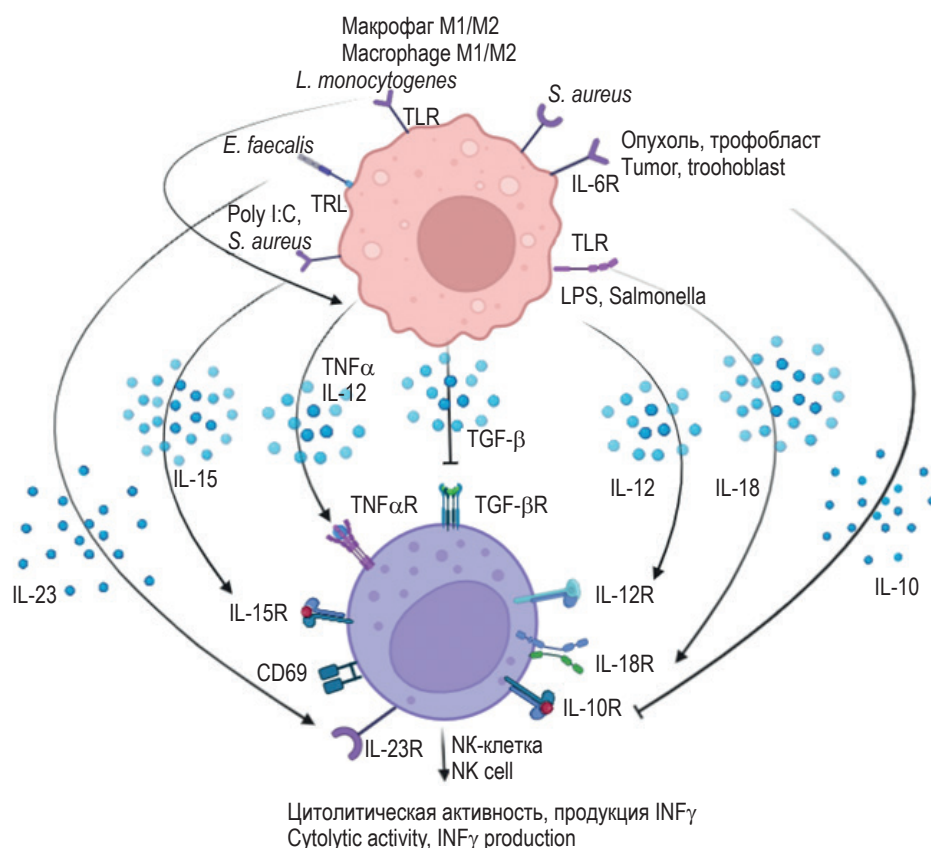


Рисунок 6. Различные сигналы Мф, влияющие на функции НК-клеток

Примечание. TLR-активированные M1-Мф за счет секреции провоспалительных цитокинов активируют НК-клетки (стрелка – активирующее действие); M2-Мф-полученные IL-10 и TGF-β ингибируют активность НК-клеток (ингибирующее действие). Модифицировано из [61].

Figure 6. Various Mφ signals affecting the functions of NK cells

Note. TLR-activated M1-Mφ due to the secretion of proinflammatory cytokines activate NK cells (arrow – activating effect); M2-Mφ-derived IL-10 and TGF-β inhibit the activity of NK cells (inhibitory effect). Modified from [61].

ка как CD56^{bright}, так и CD56^{dim} НК-клетки высоко экспрессируют T-bet и Eomes, и большинство зрелых НК-клеток совместно экспрессируют оба этих фактора. Однако доля CD56^{bright}НК-клеток экспрессирует более низкие уровни T-bet, чем CD56^{dim}НК-клетки. Высокий уровень экспрессии Eomes характерен для CD56^{bright}НК-клеток, доля CD56^{dim}НК-клеток экспрессирует меньше этого фактора [54]. Это также соотносится с активацией KIR во время созревания. Усиление регуляции KIR во время созревания связано со снижением Eomes и увеличением уровней T-bet [95]. Зрелые НК-клетки, таким образом, более цитотоксичны, чем незрелые, в отношении опухолей-мишеней. Факторы транскрипции T-bet и Eomes совместно регулируют выработку IFNγ в НК-клетках, в то время как T-bet является решающим регулятором их цитотоксической активности за счет повышенной выработки перфорина и гранзима В [95]. Что касается IL-15, сигналинг происходит через гетеротримерный рецептор, состоящий из IL-15Rα (CD215), IL-2/IL-15Rβ (CD122) и общей цепи γ (CD132), T-bet и Eomes

напрямую связываются с промоторной областью гена Il2rb; однако Eomes играет преобладающую роль в поддержании экспрессии CD122 в содействии созреванию НК-клеток [113]. Таким образом, зрелые НК-клетки, более цитотоксичны, чем незрелые, в отношении опухолей-мишеней. Факторы транскрипции T-bet и Eomes совместно регулируют выработку IFNγ в НК-клетках, в то время как T-bet является решающим регулятором их цитотоксической активности за счет повышенной выработки перфорина и гранзима В [95]. Созревание и активация естественных киллеров происходит с затрагиванием сложных сигнальных систем в системе присутствия регуляторных молекул. Миелоидные клетки играют роль «третьего лишнего» в этой сети взаимодействий [5], внося непосредственный вклад в функционирование естественных киллеров (рис. 5).

Продукция IL-15 активируется в Мф в ответ на LPS; IL-15 индуцирует иммунный ответ Th1-типа и естественных киллеров благодаря индукции IFNγ и фактора транскрипции T-bet [113].

Регулируемая дифференцировка НК-клеток важна для работы иммунной системы как при инфекциях, опухолях, так и в децидуальной оболочке при беременности. В настоящее время показано, что нарушение регуляции НК-клеток приводит к различной репродуктивной патологии, включая привычное невынашивание беременности, необъяснимое бесплодие и преэклампсию [57]. Макрофаги за счет своей пластичности могут модулировать функциональную активность и дифференцировку НК-клеток за счет широкого репертуара продуцируемых ими цитокинов и поверхностных лигандов. Заметное влияние на НК-клетки имеют цитокины, широко продуцируемые М1-макрофагами (IL-12, IL-18, IL-15, IL-23, TNF α , IFN α , IFN β) при различных инфекциях [65, 87], в начале и в конце беременности; и регуляторные медиаторы TGF- β , IL-10, секретируемые М2-подобными Мф в середине беременности, способствующие иммунологической толерантности. Цитокины М1-макрофагов увеличивают, а медиаторы М2-макрофагов способствуют снижению цитолитической активности НК-клеток, продукции ими IFN γ (рис. 6). Как итог, регуляторные взаимосвязи между Мф и НК-клетками в децидуальной оболочке имеет решающее значение в установлении и развитии физиологической беременности.

Все больше исследований подтверждают факт значительного влияния межклеточных взаимодействий в судьбе НК-клеток. Однако широкий репертуар активирующих и ингибирующих рецепторов, присутствующих на них, и регуляция их транскрипции, по-видимому, постоянно подвергается влиянию микроокружения, и не все эти изменения в экспрессии рецепторов ясно определены. Функциональная активность: цитотоксическая или регуляторная, — зависит от конечного баланса полученных НК-клеткой от микроокружения, в том числе от Мф, активирующих или ингибирующих стимулов.

Заключение

Суммируя описанные в обзоре данные необходимо отметить, что при различных патологических и физиологических состояниях в

тканях моноциты дифференцируются в различные субпопуляции макрофагов М1/М2. Дифференцировка в этих случаях зависит от сигналов контактного и дистантного взаимодействия с микроокружением. С учетом этих сигналов разработаны методы для получения различных подклассов М1 и М2 в условиях *in vitro* как из моноцитов периферической крови, так и из линейных клеток миелоидного происхождения. Полученные таким образом макрофаги воспроизводят фенотип определенных подклассов М1 или М2, которые могут присутствовать при различных патологических и физиологических процессах в организме. Такой подход получил широкое распространение для экспериментального изучения межклеточных взаимодействий между различными подклассами М1 и М2 и другими типами клеток. Частным случаем таких исследований является изучение роли децидуальных макрофагов во взаимоотношениях с двумя основными клеточными типами, определяющими исход беременности: клетками трофобласта и естественными киллерами. Подобная модель взаимоотношений характерна не только для клеток маточно-плацентарного контакта, но и для опухолей: ассоциированные с опухолью макрофаги (ТАМ) обладают фенотипом и свойствами, сходными с децидуальными макрофагами, а естественные киллеры, локализованные в опухолях, по свойствам сходны с децидуальными НК-клетками. Установление причинно-следственных связей и определение точного главенства одного из трех клеточных типов в зоне маточно-плацентарного контакта скорее всего не имеет смысла. Вероятнее всего, речь может идти о сложившемся в ходе эволюции триумvirате из Мф, клеток трофобласта и НК-клеток и связанного с ним цитокинового микроокружения, непосредственно влияющего на созревание, активность, фенотипический и транскрипционный профиль клеток в децидуальной оболочке и, как следствие, на течение и исход беременности. Пристальное изучение взаимодействий этих клеток прольет свет не только на особенности межклеточных взаимоотношений в зоне маточно-плацентарного контакта, но и на взаимоотношения клеток опухоли с НК-клетками и макрофагами.

Список литературы / References

1. Айламазян Э.К., Степанова О.И., Сельков С.А., Соколов Д.И. Клетки иммунной системы матери и клетки трофобласта: «Конструктивное сотрудничество» ради достижения совместной цели // Вестник Российской академии медицинских наук, 2013. Т. 68, № 11. С. 12-21. [Ailamazian E.K., Stepanova O.I., Selkov S.A., Sokolov D.I. Cells of immune system of mother and trophoblast cells: constructive cooperation for the sake of achievement of the joint purpose. *Vestnik Rossiyskoy akademii meditsinskikh nauk = Annals of the Russian Academy of Medical Sciences*, 2013, Vol. 68, no. 11, pp. 12-21. (In Russ.)]
2. Богданова И.М., Болтовская М.Н. Функциональная и фенотипическая характеристика классических (М1) и альтернативно активированных (М2) макрофагов и их роль в течении нормальной и патологической беременности (обзор литературы) // Проблемы репродукции, 2019. Т. 25, № 5. С. 110-118.

[Bogdanova I.M., Boltovskaya M.N. Functional and phenotypic characteristics of classical (M1) and alternatively activated (M2) macrophages and their role during normal and pathological pregnancy (literature review). *Problemy reproduktivnoy = Russian Journal of Human Reproduction*, 2019, Vol. 25, no. 5, pp. 110-118. (In Russ.)]

3. Вишнякова П.А., Ельчанинов А.В., Киселева В.В., Муминова К.Т., Ходжаева З.С., Еремина И.З., Фатхудинов Т.Х. Роль плацентарных макрофагов при физиологической беременности и преэклампсии // *Акушерство и гинекология*, 2022, № 4, С. 5-12. [Vishnyakova P.A., Yelchaninov A.V., Kiseleva V.V., Muminova K.T., Khodzhaeva Z.S., Eremina I.Z., Fatkhutdinov T.H. The role of placental macrophages in physiological pregnancy and preeclampsia. *Akusherstvo i ginekologiya = Obstetrics and Gynecology*, 2022, no. 4, pp. 5-12. (In Russ.)]

4. Соколов Д.И., Сельков С.А. Децидуальные макрофаги: роль в иммунологическом диалоге матери и плода // *Иммунология*, 2014, Т. 35, № 2, С. 113-117. [Sokolov D.I., Selkov S.A. Decidual macrophages: the role in the immunological dialogue of mother and fetus. *Immunologiya = Immunology*, 2014, Vol. 35, no. 2, pp. 113-117. (In Russ.)]

5. Abel A.M., Yang C., Thakar M.S., Malarkannan S. Natural killer cells: development, maturation, and clinical utilization. *Front. Immunol.*, 2018, Vol. 9, 1869. doi: 10.3389/fimmu.2018.01869.

6. Abrahams V.M., Mor G. Toll-like receptors and their role in the trophoblast. *Placenta*, 2005, Vol. 26, no. 7, pp. 540-547.

7. Aldo P.B., Racicot K., Craviero V., Guller S., Romero R., Mor G. Trophoblast induces monocyte differentiation into CD14⁺/CD16⁺ macrophages. *Am. J. Reprod. Immunol.*, 2014, Vol. 72, no. 3, pp. 270-284.

8. Alvarez-Breckenridge C.A., Yu J., Kaur B., Caligiuri M.A., Chiocca E.A. Deciphering the multifaceted relationship between oncolytic viruses and natural killer cells. *Adv. Virol.*, 2012, Vol. 2012, 702839. doi: 10.1155/2012/702839.

9. Antmen E., Vrana N.E., Hasirci V. The role of biomaterials and scaffolds in immune responses in regenerative medicine: macrophage phenotype modulation by biomaterial properties and scaffold architectures. *Biomater. Sci.*, 2021, Vol. 9, no. 24, pp. 8090-8110.

10. Auwerx J. The human leukemia cell line, THP-1: a multifaceted model for the study of monocyte-macrophage differentiation. *Experientia*, 1991, Vol. 47, no. 1, pp. 22-31.

11. Bellora F., Castriconi R., Dondero A., Reggiardo G., Moretta L., Mantovani A., Moretta A., Bottino C. The interaction of human natural killer cells with either unpolarized or polarized macrophages results in different functional outcomes. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 2010, Vol. 107, no. 50, pp. 21659-21664.

12. Berezha V.A., Mamontova T.V., Gromova A.M. Cd68⁺ M1 macrophages is associated with placental insufficiency under fetal growth restriction. *Wiadomości Lekarskie*, 2021, Vol. 74, no. 2, pp. 213-219.

13. Bhattacharya S., Aggarwal A. M2 macrophages and their role in rheumatic diseases. *Rheumatol. Int.*, 2019, Vol. 39, no. 5, pp. 769-780.

14. Binatti E., Gerussi A., Barisani D., Invernizzi P. The role of macrophages in liver fibrosis: new therapeutic opportunities. *Int. J. Mol. Sci.*, 2022, Vol. 23, no. 12, 6649. doi: 10.3390/ijms23126649.

15. Biswas S.K., Mantovani A. Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm. *Nat. Immunol.*, 2010, Vol. 11, no. 10, pp. 889-896.

16. Brown M.B., von Chamier M., Allam A.B., Reyes L. M1/M2 macrophage polarity in normal and complicated pregnancy. *Front. Immunol.*, 2014, Vol. 5, 606. doi: 10.3389/fimmu.2014.00606.

17. Camille N., Dealtry G. Regulation of M1/M2 macrophage polarization by *Sutherlandia frutescens* via NFκB and MAPK signaling pathways. *South African J. Botany*, 2018, Vol. 116, pp. 42-51.

18. Capobianco A., Rovere-Querini P. Endometriosis, a disease of the macrophage. *Front. Immunol.*, 2013, Vol. 4, 9. doi: 10.3389/fimmu.2013.00009.

19. Chanput W., Peters V., Wichers H., Verhoeckx K., Cotter P., López-Expósito I., Kleiveland C., Lea T., Mackie A., Requena T., Swiatecka D. THP-1 and U937 Cells. In: *The Impact of Food Bioactives on Health: in vitro and ex vivo models* [Internet]. Cham (CH): Springer; 2015. Chapter 14. pp. 147-159.

20. Choi Y.H., Lim E.J., Kim S.W., Moon Y.W., Park K.S., An H.J. IL-27 enhances IL-15/IL-18-mediated activation of human natural killer cells. *J. Immunother. Cancer*, 2019, Vol. 7, no. 1, 168. doi: 10.1186/s40425-019-0652-7.

21. Co E.C., Gormley M., Kapidzic M., Rosen D.B., Scott M.A., Stolp H.A., McMaster M., Lanier L.L., Barcena A., Fisher S.J. Maternal decidual macrophages inhibit NK cell killing of invasive cytotrophoblasts during human pregnancy. *Biol. Reprod.*, 2013, Vol. 88, no. 6, 155. doi: 10.1095/biolreprod.112.099465.

22. Corvino D., Kumar A., Bald T. Plasticity of NK cells in Cancer. *Front. Immunol.*, 2022, Vol. 13, 888313. doi: 10.3389/fimmu.2022.888313.

23. Daigneault M., Preston J.A., Marriott H.M., Whyte M.K., Dockrell D.H. The identification of markers of macrophage differentiation in PMA-stimulated THP-1 cells and monocyte-derived macrophages. *PLoS One*, 2010, Vol. 5, no. 1, e8668. doi: 10.1371/journal.pone.0008668.

24. Dante G., Vaccaro V., Facchinetti F. Use of progestagens during early pregnancy. *Facts Views Vis. Obgyn*, 2013, Vol. 5, no. 1, pp. 66-71.

25. Dekel N., Gnainsky Y., Granot I., Mor G. Inflammation and implantation. *Am. J. Reprod. Immunol.*, 2010, Vol. 63, no. 1, pp. 17-21.

26. Deng L., Jian Z., Xu T., Li F., Deng H., Zhou Y., Lai S., Xu Z., Zhu L. Macrophage polarization: an important candidate regulator for lung diseases. *Molecules*, 2023, Vol. 28, no. 5, 2379. doi: 10.3390/molecules28052379.

27. Ding J., Yang C., Cheng Y., Wang J., Zhang S., Yan S., He F., Yin T., Yang J. Trophoblast-derived IL-6 serves as an important factor for normal pregnancy by activating Stat3-mediated M2 macrophages polarization. *Int. Immunopharmacol.*, 2021, Vol. 90, 106788. doi: 10.1016/j.intimp.2020.106788.
28. Ding J., Yang C., Zhang Y., Wang J., Zhang S., Guo D., Yin T., Yang J. M2 macrophage-derived G-CSF promotes trophoblasts EMT, invasion and migration via activating PI3K/Akt/Erk1/2 pathway to mediate normal pregnancy. *J. Cell. Med.*, 2021, Vol. 25, no. 4, pp. 2136-2147.
29. Faas M.M., de Vos P. Uterine NK cells and macrophages in pregnancy. *Placenta*, 2017, Vol. 56, pp. 44-52.
30. Faas M.M., Spaans F., de Vos P. Monocytes and macrophages in pregnancy and pre-eclampsia. *Front. Immunol.*, 2014, Vol. 5, 298. doi: 10.3389/fimmu.2014.00298
31. Ferrante C.J., Pinhal-Enfield G., Elson G., Cronstein B.N., Hasko G., Outram S., Leibovich S.J. The adenosine-dependent angiogenic switch of macrophages to an M2-like phenotype is independent of interleukin-4 receptor alpha (IL-4Ralpha) signaling. *Inflammation*, 2013, Vol. 36, no. 4, pp. 921-931.
32. Gatto F., Cagliani R., Catelani T., Guarnieri D., Moglianetti M., Pompa P.P., Bardi G. PMA-induced THP-1 macrophage differentiation is not impaired by citrate-coated platinum nanoparticles. *Nanomaterials (Basel)*, 2017, Vol. 7, no. 10, 332. doi: 10.3390/nano7100332.
33. Geissmann F., Manz M.G., Jung S., Sieweke M.H., Merad M., Ley K. Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. *Science*, 2010, Vol. 327, no. 5966, pp. 656-661.
34. Genin M., Clement F., Fattaccioli A., Raes M., Michiels C. M1 and M2 macrophages derived from THP-1 cells differentially modulate the response of cancer cells to etoposide. *BMC Cancer*, 2015, Vol. 15, 577. doi: 10.1186/s12885-015-1546-9.
35. Gomez-Lopez N., Garcia-Flores V., Chin P.Y., Groome H.M., Bijland M.T., Diener K.R., Romero R., Robertson S.A. Macrophages exert homeostatic actions in pregnancy to protect against preterm birth and fetal inflammatory injury. *JCI Insight*, 2021, Vol. 6, no. 19, e146089. doi: 10.1172/jci.insight.146089.
36. Grasso E., Paparini D., Hauk V., Salamone G., Leiros C.P., Ramhorst R. Differential migration and activation profile of monocytes after trophoblast interaction. *PLoS One*, 2014, Vol. 9, no. 5, e97147. doi: 10.1371/journal.pone.0097147.
37. Hamza T., Barnett J.B., Li B. Interleukin 12 a key immunoregulatory cytokine in infection applications. *Int. J. Mol. Sci.*, 2010, Vol. 11, no. 3, pp. 789-806.
38. Huang C., Bi J. Expression regulation and function of T-Bet in NK cells. *Front. Immunol.*, 2021, Vol. 12, 761920. doi: 10.3389/fimmu.2021.761920.
39. Huang H.L., Yang H.L., Lai Z.Z., Yang S.L., Li M.Q., Li D.J. Decidual IDO(+) macrophage promotes the proliferation and restricts the apoptosis of trophoblasts. *J. Reprod. Immunol.*, 2021, Vol. 148, 103364. doi: 10.1016/j.jri.2021.103364.
40. Huber R., Pietsch D., Gunther J., Welz B., Vogt N., Brand K. Regulation of monocyte differentiation by specific signaling modules and associated transcription factor networks. *Cell. Mol. Life Sci.*, 2014, Vol. 71, no. 1, pp. 63-92.
41. Huntington N.D., Legrand N., Alves N.L., Jaron B., Weijer K., Plet A., Corcuff E., Mortier E., Jacques Y., Spits H., Di Santo J.P. IL-15 trans-presentation promotes human NK cell development and differentiation *in vivo*. *J. Exp. Med.*, 2009, Vol. 206, no. 1, pp. 25-34.
42. Jena M.K., Nayak N., Chen K., Nayak N.R. Role of macrophages in pregnancy and related complications. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz)*, 2019, Vol. 67, no. 5, pp. 295-309.
43. Jones R.L., Hannan N.J., Kaitu'u T.J., Zhang J., Salmonsens L.A. Identification of chemokines important for leukocyte recruitment to the human endometrium at the times of embryo implantation and menstruation. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 2004, Vol. 89, no. 12, pp. 6155-6167.
44. Kamoshida G., Matsuda A., Sekine W., Mizuno H., Oku T., Itoh S., Irimura T., Tsuji T. Monocyte differentiation induced by co-culture with tumor cells involves RGD-dependent cell adhesion to extracellular matrix. *Cancer Lett.*, 2012, Vol. 315, no. 2, pp. 145-152.
45. Kapellos T.S., Bonaguro L., Gemund I., Reusch N., Saglam A., Hinkley E.R., Schultze J.L. Human monocyte subsets and phenotypes in major chronic inflammatory diseases. *Front. Immunol.*, 2019, Vol. 10, 2035. doi: 10.3389/fimmu.2019.02035.
46. Kim J.S., Romero R., Cushenberry E., Kim Y.M., Erez O., Nien J.K., Yoon B.H., Espinoza J., Kim C.J. Distribution of CD14⁺ and CD68⁺ macrophages in the placental bed and basal plate of women with preeclampsia and preterm labor. *Placenta*, 2007, Vol. 28, no. 5-6, pp. 571-576.
47. Kim Y., Nurakhayev S., Nurkesh A., Zharkinbekov Z., Saparov A. Macrophage polarization in cardiac tissue repair following myocardial infarction. *Int. J. Mol. Sci.*, 2021, Vol. 22, no. 5, 2715. doi: 10.3390/ijms22052715.
48. Krasselt M., Baerwald C., Wagner U., Rossol M. CD56⁺ monocytes have a dysregulated cytokine response to lipopolysaccharide and accumulate in rheumatoid arthritis and immunosenescence. *Arthritis Res. Ther.*, 2013, Vol. 15, no. 5, R139. doi: 10.1186/ar4321.
49. Krneta T., Gillgrass A., Poznanski S., Chew M., Lee A.J., Kolb M., Ashkar A.A. M2-polarized and tumor-associated macrophages alter NK cell phenotype and function in a contact-dependent manner. *J. Leukoc. Biol.*, 2017, Vol. 101, no. 1, pp. 285-295.
50. Lasch M., Sudan K., Paul C., Schulz C., Kolben T., Dorp J.V., Eren S., Beyer S., Siniscalchi L., Mahner S., Jeschke U., Meister S. Isolation of decidual macrophages and Hofbauer cells from term placenta-comparison of the expression of CD163 and CD80. *Int. J. Mol. Sci.*, 2022, Vol. 23, no. 11, 6113. doi: 10.3390/ijms23116113.

51. Lavoie P.M., Levy O. The mononuclear phagocyte system. In Fetal and Neonatal Physiology. 5. Chapter 125. Elsevier; 2016. pp. 1208-1216.
52. Lawrence T., Natoli G. Transcriptional regulation of macrophage polarization: enabling diversity with identity. *Nat. Rev. Immunol.*, 2011, Vol. 11, no. 11, pp. 750-761.
53. Lee S.-Y. Phellinus linteus extract regulates macrophage polarization in human THP-1 Cells. *J. Life Sci.*, 2000, Vol. 30, pp. 113-121.
54. Leong J.W., Wagner J.A., Ireland A.R., Fehniger T.A. Transcriptional and post-transcriptional regulation of NK cell development and function. *Clin. Immunol.*, 2017, Vol. 177, pp. 60-69.
55. Liu Y., Gao S., Zhao Y., Wang H., Pan Q., Shao Q. Decidual natural killer cells: a good nanny at the maternal-fetal interface during early pregnancy. *Front. Immunol.*, 2021, Vol. 12, 663660. doi: 10.3389/fimmu.2021.663660.
56. Liu Y.C., Zou X.B., Chai Y.F., Yao Y.M. Macrophage polarization in inflammatory diseases. *Int. J. Biol. Sci.*, 2014, Vol. 10, no. 5, pp. 520-529.
57. Luu T., AlSubki L., Wolf K., Thees A., Ganieva U., Dambaeva S., Beaman K., Kwak-Kim J. Natural killer cell-mediated immunopathology in recurrent pregnancy losses. *Explor. Immunol.*, 2022, Vol. 2, no. 5, pp. 693-722.
58. Macklin P.S., McAuliffe J., Pugh C.W., Yamamoto A. Hypoxia and HIF pathway in cancer and the placenta. *Placenta*, 2017, Vol. 56, pp. 8-13.
59. Male V., Sharkey A., Masters L., Kennedy P.R., Farrell L.E., Moffett A. The effect of pregnancy on the uterine NK cell KIR repertoire. *Eur. J. Immunol.*, 2011, Vol. 41, no. 10, pp. 3017-3027.
60. Mattioli I., Pesant M., Tentorio P.F., Molgora M., Marcenaro E., Lugli E., Locati M., Mavilio D. Priming of human resting NK cells by autologous M1 macrophages via the engagement of IL-1beta, IFN-beta, and IL-15 Pathways. *J. Immunol.*, 2015, Vol. 195, no. 6, pp. 2818-2828.
61. Michel T., Hentges F., Zimmer J. Consequences of the crosstalk between monocytes/macrophages and natural killer cells. *Front. Immunol.*, 2012, Vol. 3, 403. doi: 10.3389/fimmu.2012.00403.
62. Mikhailova V.A., Bazhenov D.O., Belyakova K.L., Selkov S.A., Sokolov D.I. Differentiation of NK cells. A look through the prism of transcription factors and intracellular messengers. *Medical Immunology (Russia)*, 2019, Vol. 21, no. 1, pp. 21-38. doi: 10.15789/1563-0625-2019-1-21-38.
63. Mikhailova V.A., Grebenkina P.V., Tyshchuk E.V., Davydova A.A., Zagaynova V.A., Kogan I.Y., Selkov S.A., Sokolov D.I. Phenotypic profile of peripheral blood NK cells under culturing with trophoblast cells and IL-15 and IL-18 cytokines. *Medical Immunology (Russia)*, 2021, Vol. 23, no. 6, pp. 1383-1388. doi: 10.15789/1563-0625-ppo-2403.
64. Mohamed M.E., Gamal R.M., El-Mokhtar M.A., Hassan A.T., Abozaid H.S.M., Ghandour A.M., Abdelmoez A.I.S., H A.Y., E H.E.-H., Y S.M., Abdellatif Awad A. Peripheral cells from patients with systemic sclerosis disease co-expressing M1 and M2 monocyte/macrophage surface markers: Relation to the degree of skin involvement. *Hum. Immunol.*, 2021, Vol. 82, no. 9, pp. 634-639.
65. Molgora M., Supino D., Mavilio D., Santoni A., Moretta L., Mantovani A., Garlanda C. The yin-yang of the interaction between myelomonocytic cells and NK cells. *Scand. J. Immunol.*, 2018, Vol. 88, no. 3, e12705. doi: 10.1111/sji.12705.
66. Mor G. Inflammation and pregnancy: the role of toll-like receptors in trophoblast-immune interaction. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 2008, Vol. 1127, pp. 121-128.
67. Mor G., Abrahams V.M. Potential role of macrophages as immunoregulators of pregnancy. *Reprod. Biol. Endocrinol.*, 2003, Vol. 1, 119. doi: 10.1186/1477-7827-1-119.
68. Mor G., Cardenas I., Abrahams V., Guller S. Inflammation and pregnancy: the role of the immune system at the implantation site. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 2011, Vol. 1221, no. 1, pp. 80-87.
69. Mukherjee C., Hale C., Mukhopadhyay S. A simple multistep protocol for differentiating human induced pluripotent stem cells into functional macrophages. *Methods Mol. Biol.*, 2018, Vol. 1784, pp. 13-28.
70. Ning F., Liu H., Lash G.E. The Role of decidual macrophages during normal and pathological pregnancy. *Am. J. Reprod. Immunol.*, 2016, Vol. 75, no. 3, pp. 298-309.
71. Noh J.Y., Yoon S.R., Kim T.D., Choi I., Jung H. Toll-like receptors in natural killer cells and their application for immunotherapy. *J. Immunol. Res.*, 2020, Vol. 2020, 2045860. doi: 10.1155/2020/2045860.
72. Nunez S.Y., Ziblat A., Secchiari F., Torres N.I., Sierra J.M., Raffo Iraolagoitia X.L., Araya R.E., Domaica C.I., Fuertes M.B., Zwirner N.W. Human M2 macrophages limit NK cell effector functions through secretion of TGF-beta and engagement of CD85j. *J. Immunol.*, 2018, Vol. 200, no. 3, pp. 1008-1015.
73. Ogle M.E., Segar C.E., Sridhar S., Botchwey E.A. Monocytes and macrophages in tissue repair: Implications for immunoregenerative biomaterial design. *Exp. Biol. Med. (Maywood)*, 2016, Vol. 241, no. 10, pp. 1084-1097.
74. Olmos-Ortiz A., Flores-Espinosa P., Mancilla-Herrera I., Vega-Sanchez R., Diaz L., Zaga-Clavellina V. Innate immune cells and toll-like receptor-dependent responses at the maternal-fetal interface. *Int. J. Mol. Sci.*, 2019, Vol. 20, no. 15, 3654. doi: 10.3390/ijms20153654.
75. Orekhov A.N., Orekhova V.A., Nikiforov N.G., Myasoedova V.A., Grechko A.V., Romanenko E.B., Zhang D., Chistiakov D.A. Monocyte differentiation and macrophage polarization. *Vessel Plus*, 2019, Vol. 3, 10. doi: 10.20517/2574-1209.2019.04
76. Ozanska A., Szymczak D., Rybka J. Pattern of human monocyte subpopulations in health and disease. *Scand. J. Immunol.*, 2020, Vol. 92, no. 1, pp. e12883. doi: 10.1111/sji.12883.

77. Papak I., Chrusciel E., Dziubek K., Kurkowiak M., Urban-Wojciuk Z., Marjanski T., Rzyman W., Marek-Trzonkowska N. What inhibits natural killers' performance in tumour. *Int. J. Mol. Sci.*, 2022, Vol. 23, no. 13, 7030. doi: 10.3390/ijms23137030.
78. Parasar P., Guru N., Nayak N.R. Contribution of macrophages to fetomaternal immunological tolerance. *Hum. Immunol.*, 2021, Vol. 82, no. 5, pp. 325-331.
79. Park D.W., Yang K.M. Hormonal regulation of uterine chemokines and immune cells. *Clin. Exp. Reprod. Med.*, 2011, Vol. 38, no. 4, pp. 179-185.
80. Paul S., Lal G. The Molecular mechanism of natural killer cells function and its importance in cancer immunotherapy. *Front. Immunol.*, 2017, Vol. 8, 1124. doi: 10.3389/fimmu.2017.01124.
81. Peng L.S., Zhang J.Y., Teng Y.S., Zhao Y.L., Wang T.T., Mao F.Y., Lv Y.P., Cheng P., Li W.H., Chen N., Duan M., Chen W., Guo G., Zou Q.M., Zhuang Y. Tumor-Associated Monocytes/Macrophages Impair NK-Cell Function via TGFbeta1 in Human Gastric Cancer. *Cancer Immunol. Res.*, 2017, Vol. 5, no. 3, pp. 248-256.
82. Piersma S.J., Brizic I. Natural killer cell effector functions in antiviral defense. *FEBS J.*, 2022, Vol. 289, no. 14, pp. 3982-3999.
83. Platanitis E., Decker T. Regulatory networks involving STATs, IRFs, and NFkappaB in inflammation. *Front. Immunol.*, 2018, Vol. 9, 2542. doi: 10.3389/fimmu.2018.02542.
84. Qin X.Y., Shen H.H., Zhou W.J., Mei J., Lu H., Tan X.F., Zhu R., Zhou W.H., Li D.J., Zhang T., Ye J.F., Li M.Q. Insight of autophagy in spontaneous miscarriage. *Int. J. Biol. Sci.*, 2022, Vol. 18, no. 3, pp. 1150-1170.
85. Radomska-Lesniewska D.M., Bialoszewska A., Kaminski P. Angiogenic properties of NK cells in cancer and other angiogenesis-dependent diseases. *Cells*, 2021, Vol. 10, no. 7, 1621. doi: 10.3390/cells10071621.
86. Raghupathy R., Al Mutawa E., Makhseed M., Azizieh F., Szekeres-Bartho J. Modulation of cytokine production by dydrogesterone in lymphocytes from women with recurrent miscarriage. *BJOG*, 2005, Vol. 112, no. 8, pp. 1096-1101.
87. Raza A., Rossi G.R., Janjua T.I., Souza-Fonseca-Guimaraes F., Popat A. Nanobiomaterials to modulate natural killer cell responses for effective cancer immunotherapy. *Trends Biotechnol.*, 2023, Vol. 41, no. 1, pp. 77-92.
88. Renaud S.J., Graham C.H. The role of macrophages in utero-placental interactions during normal and pathological pregnancy. *Immunol. Invest.*, 2008, Vol. 37, no. 5, pp. 535-564.
89. Robinson D.P., Klein S.L. Pregnancy and pregnancy-associated hormones alter immune responses and disease pathogenesis. *Horm. Behav.*, 2012, Vol. 62, no. 3, pp. 263-271.
90. Roszer T. Understanding the mysterious M2 macrophage through activation markers and effector mechanisms. *Mediators Inflamm.*, 2015, Vol. 2015, 816460. doi: 10.1155/2015/816460.
91. Sanmarco L.M., Eberhardt N., Ponce N.E., Cano R.C., Bonacci G., Aoki M.P. New Insights into the immunobiology of mononuclear phagocytic cells and their relevance to the pathogenesis of cardiovascular diseases. *Front. Immunol.*, 2017, Vol. 8, 1921. doi: 10.3389/fimmu.2017.01921.
92. Shapouri-Moghaddam A., Mohammadian S., Vazini H., Taghadosi M., Esmaceli S.A., Mardani F., Seifi B., Mohammadi A., Afshari J.T., Sahebkar A. Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease. *J. Cell. Physiol.*, 2018, Vol. 233, no. 9, pp. 6425-6440.
93. Sharkey A.M., Xiong S., Kennedy P.R., Gardner L., Farrell L.E., Chazara O., Ivarsson M.A., Hiby S.E., Colucci F., Moffett A. Tissue-specific education of decidual NK cells. *J. Immunol.*, 2015, Vol. 195, no. 7, pp. 3026-3032.
94. Shmeleva E.V., Colucci F. Maternal natural killer cells at the intersection between reproduction and mucosal immunity. *Mucosal Immunol.*, 2021, Vol. 14, no. 5, pp. 991-1005.
95. Simonetta F., Pradier A., Roosnek E. T-bet and eomesodermin in NK cell development, maturation, and function. *Front. Immunol.*, 2016, Vol. 7, 241. doi: 10.3389/fimmu.2016.00241.
96. Socha M.W., Malinowski B., Puk O., Wartega M., Stankiewicz M., Kazdepka-Zieminska A., Wicinski M. The role of NF-kappaB in uterine spiral arteries remodeling, insight into the cornerstone of preeclampsia. *Int. J. Mol. Sci.*, 2021, Vol. 22, no. 2. doi: 10.3390/ijms22020704.
97. Sprangers S., de Vries T.J., Everts V. Monocyte heterogeneity: consequences for monocyte-derived immune cells. *J. Immunol. Res.*, 2016, Vol. 2016, 1475435. doi: 10.1155/2016/1475435.
98. Stojanovic A., Correia M.P., Cerwenka A. The NKG2D/NKG2DL Axis in the crosstalk between lymphoid and myeloid cells in health and disease. *Front. Immunol.*, 2018, Vol. 9, 827. doi: 10.3389/fimmu.2018.00827.
99. Sun F., Wang S., Du M. Functional regulation of decidual macrophages during pregnancy. *J. Reprod. Immunol.*, 2021, Vol. 143, 103264. doi: 10.1016/j.jri.2020.103264.
100. Svensson J., Jenmalm M.C., Matussek A., Geffers R., Berg G., Ernerudh J. Macrophages at the fetal-maternal interface express markers of alternative activation and are induced by M-CSF and IL-10. *J. Immunol.*, 2011, Vol. 187, no. 7, pp. 3671-3682.
101. Tarannum M., Romee R. Cytokine-induced memory-like natural killer cells for cancer immunotherapy. *Stem Cell Res. Ther.*, 2021, Vol. 12, no. 1, 592. doi: 10.1186/s13287-021-02655-5.
102. Tsai Y.C., Tseng J.T., Wang C.Y., Su M.T., Huang J.Y., Kuo P.L. Medroxyprogesterone acetate drives M2 macrophage differentiation toward a phenotype of decidual macrophage. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 2017, Vol. 452, pp. 74-83.
103. Tsuchiya S., Yamabe M., Yamaguchi Y., Kobayashi Y., Konno T., Tada K. Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1). *Int. J. Cancer*, 1980, Vol. 26, no. 2, pp. 171-176.

104. Valledor A.F., Comalada M., Santamaria-Babi L.F., Lloberas J., Celada A. Macrophage proinflammatory activation and deactivation: a question of balance. *Adv. Immunol.*, 2010, Vol. 108, pp. 1-20.
105. van Acker H.H., Capsomidis A., Smits E.L., van Tendeloo V.F. CD56 in the immune system: more than a marker for cytotoxicity? *Front. Immunol.*, 2017, Vol. 8, 892. doi: 10.3389/fimmu.2017.00892.
106. van Furth R., Cohn Z.A., Hirsch J.G., Humphrey J.H., Spector W.G., Langevoort H.L. The mononuclear phagocyte system: a new classification of macrophages, monocytes, and their precursor cells. *Bull World Health Organ*, 1972, Vol. 46, no. 6, pp. 845-852.
107. Vishnyakova P., Elchaninov A., Fatkhudinov T., Sukhikh G. Role of the Monocyte-Macrophage System in Normal Pregnancy and Preeclampsia. *Int. J. Mol. Sci.*, 2019, Vol. 20, no. 15, 3695. doi: 10.3390/ijms20153695.
108. Vishnyakova P., Poltavets A., Nikitina M., Midiber K., Mikhaleva L., Muminova K., Potapova A., Khodzhaeva Z., Pyregov A., Elchaninov A., Fatkhudinov T., Sukhikh G. Expression of Estrogen Receptor alpha by Decidual Macrophages in Preeclampsia. *Biomedicines*, 2021, Vol. 9, no. 2, 191. doi: 10.3390/biomedicines9020191.
109. Vitale M., Cantoni C., Pietra G., Mingari M.C., Moretta L. Effect of tumor cells and tumor microenvironment on NK-cell function. *Eur. J. Immunol.*, 2014, Vol. 44, no. 6, pp. 1582-1592.
110. Vivier E., Raulet D.H., Moretta A., Caligiuri M.A., Zitvogel L., Lanier L.L., Yokoyama W.M., Ugolini S. Innate or adaptive immunity? The example of natural killer cells. *Science*, 2011, Vol. 331, no. 6013, pp. 44-49.
111. Wang W., Sung N., Gilman-Sachs A., Kwak-Kim J. T Helper (Th) Cell Profiles in Pregnancy and Recurrent Pregnancy Losses: Th1/Th2/Th9/Th17/Th22/Tfh Cells. *Front. Immunol.*, 2020, Vol. 11, 2025. doi: 10.3389/fimmu.2020.02025.
112. Wang X., Xiong H., Ning Z. Implications of NKG2A in immunity and immune-mediated diseases. *Front. Immunol.*, 2022, Vol. 13, 960852. doi: 10.3389/fimmu.2022.960852.
113. Wang X., Zhao X.Y. Transcription factors associated with IL-15 cytokine signaling during NK cell development. *Front. Immunol.*, 2021, Vol. 12, 610789. doi: 10.3389/fimmu.2021.610789.
114. Wang X.Q., Zhou W.J., Hou X.X., Fu Q., Li D.J. Trophoblast-derived CXCL16 induces M2 macrophage polarization that in turn inactivates NK cells at the maternal-fetal interface. *Cell. Mol. Immunol.*, 2018, Vol. 15, no. 12, pp. 1038-1046.
115. Wheeler K.C., Jena M.K., Pradhan B.S., Nayak N., Das S., Hsu C.D., Wheeler D.S., Chen K., Nayak N.R. VEGF may contribute to macrophage recruitment and M2 polarization in the decidua. *PLoS One*, 2018, Vol. 13, no. 1, e0191040. doi: 10.1371/journal.pone.0191040.
116. Wong K.L., Yeap W.H., Tai J.J., Ong S.M., Dang T.M., Wong S.C. The three human monocyte subsets: implications for health and disease. *Immunol. Res.*, 2012, Vol. 53, no. 1-3, pp. 41-57.
117. Wu J., He S., Song Z., Chen S., Lin X., Sun H., Zhou P., Peng Q., Du S., Zheng S., Liu X. Macrophage polarization states in atherosclerosis. *Front. Immunol.*, 2023, Vol. 14, 1185587. doi: 10.3389/fimmu.2023.1185587.
118. Wu M.F., Lin C.A., Yuan T.H., Yeh H.Y., Su S.F., Guo C.L., Chang G.C., Li K.C., Ho C.C., Chen H.W. The M1/M2 spectrum and plasticity of malignant pleural effusion-macrophage in advanced lung cancer. *Cancer Immunol. Immunother.*, 2021, Vol. 70, no. 5, pp. 1435-1450.
119. Wu Y., Kuang D.M., Pan W.D., Wan Y.L., Lao X.M., Wang D., Li X.F., Zheng L. Monocyte/macrophage-elicited natural killer cell dysfunction in hepatocellular carcinoma is mediated by CD48/2B4 interactions. *Hepatology*, 2013, Vol. 57, no. 3, pp. 1107-1116.
120. Wu Y., Tian Z., Wei H. Developmental and functional control of natural killer cells by cytokines. *Front. Immunol.*, 2017, Vol. 8, 930. doi: 10.3389/fimmu.2017.00930.
121. Wu Z.M., Yang H., Li M., Yeh C.C., Schatz F., Lockwood C.J., Di W., Huang S.J. Pro-inflammatory cytokine-stimulated first trimester decidual cells enhance macrophage-induced apoptosis of extravillous trophoblasts. *Placenta*, 2012, Vol. 33, no. 3, pp. 188-194.
122. Xia T., Zhang M., Lei W., Yang R., Fu S., Fan Z., Yang Y., Zhang T. Advances in the role of STAT3 in macrophage polarization. *Front. Immunol.*, 2023, Vol. 14, 1160719. doi: 10.3389/fimmu.2023.1160719.
123. Xu Y.Y., Wang S.C., Li D.J., Du M.R. Co-signaling molecules in maternal-fetal immunity. *Trends Mol. Med.*, 2017, Vol. 23, no. 1, pp. 46-58.
124. Yakupova E.I., Maleev G.V., Krivtsov A.V., Plotnikov E.Y. Macrophage polarization in hypoxia and ischemia/reperfusion: Insights into the role of energetic metabolism. *Exp. Biol. Med. (Maywood)*, 2022, Vol. 247, no. 11, pp. 958-971.
125. Yao Y., Xu X.H., Jin L. Macrophage polarization in physiological and pathological pregnancy. *Front. Immunol.*, 2019, Vol. 10, 792. doi: 10.3389/fimmu.2019.00792.
126. Yu S., Ge H., Li S., Qiu H.J. Modulation of macrophage polarization by viruses: turning off/on host antiviral responses. *Front. Microbiol.*, 2022, Vol. 13, 839585. doi: 10.3389/fmicb.2022.839585.
127. Zha Y., Liu H., Lin X., Yu L., Gao P., Li Y., Wu M., Gong X., Bian X., Kang Q., Zhi P., Dang X., Wang J., Feng L., Qiao F., Huang Y., Zeng W. Immune deviation in the decidua during term and preterm labor. *Front. Immunol.*, 2022, Vol. 13, 877314. doi: 10.3389/fimmu.2022.877314.
128. Zhang F., Wang H., Wang X., Jiang G., Liu H., Zhang G., Wang H., Fang R., Bu X., Cai S., Du J. TGF-beta induces M2-like macrophage polarization via SNAIL-mediated suppression of a pro-inflammatory phenotype. *Oncotarget*, 2016, Vol. 7, no. 32, pp. 52294-52306.
129. Zhang J., Le Gras S., Pouxvielh K., Faure F., Fallone L., Kern N., Moreews M., Mathieu A.L., Schneider R., Marliac Q., Jung M., Berton A., Hayek S., Vidalain P.O., Marçais A., Dodard G., Dejean A., Brossay L., Ghavi-

Helm Y., Walzer T. Sequential actions of EOMES and T-BET promote stepwise maturation of natural killer cells. *Nat. Commun.*, 2021, Vol. 12, no. 1, 5446. doi: 10.1038/s41467-021-25758-2.

130. Zhang J., Rousseaux N., Walzer T. Eomes and T-bet, a dynamic duo regulating NK cell differentiation. *Bioessays*, 2022, Vol. 44, no. 3, e2100281. doi: 10.1002/bies.202100281.

131. Zhang L., Mamillapalli R., Habata S., McAdow M., Taylor H.S. Myometrial-derived CXCL12 promotes lipopolysaccharide induced preterm labour by regulating macrophage migration, polarization and function in mice. *J. Cell. Mol. Med.*, 2022, Vol. 26, no. 9, pp. 2566-2578.

132. Zhang M., Cui D., Yang H. The distributional characteristics of M2 macrophages in the placental chorionic villi are altered among the term pregnant women with uncontrolled type 2 diabetes mellitus. *Front. Immunol.*, 2022, Vol. 13, 837391. doi: 10.3389/fimmu.2022.837391.

133. Zhang Q., Sioud M. Tumor-associated macrophage subsets: shaping polarization and targeting. *Int. J. Mol. Sci.*, 2023, Vol. 24, no. 8, 7493. doi: 10.3390/ijms24087493.

134. Zhang S., Ding J., Zhang Y., Liu S., Yang J., Yin T. Regulation and function of chemokines at the maternal-fetal interface. *Front. Cell Dev. Biol.*, 2022, Vol. 10, 826053. doi: 10.3389/fcell.2022.826053.

135. Zhang Y.H., Aldo P., You Y., Ding J., Kaislasuo J., Petersen J.F., Lokkegaard E., Peng G., Paidas M.J., Simpson S., Pal L., Guller S., Liu H., Liao A.H., Mor G. Trophoblast-secreted soluble-PD-L1 modulates macrophage polarization and function. *J. Leukoc. Biol.*, 2020, Vol. 108, no. 3, pp. 983-998.

136. Zhang Y.H., He M., Wang Y., Liao A.H. Modulators of the balance between M1 and M2 macrophages during pregnancy. *Front. Immunol.*, 2017, Vol. 8, 120. doi: 10.3389/fimmu.2017.00120.

137. Zwirner N.W., Ziblat A. Regulation of NK cell activation and effector functions by the IL-12 family of cytokines: the case of IL-27. *Front. Immunol.*, 2017, Vol. 8, 25. doi: 10.3389/fimmu.2017.00025.

Авторы:

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

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

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

Соколов Д.И. — д.б.н., профессор, заведующий лабораторией межклеточных взаимодействий, отдел иммунологии и межклеточных взаимодействий ФГБНУ «Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии имени Д.О. Отта»; профессор кафедры иммунологии ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Authors:

Zhguleva A.S., Assistant, Laboratory of Intercellular Interactions, Department of Immunology and Intercellular Interactions, D. Ott Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductology, St. Petersburg, Russian Federation

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

Selkov S.A., PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Department of Immunology and Intercellular Interactions, D. Ott Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductology; Professor, Department of Immunology, First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Sokolov D.I., PhD, MD (Biology), Professor, Head, Laboratory of Intercellular Interactions, Department of Immunology and Intercellular Interactions, D. Ott Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductology; Professor, Department of Immunology, First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Поступила 01.06.2023
Отправлена на доработку 04.10.2023
Принята к печати 23.11.2023

Received 01.06.2023
Revision received 04.10.2023
Accepted 23.11.2023

РОЛЬ НЕКАНОНИЧЕСКИХ Т-КЛЕТОК В ГОМЕОСТАЗЕ И ПАТОЛОГИИ

Топтыгина А.П.

ФБУН «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Г.Н. Габричевского» Роспотребнадзора, Москва, Россия
ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», Москва, Россия

Резюме. Помимо хорошо известных субпопуляций Т-лимфоцитов адаптивного иммунитета и лимфоцитов врожденного иммунитета (innate lymphoid cells) существует промежуточная группа лимфоцитов (innate-like cells), уже обладающая Т-клеточным рецептором, но с ограниченным репертуаром. В эту группу следует отнести $\gamma\delta$ Т-клетки, субпопуляции НКТ-клеток I и II типов, несущих как Т-рецептор, так и рецепторы НК-клеток и mucosal-associated invariant T (MAIT) клетки. Развитие innate-like cells происходит в тимусе, однако положительная и отрицательная селекция их проходит без участия эпителиальных клеток тимуса. Отличительной особенностью является то, что innate-like cells приобретают эффекторный фенотип уже в тимусе, поэтому не требуют сложных реакций активации при распознавании антигена. На момент выхода из тимуса неканонические Т-клетки экспрессируют хемокиновые рецепторы, позволяющие им мигрировать в барьерные ткани уже в раннем возрасте. Характерной особенностью Т-клеточного рецептора innate-like cells является распознавание непептидных антигенов, презентированных в неполиморфных молекулах тканевой совместимости (МНС-Ib). К этому типу молекул относятся молекулы CD1 a/b/c/d/e и молекула MR1. Эти молекулы презентуют липидные, гликолипидные антигены и метаболиты витаминов группы В, синтезируемые различными представителями микробиоты. Наличие функционально различных субпопуляций innate-like cells, имеющих активированный фенотип, позволяют им быстро реагировать на антиген продукцией цитокинов, типичных для Th1, Th2, Th17. Также они обладают цитотоксической и иммунорегуляторной активностью. Эти клетки активно вовлечены в регуляцию гомеостаза барьерных тканей и взаимодействие с микробиотой. Они синтезируют факторы роста для эпителиальных клеток, фибробластов, эндотелия сосудов, что необходимо для регенерации поврежденных тканей. Также они участвуют в противоинфекционной защите, направляя развитие иммунного ответа. Более того, они оказались участниками многих аутоиммунных заболеваний. Особенности функционирования innate-like cells делают их перспективной мишенью для терапевтических воздействий. Показано, что антибиотики, салицилаты и некоторые другие известные препараты оказывают влияние на innate-like cells. Различные варианты диеты также влияют на активность этих клеток.

Ключевые слова: $\gamma\delta$ Т-клетки, НКТ-клетки, MAIT-клетки, CD1-молекула, гомеостаз, микробиота, аутоиммунитет

Адрес для переписки:

Топтыгина Анна Павловна
ФБУН «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Г.Н. Габричевского» Роспотребнадзора
125212, Россия, Москва, ул. Адмирала Макарова, 10.
Тел.: 8 (495) 452-18-01.
Факс: 8 (495) 452-18-30.
E-mail: toptyginaanna@rambler.ru

Address for correspondence:

Anna P. Toptygina
G.N. Gabrichevsky Research Institute for Epidemiology and Microbiology
10 Admiral Makarov St
Moscow
125212 Russian Federation
Phone: +7 (495) 452-18-01.
Fax: +7 (495) 452-18-30.
E-mail: toptyginaanna@rambler.ru

Образец цитирования:

А.П. Топтыгина «Роль неканонических Т-клеток в гомеостазе и патологии» // Медицинская иммунология, 2024. Т. 26, № 3. С. 449-464.
doi: 10.15789/1563-0625-RON-2918

© Топтыгина А.П., 2024

Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

A.P. Toptygina "Role of non-canonical T cells in homeostasis and pathology", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2024, Vol. 26, no. 3, pp. 449-464.
doi: 10.15789/1563-0625-RON-2918

© Toptygina A.P., 2024

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

DOI: 10.15789/1563-0625-RON-2918

ROLE OF NON-CANONICAL T CELLS IN HOMEOSTASIS AND PATHOLOGY

Toptygina A.P.

G.N. Gabrichevsky Research Institute for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation
Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation

Abstract. In addition to the subsets of T lymphocytes and innate lymphocytes (innate lymphoid cells), the well-known players in adaptive immunity, there is an intermediate group of lymphocytes (innate-like cells) that already possess the T cell receptor, but with a restricted repertoire. This group includes $\gamma\delta$ T cells, subsets of type I and II NKT cells carrying both T cell receptor and NK-cell receptors, and mucosal-associated invariant T (MAIT) cells. The development of innate-like cells occurs in the thymus, but their positive and negative selection takes place without the participation of thymic epithelial cells. A distinctive feature is that innate-like cells acquire an effector phenotype already in the thymus, and therefore do not require complex activation reactions during antigen recognition. Upon exit from the thymus, noncanonical T cells express chemokine receptors, allowing them to migrate into barrier tissues at an early age. A characteristic feature of the T cell receptor innate-like cells is the recognition of non-peptide antigens presented in non-polymorphic histocompatibility molecules (MHC-Ib). This type of molecule includes the CD1 a/b/c/d/e molecule and the MR1 molecule. These molecules present lipid, glycolipid antigens and metabolites of B vitamins, synthesized by various representatives of the microbiota. The presence of functionally different subpopulations of innate-like cells with an activated phenotype allows them to quickly respond to the antigen by producing cytokines typical of Th1, Th2, Th17. They also exhibit cytotoxic and immunoregulatory activity. These cells are actively involved in regulation of barrier tissue homeostasis and interaction with microbiota. They synthesize growth factors for epithelial cells, fibroblasts, and vascular endothelium, which are required for regeneration of damaged tissues. They also participate in anti-infectious defense, directing the development of the immune response. Moreover, they have been found to be involved in many autoimmune diseases. The special functions of innate-like cells make them a promising target for therapeutic interventions. It has been shown that antibiotics, salicylates and some other well-known drugs exert certain effects on the innate-like cells. Different dietary options also affect the activity of these cells.

Keywords: $\gamma\delta$ T cells, NKT cells, MAIT cells, CD1-molecule, homeostasis, microbiota, autoimmunity

Введение

Помимо различных субпопуляций классических Т-лимфоцитов существуют также неканонические Т-клетки, включающие субпопуляции инвариантных Т-клеток, несущих также рецепторы натуральных киллеров (iNKT) или NKT I типа и отличающиеся от них NKT II типа, MR1-рестриктированные mucosal-associated invariant T (MAIT) клетки и $\gamma\delta$ T-клетки [35]. iNKT, MAIT и $\gamma\delta$ T-клетки экспрессируют ограниченный репертуар Т-клеточных рецепторов (TCR), которые рестриктируют спектр распознаваемых антигенов, что позволяет позиционировать эти клетки как промежуточные между врожденным и адаптивным иммунитетом (innate-like cells). Субпопуляции iNKT и NKT II типа способны распознавать своим TCR липидные и гликолипидные антигены, представленные не классическим главным комплексом тканевой совместимости (МНС), а молекулой CD1d, неполиморфной родственной

молекуле МНС I класса, относящейся к молекулам МНС Ib [7]. Молекула CD1d конститутивно экспрессируется дендритными клетками (DC), В-клетками, моноцитами и макрофагами, а также эпителиальными клетками [13]. При этом NKT-клетки II типа более многочисленны у людей, чем NKT-клетки I типа, и распознают иные типы липидных антигенов. $\gamma\delta$ T-клетки распознают антигены в комплексе CD1a/c/d [35]. MAIT-клетки экспрессируют инвариантную цепь TCR α и распознают консервативную молекулу МНС-related protein 1 (MR1), также относящуюся к МНС-Ib, представляющую бактериальные метаболиты, полученные в результате синтеза витаминов группы В [29]. Особенностью неканонических Т-клеток является наличие эффекторных функций уже на момент выхода из тимуса, включая синтез цитокинов и экспрессию рецепторов хемокинов, позволяющих им мигрировать в барьерные ткани уже в раннем возрасте [24, 63,

66]. В данном обзоре обсуждается формирование и функции неканонических Т-клеток в поддержании тканевого гомеостаза барьерных тканей, взаимодействие их с микробиотой, а также их участие в патологических процессах в организме.

γδТ-клетки

И у людей, и у мышей γδТ-клетки первыми развиваются в тимусе, но составляют 1-5% от циркулирующих Т-клеток. В процессе формирования по экспрессии CD44 и CD25 γδТ-клетки проходят следующие стадии: CD44⁺CD25⁻ дважды негативные (DN1), CD44⁺CD25⁺ (DN2), CD44⁻CD25⁺ (DN3), и CD44⁻CD25⁻ (DN4). У мышей реаранжировка γ- и β-цепей происходит практически одновременно на E12-E14. После проверки успешности этой перестройки формирующийся тимокит осуществляет выбор, будет ли он γδ или αβТ-клеткой. Выбор γδТ-клетки поддерживают транскрипционные факторы ICER и NURR1. У мышей направление последующей миграции сформировавшихся γδТ-клеток определяется γ-цепью. Первая волна эмиграции γδТ-клеток из тимуса происходит сразу за реаранжировкой δ-цепи на E14-E18, это клетки, несущие Vγ3-цепь, они мигрируют в эпидермис [40]. Вторая волна — непосредственно перед рождением (E20-E21), они несут Vγ4-цепь и мигрируют в матку и урогенитальный тракт. После рождения мигрируют клетки, несущие Vγ5-цепь — в кишечник и Vγ1,2 — в лимфоидные органы [16]. У человека первые γδТ-клетки выселяются из тимуса на 8,5-10 неделе внутриутробного развития. У людей чаще встречаются субпопуляции γδТ-клеток, несущих TCR Vγ9Vδ2 или Vδ1-цепь, соединенную с разными Vγ-цепями [42]. В процессе эволюции так сложилось, что в не перестроенной хромосоме гены δ-цепи находятся внутри участка α-цепи. Поэтому, если происходит реаранжировка α-цепи, то материал δ-цепи вырезается и такая клетка уже не сможет стать γδТ-клеткой. Показано, что TGFβ индуцирует экспрессию CD8αα в DN γδ-тимических предшественниках, подавляющее большинство зрелых γδТ-клеток экспрессируют гомодимер CD8αα [39].

Основная часть γδТ-клеток расположена в барьерных тканях [18]. γδТ-клетки являются частью крупной группы лимфоцитов, называемой интраэпителиальными лимфоцитами (IEL), составляющими 10% клеточного состава эпителия кишечника [77]. Для гомеостатической поддержки γδТ-клеткам необходим IL-15, который синтезируется окружающими эпителиальными клетками [43]. Для миграции в кожу γδТ-клетки перед выходом из тимуса начинают экспрессировать хемокиновый рецептор CCR10, который отвеча-

ет на хемокин CCL27, продуцируемый кератиноцитами, и рецептор CCR4 [48]. Для миграции в кишечник γδТ-клетки экспрессируют CCR9, отвечающий на CCL25 из эпителиальных клеток кишечника [76].

iNKT-клетки

Как и классические αβТ-клетки, iNKT-клетки формируются в тимусе. Особенность TCR iNKT в том, что он состоит из одной инвариантной α-цепи (Vα14-Jα18 у мышей или Vα24-Jα18 у человека) в сочетании с несколькими вариантами β-цепей (Vβ8, Vβ7 или Vβ2 у мышей и Vβ11 у людей), подходящими для взаимодействия с CD1d [10]. Для прохождения положительной селекции в тимусе эти клетки должны распознавать собственные липидные антигены в комплексе CD1d. Показано, что эти эндогенные антигены представляют собой α-галактозилцерамиды (α-GalCer) и α-глюкозилцерамиды (α-GluCer) [49]. Интересно, что для положительной селекции iNKT-клеток в тимусе не нужны кортикальные эпителиальные клетки тимуса. Презентацию этих гликолипидов в комплексе CD1d осуществляют дважды позитивные (DP) тимокиты. Иными словами формируется уникальный синапс из двух DP-тимокитов, где один презентует эндогенный гликолипид в комплексе CD1d, а другой распознает его с помощью своего TCR. В результате такого синапса генерируется также второй сигнал, за счет гомофильных рецепторов семейства signaling lymphocytic-activation molecule (SLAM): Slamf1 (SLAM) и Slamf6 (Ly108) [33]. Такой сигналинг опосредуется адаптерной молекулой SAP и киназами Src и Fyn, необходимыми для дифференцировки iNKT-клеток [34]. При этом TCR iNKT-клеток при распознавании эндогенных гликолипидов в комплексе CD1d генерирует более интенсивный сигнал, чем при положительной селекции классических Т-клеток, однако существует узкое «окно» сродства TCR-CD1d, которое направляет развитие iNKT-клеток, позволяя им избегать негативной селекции [6]. На стадии 0 DP-тимокит экспрессирует CD24, CD69, CCR7. Распознавание TCR iNKT-клеток эндогенных гликолипидов в комплексе CD1d, вовлечение Ca²⁺ и костимуляция Ly108 приводит к активации фактора транскрипции Egr-2 и затем транскрипционного фактора promyelocytic leukemia zinc finger (PLZF), который направляет формирование iNKT, [26]. В процессе формирования тимокиты, комитированные в сторону iNKT высоким уровнем экспрессии PLZF, теряют экспрессию CD69 и CD24 и экспрессируют CD4, это стадия 1 (CD24⁻CD69⁻CD44^{lo}). Часть этих клеток начинает экспрессировать рецептор IL-17RB, из них фор-

мируются iNKT2 и iNKT17, а из IL-17RB⁺ формируются iNKT1-клетки. На этой стадии развития важны сигналы суперсемейства фактора некроза опухоли CD40-L и RANK-L, предоставляемые медуллярными эпителиальными клетками тимуса (mTEC), после чего iNKT-клетки приобретают фенотип CD44^{hi} (стадия 2), подобный клеткам памяти у мышей [31]. На стадии 3 для окончательного формирования фенотипа iNKT1 необходим контакт с mTEC, которые предоставляют IL-15 и снижение экспрессии PLZF за счет связывания летальных микроРНК Let-7 с его промотором и влияния факторов транскрипции E2A и NF- κ B. Эти клетки приобретают экспрессию молекул, характерных для NK-клеток (NK1.1⁺, CD122^{hi}). В то же время для iNKT2 характерно сохранение достаточно высокой экспрессии PLZF, экспрессия лимфоидного энхансера LEF1 и транскрипционного фактора Id3. Для дифференцировки в iNKT17 важны сигналы через CD127 и включение пути PI3K и mTOR. Интересно, что iNKT1 и iNKT2 экспрессируют CD27, а iNKT17 – нет [31].

При стимуляции TCR эндогенными гликолипидами в комплексе CD1d iNKT-клетки активно продуцируют широкий спектр цитокинов [72], кроме того, они могут проявлять цитотоксические функции [9]. Хотя iNKT-клетки немногочисленны, они серьезно влияют на направление развития иммунных реакций. При этом можно выделить несколько субпопуляций, продуцирующих цитокины, сходные по спектру с различными субпопуляциями Т-хелперов. Так, iNKT1 экспрессируют T-bet и секретируют преимущественно IFN γ ; клетки iNKT2 экспрессируют высокие уровни GATA3 и PLZF и секретируют IL-4 и IL-13; iNKT17 имеют промежуточные уровни PLZF, являются RoR γ t⁺ и секретируют IL-17 [88]. Эти субпопуляции iNKT-клеток идентифицированы непосредственно в тимусе [61, 94].

Описаны также субпопуляции iNKTfH (фолликулярный хелпер), который экспрессирует Bcl-6 и оказывает помощь В-клеткам, продуцируя IL-21 [15] и iNKT10, которые экспрессируют E4BP4, не имеют PLZF и секретируют IL-10 [68]. Однако две последних субпопуляции не выявлены в тимусе и, вероятно, формируются при антигенной стимуляции на периферии в результате редифференцировки из других iNKT.

Помимо ранней продукции цитокинов, которая создает цитокиновую среду, направляющую дифференцировку классических Т-клеток, активированные эндогенными гликолипидами в комплексе CD1d iNKT экспрессируют CD40L, который стимулирует созревание DC, способствуя этим активации адаптивного иммунитета. Бла-

годаря этим функциям iNKT активно участвуют как во врожденных, так и приобретенных иммунных реакциях против различных патогенов [96].

NKT II типа

Этот тип клеток NKT, называемый типом II, использует относительно разнообразные цепи TCR α и TCR β и не реагирует на α -GalCer, но распознает различные липидные антигены в комплексе CD1d. Впервые наличие субпопуляции аутореактивных к гликолипидам собственных клеток NKT II типа было показано Jahng и соавт., когда обнаружили их реактивность к производному миелина гликолипидсульфатиду, представленному в контексте CD1d. Было продемонстрировано, что субпопуляция NKT-клеток II типа, реагирующих с сульфатидом, отличается от NKT-клеток I типа. При этом сульфатид, по-видимому, не является единственным аутоантигеном при положительной селекции в тимусе, рестриктирующим NKT II типа [46]. Клетки NKT II типа наивных мышей преимущественно используют V α 3/ сегменты гена TCR, V α 1-J α 7/J α 9 и V β 8.1/V β 3.1-J β 2.7 [4], что напоминает репертуар скорее классических Т-клеток, чем NKT I типа. Поскольку iNKT и NKT II типа распознают антиген в комплексе CD1d, возможна конкуренция за связывание с этой молекулой. Было продемонстрировано, что сульфатид может ингибировать загрузку α -GalCer на CD1d в DC *in vitro* и *in vivo* [50]. При распознавании комплекса CD1d-антиген NKT-TCR II типа, в отличие от NKT-TCR типа I, закрепляется над A'-карманом CD1d антипараллельным образом, напоминающим ситуацию с обычными Т-клетками. Показано, что PLZF и адаптерная молекула SAP играют решающую роль в развитии клеток NKT II типа, аналогично клеткам NKT I типа [112]. Клетки NKT I и NKT II типа различаются по уровню экспрессии рецепторов к цитокинам. Неясно, есть ли разделение на субпопуляции для NKT-клеток II типа аналогичное известному для NKT-клеток I типа. Показано, что экспрессия гена IL-12 β 1 в три раза выше в NKT-клетках I типа по сравнению с экспрессией в NKT-клетках II типа, тогда как экспрессия рецептора к другому провоспалительному цитокину, IL-18, представлена на одинаковых уровнях в обеих субпопуляциях клеток NKT [83]. Интересно, что экспрессия IL-2 γ (CD122) примерно одинакова, а экспрессия IL-2 α (CD25) в несколько раз выше в клетках NKT I типа. Рецепторы к другим основным провоспалительным цитокинам IL-1, IFN γ и IL-6 экспрессированы на низких уровнях на обеих субпопуляциях NKT. Однако вполне вероятно, что уровни экспрессии генов в состоянии покоя

могут отличаться от таковых при воспалительных состояниях. Клетки NKT I и II типов также различаются по экспрессии рецептора γ -ретиноевой кислоты (RAR γ), который экспрессируется в несколько раз выше в клетках I типа, чем в NKT II типа [71]. Соответственно, именно NKT-клетки I типа были ингибированы после стимуляции γ -агонистом RAR как *in vitro*, так и *in vivo*. Было показано, что клетки NKT типа I могут быть активированы либо непосредственно за счет стимуляции TCR, либо косвенно цитокинами (IL-12, IL-18 или IFN типа I), продуцируемыми за счет передачи сигналов, опосредованных Toll-подобными рецепторами (TLR) в DC [53]. Таким образом, NKT-клетки I типа могут быть активированы в отсутствие лигирования TCR. Напротив, стимуляция TCR, по-видимому, является основным путем активации NKT-клеток II типа.

По своим функциям NKT-клетки II типа являются субпопуляцией врожденных иммунорегуляторных Т-клеток: большая часть их функций состоит в ингибировании провоспалительных функций NKT-клеток I типа. Было показано, что лизофосфатидилхолин распознается как человеческими, так и мышинными NKT-клетками II типа. Лизофосфолипиды образуются в результате гидролиза фосфолипидов и обнаруживаются в высокой концентрации в местах воспаления [55]. Таким образом, даже в отсутствие внешних лигандов, которые присутствовали бы при инфекции, распознавание модифицированных аутологичных лигандов NKT-клетками II типа активируют их регуляторные функции при воспалении или аутоиммунной патологии. Показано, что два основных сфинголипида, которые накапливаются при болезни Гоше: β -глюкозилцерамид и глюкозилсфингозин распознаются NKT II типа клетками человека [75]. Кроме того, NKT-клетки II типа также могут оказывать влияние на В-клетки: хотя отсутствие NKT-клеток II типа не влияет на зрелый фенотип В-клеток, индуцированный квасцами адъювантный эффект на продукцию антител, зависящих от Т-клеток, нарушается [90]. Важно, что фосфатидилглицерин, дифосфатидилглицерин и фосфатидилинозитол из микроорганизмов, связанные с молекулами CD1d, стимулируют NKT-клетки II типа, например фосфатидилглицерин, из *Listeria monocytogenes* [106], т. е. эти клетки могут также распознавать и антигены патогенов.

MAIT-клетки

При созревании в тимусе MAIT-клетки формируют $\alpha\beta$ TCR, состоящий из инвариантной α -цепи V α 7.2-J α 33 (возможно J α 20 или J α 12) связанной с V β 2 или V β 13 β -цепей у человека и

V α 19-J α 33 и V β 6 или V β 8 у мыши [80]. Они взаимодействуют с относящейся к MHC класса I (MR1) молекулой, которая представляет лиганды, в основном, метаболиты производимые бактериями и дрожжами. Метаболиты, полученные из рибофлавина (витамина B2), после модификации (глиоксаль или метилглиоксаль) формируют молекулы основного антигена представляемые в комплексе MR1, тогда как метаболиты, полученные из витамина B9, связываются с MR1, но не активируют MAIT [54]. Кроме того, MR1 может представлять ряд немикробных лигандов [52, 54]. Для положительной селекции в тимусе MAIT-клеток необходим контакт DP-тимоцитов, экспрессирующих в комплексе MR1 пока неизвестный антиген. Также пока не установлено, подвергаются ли MAIT-клетки отрицательной селекции. Выделяют 3 стадии развития MAIT. На стадии 1 они экспрессируют CD24⁺CD44⁻, на второй стадии – CD24⁻CD44⁻, на стадии 3 – CD24⁻CD44⁺. На всех этапах важно распознавание комплекса MR1-антиген. Для развития MAIT важен транскрипционный фактор PLZF, экспрессия которого в клетках MAIT нарастает от отсутствия на 1-й стадии до высокой на 3-й стадии [57], тогда как для iNKT экспрессия этого фактора наивысшая на 1-й стадии и постепенно снижается к 3-й [88]. Для выделения клеток MAIT у людей используют маркеры V α 7.2⁺CD45RA⁺, CCR7⁺ и CD161⁺. При этом стадия 1 характеризуется экспрессией CD27⁻CD161⁻, стадия 2 – CD27⁺CD161⁻ и стадия 3 – CD27^{lo/+}CD161⁺ [57]. Клетки MAIT экспрессируют несколько цитокиновых рецепторов (IL-7R, IL-12R, IL-15R и IL-18R) и факторы транскрипции PLZF и ROR γ t [29, 57].

Описано по крайней мере 2 субпопуляции MAIT у мыши: основная субпопуляция экспрессирует ROR γ t и секретирует IL-17 при активации, а минорная субпопуляция экспрессирует T-bet и продуцирует IFN γ [57], что напоминает соответствующие субпопуляции iNKT1 и iNKT17. При этом субпопуляция, похожая на iNKT2, среди клеток MAIT не выявлена. У человека, напротив, основная субпопуляция MAIT коэкспрессирует ROR γ t и T-bet и продуцирует IFN γ и TNF [57]. При выходе из тимуса многие клетки MAIT экспрессируют CD8 $\alpha\beta$, тогда как на периферии большинство клеток MAIT экспрессируют CD8 $\alpha\alpha$, которые формируются из CD8 $\alpha\beta$ -предшественников [63]. В настоящее время неизвестно, что оказывает влияние на созревание клеток MAIT, необходимы ли стимулы через TCR или через цитокиновые рецепторы. Интересно, что количество клеток на периферии у мышей и людей находится в противоположном соотноше-

нии: у людей больше MAIT и меньше iNKT, а у мышей больше iNKT и меньше MAIT, при этом эти клетки конкурируют за одну и ту же нишу (барьерные ткани). При рождении ребенка в крови мало MAIT, но по мере заселения слизистых микрофлорой, количество клеток MAIT растет примерно до 30 лет, а потом начинает снижаться. Контакт с микрофлорой критически важен для постнатического развития и экспансии клеток MAIT [57].

Роль innate-like cells в поддержании гомеостаза

Контакт с микробиотой регулирует и балансирует развитие iNKT и MAIT клеток в барьерных тканях. Показано, что у безмикробных мышей (GF) iNKT накапливаются в собственной пластинке толстой кишки и легких GF мышей из-за повышенной экспрессии хемокина CXCL16 эпителиальными клетками, усугубляя воспаление толстой кишки и аллергические реакции дыхательных путей. Было выявлено, что ген *Cxcl16* гиперметилирован в отсутствие комменсалов, а колонизация новорожденных GF мышей уменьшает метилирование ДНК, прекращая выработку CXCL16 и предотвращая последующее привлечение клеток iNKT [78]. Нормальная микробиота кишечника содержит микроорганизмы, продуцирующие гликолипиды, способные как активировать iNKT, так и тормозить их функции за счет гликолипидов других микробов, являющихся антагонистами, поэтому активность этих клеток зависит от состава микробиоты [98]. Так, бактерии *Sphingomonas spp.* содержат гликосфинголипиды клеточной стенки, которые стимулируют клетки iNKT CD1d-зависимым образом, и колонизация этими бактериями GF мышей рестриктирует активность iNKT, тогда как *Escherichia coli*, у которых отсутствуют агонистические гликосфинголипиды не оказывает такого действия [104]. Интересно, что *B. fragilis* ингибирует активность iNKT за счет своих ингибирующих сфинголипидов, которые блокируют связывание CD1d с эндогенными сфинголипидами. Этот эффект проявляется локально в толстой кишке, но не в легких, где нет *B. fragilis*, и защищает мышей от индуцированного оксазолоном колита в более позднем возрасте, который усугубляется цитокинами, производными iNKT. Однако отсроченная колонизация взрослых GF-мышей не полностью ограничивает гиперактивность iNKT, что свидетельствует о необходимости ранних контактов этих клеток с микробиотой [2]. Более того, оказалось, что *B. fragilis*, за счет своего капсульного полисахарида А, при колонизации GF-мышей увеличивает в тимусе новорожденных мышат ча-

стоту и количество PLZF⁺ innate-like $\alpha\beta$ T-клеток и PLZF⁺ innate lymphoid cells (TCR β -TCR $\gamma\delta$) [27].

Для клеток MAIT контакт с микробиотой еще более критичен, эти клетки у GF мышей останавливаются в своем развитии на промежуточном этапе в тимусе. При отсроченном заселении микробиоты или введении метаболитов рибофлавина у взрослых GF-мышей восстанавливается развитие MAIT в тимусе, но этого недостаточно для заселения периферии. На момент рождения у человека мало MAIT и они не активированы, но в течение первых двух недель жизни сразу вслед за первоначальной колонизацией кишечника факультативными анаэробами, такими как *Enterobacteriaceae spp.*, многие из которых синтезируют рибофлавин, наблюдается резкое увеличение количества MAIT и приобретение ими активированного эффекторного фенотипа. Показано, что у женщин в последнем триместре беременности повышается представленность этого семейства в микробиоте, и они колонизируют ребенка в момент рождения [93].

Контакт с микробиотой $\gamma\delta$ T-клеток не оказывает влияния на их количество среди IEL, однако в *lamina propria* количество $\gamma\delta$ T-клеток снижено у GF-мышей. Показано, что контакт с микробиотой особенно важен для субпопуляции $\gamma\delta$ T17, продуцирующей IL-17, как в ротовой полости, так и в кишечнике, но не в матке или мозговых оболочках [103]. Аналогично у GF-мышей количество $\gamma\delta$ T-клеток в коже не отличается от wt-мышей, но при этом снижен уровень $\gamma\delta$ T17. Показано, что *Corynebacterium spp.*, колонизирующие кожу, стимулируют $\gamma\delta$ T17, несущие V γ 4-цепь [19].

Кишечные $\gamma\delta$ T-IEL активно мигрируют через эпителий с помощью окклюдин-опосредованных межклеточных контактов. $\gamma\delta$ T-IEL поддерживают пролиферацию энтероцитов и целостность слизистой кишечника. У нокаутных мышей, не имеющих $\gamma\delta$ T-IEL, наблюдается повышенная проницаемость кишечника [23]. В реализации этих функций задействованы молекулы $\gamma\delta$ T-IEL CD100 (семафорин) и JAML (junctional adhesion molecule-like protein), которая связывает лиганд CAR (Coxsackie and adenovirus receptor), экспрессированный эпителиальными клетками кишечника, что приводит к продукции фактора роста кератиноцитов (KGF)-1. Показано, что именно $\gamma\delta$ T-IEL, но не $\alpha\beta$ T-IEL продуцируют KGF-1 при активации [47].

Выявлено, что существует конкуренция в заселении барьерных тканей между iNKT, $\gamma\delta$ T-клетками и MAIT. В коже мышей преобладают $\gamma\delta$ T-клетки, а у TCR δ ^{-/-} кожу заселяют iNKT и MAIT клетки, в то же время недостаток iNKT у

CD1d дефицитных мышей не влияет на количество MAIT и $\gamma\delta$ T-клеток [20]. Обнаружено, что у мышей с дефицитом микроРНК miR-181a и miR-181b, необходимых для развития iNKT, наблюдается значительное снижение количества клеток iNKT и соответствующее увеличение $\gamma\delta$ T-клеток в печени, где обычно доминируют iNKT. При этом в тимусе или лимфоузлах не происходит компенсаторного расширения популяции $\gamma\delta$ T-клеток [87]. В то же время у CD1d дефицитных мышей на фоне дефицита iNKT компенсаторно увеличивается количество MAIT [56].

Расположение неканонических Т-клеток преимущественно в барьерных тканях делает их крайне важными участниками процессов поддержания и восстановления тканевого гомеостаза. Такое свойство может быть объяснено способностью неканонических Т-клеток быстро реагировать не только на определенные лиганды, но и на алармины, такие как IL-18 или IL-33, которые секретируются в контексте повреждения тканей [81]. Кроме того, неканонические Т-клетки распознают и другие молекулярные сигналы повреждения тканей. Так, кератиноциты вокруг кожной раны выделяют бутирофилиноподобные белки (Skint), распознаваемые $\gamma\delta$ T-клетками, которые синтезируют фактор роста фибробластов (FGF) и инсулиноподобный фактор роста-1, необходимые для регенерации и поддержания гомеостаза как эпителиальных клеток, так и самих $\gamma\delta$ T-клеток [47]. Тогда как миграция в кожу $V\gamma 4^+$ T-клеток способствует восстановлению кожи за счет секреции KGF-1,2 и FGF-9, который индуцирует неогенез волосяных фолликулов [3]. Кроме того $\gamma\delta$ T17 за счет продукции IL-17A индуцируют пролиферацию и дифференцировку кератиноцитов, усиливают гликолиз в эпителиальных клетках, способствуя миграции их к краю раны [101]. Для заживления кожной раны важна активация на $\gamma\delta$ T-клетках костимулирующих молекул JAML, CD100 и NKG2D. Связывание JAML с его лигандом CAR приводит к пролиферации и активации $\gamma\delta$ T-клеток и продукции ими KGF-1. Аналогичный эффект оказывает взаимодействие NKG2D с его лигандом H60с, а взаимодействие CD100 с лигандом PlexinB приводит к округлению и миграции $\gamma\delta$ T-клеток к краю раны [105, 107].

Показано, что IL-17A из $V\gamma 4^+$ T-клеток стимулирует пролиферацию мезенхимальных клеток и их дифференцировку в остеобласты при переломе костей, пролиферацию мышечных стволовых клеток при травме мышц [70]. В процессе гриппозной инфекции $\gamma\delta$ T-клетки в легких продуцируют IL-17A, который способствует высвобождению IL-33. Этот цитокин усиливает продукцию

амфирегулина лимфоцитами врожденного иммунитета 2-го типа, который способствует репарации эпителия [37].

В отличие от $\gamma\delta$ T-клеток, MAIT располагаются вдоль базальной мембраны, как в коже, так и в кишечнике. Известно, что базальная мембрана служит каркасом для миграции клеток-предшественников для заживления раны, поэтому такое расположение клеток MAIT весьма удобно для регуляции процессов восстановления. Действительно, клетки MAIT экспрессируют транскрипционные сигнатуры, необходимые для репарации. Лигирование TCR приводит к экспрессии FGF-9, фактора роста сосудов (VEGF) и фактора роста тромбоцитов (PDGF). Однако провоспалительная цитокиновая среда (IL-12, IL-15, IL-18 и факторы семейства TNF) может переключить MAIT с репаративной функции на синтез эффекторных цитокинов [64].

Клетки iNKT широко представлены в печени. В течение 8 часов после травмы iNKT печени накапливаются вокруг зоны поражения, где они распознают эндогенные лиганды, представленные CD1d. Активированные клетки iNKT2 высвобождают IL-4, который индуцирует пролиферацию гепатоцитов и дифференцировку моноцитов, что приводит к ускоренному заживлению ран [65]. Кроме того, IL-4 из iNKT2 способствует регенерации тимуса после облучения. IL-4 стимулирует TEC к выделению хемокина CCL11 и рекрутирования CCR3⁺ эозинофилов, которые способствуют восстановлению клеточности тимуса. В отсутствие iNKT TEC не восстанавливаются, что препятствует дальнейшему созреванию Т-лимфоцитов [21].

Модуляция innate-like cells

Применение антибиотиков в неонатальном возрасте у мышей повышает восприимчивость таких мышей впоследствии к экспериментальному колиту и псориазу за счет увеличения субпопуляций $\gamma\delta$ T17 и $\gamma\delta$ T22, тогда как введение антибиотиков взрослым мышам снижает воспаление в моделях псориаза и муковисцидоза за счет элиминации бактерий, поддерживающих $\gamma\delta$ T17 [5, 109]. Антибиотики широкого спектра действия увеличивают количество клеток iNKT толстой кишки у взрослых мышей и утяжеляют течение экспериментального колита [11]. Хотя для развития MAIT требуются микробные метаболиты, нет данных о влиянии антибиотиков на эти клетки. Показано, что сульфаниламиды способны связывать CD1d и активировать NKT-клетки типа II и конкурировать с α -GalCer за связывание с CD1d, необходимое для iNKT [1]. Обнаружено, что метаболиты салицилата и диклофенака могут из-

менять экспрессию MR1 и подавлять активность клеток MAIT [52].

Диета может модулировать активность innate-like cells как непосредственно, поставляя антигены, так и за счет ремоделирования состава микробиоты и ее метаболитов. Так, западная диета, богатая жирами, белками и углеводами, индуцирует $\gamma\delta$ T17, способствуя предрасположенности к псориатическому артриту и воспалительным заболеваниям. Аналогичное действие оказывала кетогенная диета, тогда как богатая углеводами диета, напротив, снижает активность $\gamma\delta$ T17 [36, 91]. На активность iNKT влияет микробный синтез α -GalCer, западная диета значительно его снижает [98]. Воздействие производного индола — оксазола через арилгидрокарбоновый рецептор подавляет CD1d зависимый синтез IL-10, что приводит к активации iNKT, а употребление пищевых волокон и, в частности, бутират ингибируют активность iNKT [62]. Более того, при воздействии пальмитата или ингибитора mTOR рапамицина индуцируется регуляторный фенотип iNKT [44]. Диета с высоким содержанием жиров снижает уровень MAIT в крови, кишечнике и жировой ткани, оставшиеся клетки продуцируют IL-17A. Показано, что эти клетки повышены при диабете II типа и ожирении [95].

Роль innate-like cells в противоинфекционном иммунитете

$\gamma\delta$ T-IEL продуцируют антимикробные пептиды, такие как RegIII α /RegIII γ , атакующие Грам⁺ бактерии, которые могут повреждать кишечный эпителий [45]. В профилях транскрипции $\gamma\delta$ T-IEL выявлена высокая экспрессия гранзимов A и B, что говорит об их цитотоксическом потенциале в отношении патогенов. Показано, что именно $\gamma\delta$ -, но не $\alpha\beta$ -нокаутные мыши повышенно чувствительны к инфекции [28]. Обнаружено, что при активации $\gamma\delta$ T-IEL 22 из 50 активных генов связаны с противовирусной защитой, что говорит об участии $\gamma\delta$ T-IEL в защите от вирусов эпителиальных клеток [92]. $\gamma\delta$ T-клетки кожи способны продуцировать антимикробные пептиды в ответ на инфицирование, а также привлекают в кожу нейтрофилы для фагоцитирования золотистого стафилококка [69].

Распознавание патогенов iNKT может происходить с помощью трех основных механизмов. Во-первых, iNKT могут непосредственно распознавать гликолипидные антигены патогенов в комплексе CD1d, например, *B. burgdorferi* экспрессирует такой гликолипид, *Streptococcus pneumoniae* экспрессирует α -диацилглицерин, также распознаваемый iNKT (cognate TCR activation) [53]. Было показано, что TCR iNKT клетки инду-

цирует конформационные изменения и CD1d, и бактериального гликолипида, что позволяет инвариантному TCR распознавать разные антигены в неполиморфной CD1d [108]. Во-вторых, iNKT могут быть активированы в результате распознавания TCR аутологичного гликолипида из поврежденных патогенных клеток хозяина и одновременной стимуляции через IL-12 и IL-18, синтезируемые зрелыми DC [97]. Так, было показано, что при инфицировании *S. typhimurium* iNKT секретируют IFN γ , хотя эта бактерия не имеет гликолипидного антигена, зато она имеет липополисахарид, который стимулирует DC продуцировать IL-12. При этом необходима также слабая стимуляция TCR. В-третьих, iNKT могут быть активированы без связывания TCR, только за счет стимуляции цитокинами IL-12, IL-18, IFN α (bystander activation) [53]. Показано, что на раннем этапе мышинной цитомегаловирусной инфекции iNKT продуцируют IFN γ , и эта продукция не зависит от сигналинга через TCR [102].

Среди субпопуляций iNKT идентифицируют также iNKTfh, способные оказывать помощь В-клеткам зародышевых центров за счет продукции IL-4 и IL-21, они способны индуцировать развитие зародышевых центров и продукцию зрелых IgG1-антител. Для активации iNKTfh необходима стимуляция через TCR-CD1d взаимодействие и IL-18 из CD169⁺ макрофагов. Показана активация транскриптомных сигнатур IL-4 в iNKTfh, а не в классических Tfh в лимфоузлах макака, инфицированных вирусом Зика [32].

Клетки iNKT за счет наличия у них цитотоксического потенциала способны убивать провоспалительные антигенпрезентирующие клетки, модулируя воспаление. Так, при инфицировании мышей высокопатогенным штаммом гриппа A iNKT снижают воспалительную активность моноцитов в легких, что проявлялось в уменьшении повреждения ткани и улучшении выживаемости животных без влияния на вирусную нагрузку. Противовоспалительная активность iNKT напрямую зависит от лигирования их TCR [58].

NKT-клетки II типа тоже способны распознавать антигены патогенов, например, фосфатидилглицерин, из *Listeria monocytogenes* [106].

MAIT могут быть активированы и помимо лигирования их TCR, за счет провоспалительных цитокинов IL-12, IL-18 и IL-23, продуцируемых зрелыми DC [111]. Разные цитокины индуцируют разные фенотипы MAIT. Они могут продуцировать IFN γ или IL-17 [60]. Показано, что MAIT играют ключевую роль в защите от гриппа за счет активации через IL-18 [67], и даже при паразитарных инфекциях [51]. При вирусном гепатите

В МАИТ играют важную роль как продуценты $IFN\gamma$, а также проявляют цитотоксические функции, секретируя гранзим В. При хроническом гепатите В и С МАИТ сильно угнетены, они экспрессируют высокий уровень PD-1, но уже через 4 недели противовирусной терапии их уровень поднимается, по мере разрешения воспаления в печени [111].

Участие innate-like cells в патологических процессах

Начиная с середины XX века отмечается повышение частоты встречаемости аутоиммунных и воспалительных заболеваний, что не может быть связано исключительно с генетическими факторами. В то же время большинство потенциальных факторов риска окружающей среды могут влиять на состав микробиоты.

На мышинной модели рассеянного склероза (РС) — экспериментальном аутоиммунном энцефаломиелите (ЭАЭ) — было показано, что МАИТ ингибируют развитие ЭАЭ, а у нокаутных мышей $Mrl^{-/-}$, напротив, заболевание протекает тяжелее [22]. В то же время у пациентов с РС уровень МАИТ в крови обратно коррелировал с тяжестью обострения, а на фоне ремиссии возрастал [74]. При этом в очагах поражения ЦНС МАИТ накапливались, также они были повышены в спинномозговой жидкости пациентов. Однако нет точных доказательств, оказывают ли эти клетки патогенетическое или защитное воздействие, поскольку пока неясен их фенотип: про- или противовоспалительный [86]. Также было показано накопление NKT-клеток II типа в ткани ЦНС при ЭАЭ, тогда как NKT-клетки I типа, хоть и присутствовали в ЦНС, но не накапливались при заболевании. При этом функция NKT-клеток II типа при ЭАЭ заключалась в ингибировании функций $CD4^{+}T$ -клеток, реагирующих с миелином [46]. iNKT, активированные α -GalCer, также способствовали контролю ЭАЭ за счет продукции IL-4 [79].

При целиакии (энтеропатия, вызванная нарушением метаболизма глютена) показано снижение МАИТ в крови, кишечном эпителии и *lamina propria* по сравнению со здоровыми, независимо от того, находится ли больной на безглютеновой диете или нет [25]. Показано, что у таких пациентов $\gamma\delta T$ -IEL, несущие рецептор NKG2A, подавляют выделение $IFN\gamma$ и гранзима В из $\alpha\beta T$ -IEL за счет продукции TGF- β [8]. В то же время недостаток экспрессии на эпителиальных клетках кишечника бутирофилиноподобных молекул BTNL8 приводит к потере $V\gamma 4^{+}V\delta 1^{+}IEL$, которые способствуют тканевому гомеостазу и увеличению субпопуляции IEL, несущих мотив H-J1

CDR3 γ и производящих много $IFN\gamma$. Безглютеновая диета восстанавливает экспрессию BTNL8, но этого недостаточно для восстановления субпопуляционного состава $\gamma\delta T$ -клеток [73].

При воспалительных заболеваниях кишечника также выявлено снижение МАИТ в крови, а в пораженной слизистой кишечника они накапливаются. При этом они демонстрируют фенотип $NKG2D^{hi}BTLA^{+}CD69^{+}$, что свидетельствует о хроническом состоянии активации и прямо коррелирует с уровнем IL-18 [89]. При этом на мышинной модели экспериментального колита показана протективная роль МАИТ, что свидетельствует о необходимости более детального изучения роли МАИТ при этих заболеваниях [85]. У пациентов с болезнью Крона iNKT из *lamina propria* продуцируют IL-10, подавляя активность аутоспецифичных $CD4^{+}T$ -клеток [59]. С другой стороны, активация NKT-клеток II типа на мышинной модели приводит к спонтанному формированию колита, а у людей показано, что NKT-клетки II типа из *lamina propria* при язвенном колите играют провоспалительную, колитогенную роль [30].

При ревматоидных заболеваниях, таких как системная красная волчанка, анкилозирующий спондилит и ревматоидный артрит, количество МАИТ в крови пациентов снижено. При этом наблюдается накопление клеток МАИТ в синовиальной жидкости и повышенная экспрессия на них CD69 и продукция IL-17 на фоне повышенной продукции IL-6, IL-18, $IFN\gamma$. Полагают, что снижение МАИТ может быть связано с апоптозом хронически гиперактивированных МАИТ [17]. При этом NKT-клетки II типа демонстрируют двоякую активность: как патогенетически значимых, продуцирующих $IFN\gamma$, либо как протективных, синтезирующих IL-4 [110].

У больных с синдромом Шегрена наблюдается снижение МАИТ в крови и присутствие их в слюнных железах пациентов. Эти клетки активно продуцируют IL-17 по действиям участвующих в патогенезе заболевания IL-7 и IL-23 [100].

Показано, что уничтожение микробиоты с помощью антибиотиков в неонатальный период приводит к более тяжелому течению экспериментального псориаза у взрослых мышей за счет увеличения продуцирующих IL-22 $V\gamma 4^{+}\gamma\delta T$ -клеток, тогда как лечение антибиотиками взрослых мышей, напротив, снижает частоту IL-22 $^{+}V\gamma 4^{+}\gamma\delta T$ -клеток и облегчает заболевание [109]. Это подтверждает мысль о том, что взаимодействие innate-like cells с микробиотой в неонатальном периоде оказывает судьбоносное и долговременное влияние на заселение барьерных тканей и

специализацию субпопуляций неканонических Т-клеток.

У больных с бронхиальной астмой показано снижение клеток МАИТ в крови и бронхо-альвеолярном лаваже, однако это исследование проводили на фоне ингаляционных глюкокортикоидов, что не исключает медикаментозного влияния на уровень этих клеток [41].

При диабете 1-го типа обнаружено снижение МАИТ в крови пациентов и экспрессия на них CD25 и PD-1, что, возможно, связано с накоплением этих клеток в ткани поджелудочной железы. Эти клетки продуцируют высокий уровень IL-17A и TNF и экспрессируют высокий уровень гранзимов. На мышинной модели были показаны протективные свойства МАИТ, защищающих кишечник и тормозящих прогрессирование диабета 1-го типа [84]. Регуляторная роль iNKT на модели диабета у мышей без ожирения (NOD) проявляется в индукции толерогенного фенотипа антигенпрезентирующих клеток [99]. Также показано увеличение NKT-клеток II типа в поджелудочной железе, где они оказывают протективное влияние на модели диабета у NOD мышей [46].

При метаболическом синдроме и диабете 2-го типа также наблюдается снижение МАИТ в крови пациентов. Эти клетки экспрессируют активированный фенотип (CD25⁺ и PD-1⁺) и продуцируют высокий уровень IL-17 [14]. Клетки iNKT способствуют поляризации макрофагов в фенотип M2, секретируя IL-4 IL-10 [59]. Активация NKT-клеток II типа при метаболическом синдроме ускоряет потерю веса и стабилизирует гомеостаз глюкозы [38].

Клетки МАИТ обильно представлены в печени. При алкогольном повреждении печени, жировом гепатозе, склерозирующем холангите и билиарном циррозе наблюдается снижение МАИТ в крови, и эти клетки демонстрируют фенотип CD69⁺HLADR⁺ и оверэкспрессию CXCR3

и CX3CR1 [82]. NKT-клетки I типа активируют воспалительные реакции в печени при различных механизмах повреждения, тогда как активация NKT-клеток II типа, напротив, приводит к снижению активности заболевания как при алкоголь-индуцированном повреждении печени, так и при асептическом воспалении [71].

Таким образом, неканонические Т-клетки способны распознавать непептидные антигены как микробного происхождения, так и аутоантигены, представленные в неполиморфных молекулах МНС Ib. Это позволяет им реагировать на присутствие патогенов, контролировать наличие и состав нормобиоты, а также выявлять повреждение собственных тканей, включая в них ту или иную программу гомеостаза или защиты. При поверхностном взгляде может сложиться картина избыточности перекрывающихся функций неканонических Т-клеток и конкуренции за молекулы CD1. Однако различия в их TCR определяют их способ распознавания и контроля ситуации в организме. Так, МАИТ идентифицируют метаболиты витаминов группы В, производимые многими представителями нормобиоты, но не патогенами. Баланс этих метаболитов говорит о контроле ситуации нормобиота/патогена и включает те или иные функции МАИТ. NKT типа I и II балансируют провоспалительные, защитные и противовоспалительные, репаративные механизмы, распознавая липопротеины микроорганизмов и собственных разрушенных клеток соответственно. $\gamma\delta$ T широко представлены в барьерных тканях, составляя большую часть IEL, однако до сих пор недостаточно охарактеризованы их антигены, хотя известно, что они распознают молекулы, представленные в CD1a/c/d. Они поддерживают гомеостаз и целостность эпителиального барьера за счет секреции цитокинов и факторов роста.

Список литературы / References

1. Almeida C.F., Smith D.G.M., Cheng T.Y., Harpur C.M., Batleska E., Nguyen-Robertson C.V., Nguyen T., Thelemann T., Reddiex S.J.J., Li S., Eckle S.B.G., van Rhijn I., Rossjohn J., Uldrich A.P., Moody D.B., Williams S.J., Pellicci D.G., Godfrey D.I. Benzofuran sulfonates and small self-lipid antigens activate type II NKT cells via CD1d. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 2021, Vol. 118, no. 34, e2104420118. doi: 10.1073/pnas.2104420118.
2. An D., Oh S.F., Olszak T., Neves J.F., Avci F.Y., Erturk-Hasdemir D., Lu X., Zeissig S., Blumberg R.S., Kasper D.L. Sphingolipids from a symbiotic microbe regulate homeostasis of host intestinal natural killer T cells. *Cell*. 2014, Vol. 156, no. 1-2, pp. 123-133. doi: 10.1016/j.cell.2013.11.042.
3. Anderson L.S., Yu S., Rivara K.R., Reynolds M.B., Hernandez A.A., Wu X., Yang H.Y., Isseroff R.R., Miller L.S., Hwang S.T., Simon S.I. CCR6(+) gammadelta T cells home to skin wounds and restore normal wound healing in CCR6-deficient mice. *J. Invest. Dermatol.*, 2019, Vol. 139, no. 9, pp. 2061-2064.e2.

4. Arrenberg P., Halder R., Dai Y., Maricic I., Kumar V. Oligoclonality and innate-like features in the TCR repertoire of type II NKT cells reactive to a beta-linked self-glycolipid. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 2010, Vol. 107, pp. 10984-10989.
5. Bazett M., Bergeron M.E., Haston C.K. Streptomycin treatment alters the intestinal microbiome, pulmonary T cell profile and airway hyperresponsiveness in a cystic fibrosis mouse model. *Sci. Rep.*, 2016, Vol. 6, 19189. doi: 10.1038/srep19189.
6. Bedel R., Berry R., Mallevaey T., Matsuda J.L., Zhang J., Godfrey D.I., Rossjohn J., Kappler J.W., Marrack P., Gapin L. Effective functional maturation of invariant natural killer T cells is constrained by negative selection and T-cell antigen receptor affinity. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 2014, Vol. 111, pp. E119-E128.
7. Bendelac A., Savage P.B., Teyton L. The biology of NKT cells. *Annu Rev. Immunol.*, 2007, Vol. 25, pp. 297-336.
8. Bhagat G., Naiyer A.J., Shah J.G., Harper J., Jabri D., Wang T.C., Green P.H.R., Manavalan J.S. Small intestinal CD8⁺TCR γ delta⁺NKG2A⁺ intraepithelial lymphocytes have attributes of regulatory cells in patients with celiac disease. *J. Clin. Invest.*, 2008, Vol. 118, pp. 281-293.
9. Brennan P.J., Brigl M., Brenner M.B. Invariant natural killer T cells: an innate activation scheme linked to diverse effector functions. *Nat. Rev. Immunol.*, 2013, Vol. 13, pp. 101-117.
10. Brigl M., Brenner M.B. CD1: antigen presentation and T cell function. *Annu Rev. Immunol.*, 2004, Vol. 22, pp. 817-890.
11. Burrello C., Garavaglia F., Cribiu F.M., Ercoli G., Bosari S., Caprioli F., Facciotti F. Short-term oral antibiotics treatment promotes inflammatory activation of colonic invariant natural killer T and conventional CD4(+) T Cells. *Front. Med.*, 2018, Vol. 5, 21. doi: 10.3389/fmed.2018.00021.
12. Burrello C., Strati F., Lattanzi G., Diaz-Basabe A., Mileti E., Giuffrè M.R., Lopez G., Cribiù F.M., Trombetta E., Kallikourdis M., Cremonesi M., Conforti F., Botti F., Porretti L., Rescigno M., Vecchi M., Fantini M. C., Caprioli F., Facciotti F. IL-10 secretion endows intestinal human iNKT cells with regulatory functions towards pathogenic T lymphocytes. *J. Crohns Colitis*, 2022, Vol. 16, no. 9, pp. 1461-1474.
13. Canchis P.W., Bhan A.K., Landau S.B., Yang L., Balk S.P., Blumberg R.S. Tissue distribution of the non-polymorphic major histocompatibility complex class I-like molecule, CD1d. *Immunology*, 1993, Vol. 80, no. 4, pp. 561-565.
14. Carolan E., Tobin L.M., Mangan B.A., Corrigan M., Gaoatswe G., Byrne G., Geoghegan J., Cody D., O'Connell J., Winter D.C., Doherty D.G., Lynch L., O'Shea D., Hogan A.E. Altered distribution and increased IL-17 production by mucosal-associated invariant T cells in adult and childhood obesity. *J. Immunol.*, 2015, Vol. 194, no. 12, pp. 5775-5780.
15. Chang P.P., Barral P., Fitch J., Pratama A., Ma C.S., Kallies A., Hogan J.J., Cerundolo V., Tangye S.G., Bittman R., Nutt S.L., Brink R., Godfrey D.I., Batista F.D., Vinuesa C.G. Identification of Bcl-6-dependent follicular helper NKT cells that provide cognate help for B cell responses. *Nat. Immunol.*, 2012, Vol. 13, pp. 35-43.
16. Cheroutre H., Lambolez F. The thymus chapter in the life of gut-specific intra epithelial lymphocytes. *Curr. Opin. Immunol.*, 2008, Vol. 20, pp. 18-191.
17. Chiba A., Tamura N., Yoshikiyo K., Murayama G., Kitagaichi M., Yamaji K., Takasaki Y., Miyake S. Activation status of mucosal-associated invariant T cells reflects disease activity and pathology of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res. Ther.*, 2017, Vol. 19, no. 1, 58. doi: 10.1186/s13075-017-1257-5.
18. Chien Y.H., Meyer C., Bonneville M. γ delta T cells: first line of defense and beyond. *Annu Rev. Immunol.*, 2014, Vol. 32, pp. 121-155.
19. Chodaczek G., Papanna V., Zal M.A., Zal T. Body-barrier surveillance by epidermal γ delta TCRs. *Nat. Immunol.*, 2012, Vol. 13, no. 3, pp. 272-282.
20. Constantinides M.G., Belkaid Y. Early-life imprinting of unconventional T cells and tissue homeostasis. *Science*, 2021, Vol. 374, no. 6573, eabf0095. doi: 10.1126/science.abf0095.
21. Cosway E.J., White A.J., Parnell S.M., Schweighoffer E., Jolin H.E., Bacon A., Rodewald H.R., Tybulewicz V., McKenzie A.N.J., Jenkinson W.E., Anderson G. Eosinophils are an essential element of a type 2 immune axis that controls thymus regeneration. *Sci. Immunol.*, 2022, Vol. 7, no. 69, eabn3286. doi: 10.1126/sciimmunol.abn3286.
22. Croxford J.L., Miyake S., Huang Y.-Y., Shimamura M., Yamamura T. Invariant V (alpha)19i T cells regulate autoimmune inflammation. *Nat. Immunol.*, 2006, Vol. 7, pp. 987-994.
23. Dalton J.E., Cruickshank S.M., Egan C.E., Mears R., Newton D.J., Andrew E.M., Lawrence B., Howell G., Else K.J., Gubbels M.-J., Striepen B., Smith J.E., White S.J., Carding S.R. Intraepithelial γ delta⁺ lymphocytes maintain the integrity of intestinal epithelial tight junctions in response to infection. *Gastroenterology*, 2006, Vol. 131, pp. 818-829.
24. Dimova T., Brouwer M., Gosselin F., Tassignon J., Leo O., Donner C., Marchant A., Vermijlen D. Effector V γ 9V δ 2 T cells dominate the human fetal γ delta T-cell repertoire. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 2015, Vol. 112, no. 6, pp. E556-E565.

25. Dunne M.R., Elliott L., Hussey S., Mahmud N., Kelly J., Doherty D.G., Feighery C.F. Persistent changes in circulating and intestinal $\gamma\delta$ T cell subsets, invariant natural killer T cells and mucosal-associated invariant T cells in children and adults with coeliac disease. *PLoS One*, 2013, Vol. 8, e76008. doi: 10.1371/journal.pone.0076008.
26. Dutta M., Kraus Z.J., Gomez-Rodriguez J., Hwang S.H., Cannons J.L., Cheng J., Lee S.Y., Wiest D.L., Wakeland E.K., Schwartzberg P.L. A role for Ly108 in the induction of promyelocytic zinc finger transcription factor in developing thymocytes. *J. Immunol.*, 2013, Vol. 190, pp. 2121-2128.
27. Ennamorati M., Vasudevan C., Clerkin K., Halvorsen S., Verma S., Ibrahim S., Prosper S., Porter C., Yeliseyev V., Kim M., Gardecki J., Sassi S., Tearney G., Cherayil B.J., Bry L., Seed B., Jain N. Intestinal microbes influence development of thymic lymphocytes in early life. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 2020, Vol. 117, pp. 2570-2578.
28. Fahrner A.M., Konigshofer Y., Kerr E.M., Ghandour G., Mack D.H., Davis M.M., Chien Y.H. Attributes of gammadelta intraepithelial lymphocytes as suggested by their transcriptional profile. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 2001, Vol. 98, pp. 10261-10266.
29. Franciszkiwicz K., Salou M., Legoux F., Zhou Q., Cui Y., Bessoles S., Lantz O. MHC class I-related molecule, MR1, and mucosal-associated invariant T cells. *Immunol. Rev.*, 2016, Vol. 272, pp. 120-138.
30. Fuss I.J., Joshi B., Yang Z., Degheidy H., Fichtner-Feigl S., de Souza H., Rieder F., Scaldaferrri F., Schirbel A., Scarpa M., West G., Yi C., Xu L., Leland P., Yao M., Mannon P., Puri R.K., Fiocchi C., Strober W. IL-13R α 2-bearing, type II NKT cells reactive to sulfatide self-antigen populate the mucosa of ulcerative colitis. *Gut*, 2014, Vol. 63, pp. 1728-1736.
31. Gapin L. Development of invariant natural killer T cells. *Curr. Opin. Immunol.*, 2016, Vol. 39, pp. 68-74.
32. Gaya M., Barral P., Burbage M., Aggarwal S., Montaner B., Navia A.W., Aid M., Tsui C., Maldonado P., Nair U., Ghneim K., Fallon P. G., Sekaly R.-P., Barouch D.H., Shalek A.K., Bruckbauer A., Strid J., Batista F.D. Initiation of antiviral B cell immunity relies on innate signals from spatially positioned NKT cells. *Cell*, 2018, Vol. 172, pp. 517-533.e20.
33. Griewank K., Borowski C., Rietdijk S., Wang N., Julien A., Wei D.G., Mamchak A.A., Terhorst C., Bendelac A. Homotypic interactions mediated by Slamf1 and Slamf6 receptors control NKT cell lineage development. *Immunity*, 2007, Vol. 27, pp. 751-762.
34. Godfrey D.I., Berzins S.P. Control points in NKT-cell development. *Nat. Rev. Immunol.*, 2007, Vol. 7, pp. 505-518.
35. Godfrey D.I., Uldrich A.P., McCluskey J., Rossjohn J., Moody D.B. The burgeoning family of unconventional T cells. *Nat. Immunol.*, 2015, Vol. 16, no. 11, pp. 1114-1123.
36. Goldberg E.L., Shchukina I., Asher J.L., Sidorov S., Artyomov M.N., Dixit V.D. Ketogenesis activates metabolically protective gamma delta T cells in visceral adipose tissue. *Nat. Metab.*, 2020, Vol. 2, no. 1, pp. 50-61.
37. Guo X.J., Dash P., Crawford J.C., Allen E.K., Zamora A.E., Boyd D.F., Duan S., Bajracharya R., Awad W.A., Apiwattanakul N., Vogel P., Kanneganti T.D., Thomas P.G. Lung gammadelta T cells mediate protective responses during neonatal influenza infection that are associated with type 2 immunity. *Immunity*, 2018, Vol. 49, no. 3, pp. 531-544.e6.
38. Hams E., Locksley R.M., McKenzie A.N., Fallon P.G. Cutting edge: IL-25 elicits innate lymphoid type 2 and type II NKT cells that regulate obesity in mice. *J. Immunol.*, 2013, Vol. 191, pp. 5349-5353.
39. Han J., Liu N., Jin W., Zanvit P., Zhang D., Xu J., Bynum A., Kazmi R., Zhang J., He W., Chen W.-J. TGF- β controls development of TCR $\gamma\delta$ ⁺CD8 α ⁺ intestinal intraepithelial lymphocytes. *Cell Discov.*, 2023, Vol. 9, 52. doi: 10.1038/s41421-023-00542-2.
40. Havran W.L., Allison J.P. Developmentally ordered appearance of thymocytes expressing different T-cell antigen receptors. *Nature*, 1988, Vol. 335, pp. 443-445.
41. Hinks T.S.C., Zhou X., Staples K.J., Dimitrov B.D., Manta A., Petrossian T., Lum P.Y., Smith C.G., Ward J.A., Howarth P.H., Walls A.F., Gadola S.D., Djukanović R. Innate and adaptive T cells in asthmatic patients: relationship to severity and disease mechanisms. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2015, Vol. 136, pp. 323-333.
42. Hooper L.V., Littman D.R., Macpherson A.J. Interactions between the microbiota and the immune system. *Science*, 2012, Vol. 336, pp. 1268-1273.
43. Hu M.D., Ethridge A.D., Lipstein R., Kumar S., Wang Y., Jabri B., Turner J.R., Edelblum K.L. Epithelial IL-15 is a critical regulator of $\gamma\delta$ intraepithelial lymphocyte motility within the intestinal mucosa. *J. Immunol.*, 2018, Vol. 201, no. 2, pp. 747-756.
44. Huijts C.M., Schneiders F.L., Garcia-Vallejo J.J., Verheul H.M., de Gruijl T.D., van der Vliet H.J. mTOR inhibition per Se induces nuclear localization of FOXP3 and conversion of Invariant NKT (iNKT) cells into immunosuppressive regulatory iNKT cells. *J. Immunol.*, 2015, Vol. 195, no. 5, pp. 2038-2045.
45. Ismail A.S., Severson K.M., Vaishnav S., Behrendt C.L., Yu X., Benjamin J.L., Ruhn K.A., Hou B., deFranco A.L., Yarovsky F., Hooper L.V. Gammadelta intraepithelial lymphocytes are essential mediators of host-microbial homeostasis at the intestinal mucosal surface. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 2011, Vol. 108, pp. 8743-8748.
46. Jahng A., Maricic I., Aguilera C., Cardell S., Halder R.C., Kumar V. Prevention of autoimmunity by targeting a distinct, non invariant CD1d-reactive T cell population reactive to sulfatide. *J. Exp. Med.*, 2004, Vol. 199, pp. 947-957.

47. Jameson J., Ugarte K., Chen N., Yachi P., Fuchs E., Boismenu R., Havran W.L. A role for skin gammadelta T cells in wound repair. *Science*, 2002, Vol. 296, no. 5568, pp. 747-749.
48. Jin Y., Xia M., Sun A., Saylor C.M., Xiong N. CCR10 is important for the development of skin-specific gammadelta T cells by regulating their migration and location. *J. Immunol.*, 2010, Vol. 185, pp. 5723-5731.
49. Kain L., Costanzo A., Webb B., Holt M., Bendelac A., Savage P.B., Teyton L. Endogenous ligands of natural killer T cells are alpha-linked glycosylceramides. *Mol. Immunol.*, 2015, Vol. 68, pp. 94-97.
50. Kanamori M., Tasumi Y., Iyoda T., Ushida M., Inaba K. Sulfatide inhibits alpha-galactosylceramide presentation by dendritic cells. *Int. Immunol.*, 2012, Vol. 24, pp. 129-136.
51. Kang S.J., Jin H.M., Won E.J., Cho Y.-N., Jung H.-J., Kwon Y.-S., Kee H. J., Ju J. K., Kim J.-C., Kim U. J., Jang H.-C., Jung S.-I., Kee S.-J., Park Y.-W. Activation, impaired tumor necrosis factor-alpha production, and deficiency of circulating mucosal-associated invariant T cells in patients with scrub typhus. *PLoS Negl. Trop. Dis.*, 2016, Vol. 10, e4832. doi: 10.1371/journal.pntd.0004832.
52. Keller A.N., Eckle S.B.G., Xu W., Liu L., Hughes V.A., Mak J.Y., Meehan B.S., Pediongco T., Birkinshaw R.W., Chen Z., Wang H., D'Souza C., Kjer-Nielsen L., Gherardin N.A., Godfrey D.I., Kostenko L., Corbett A.J., Purcell A.W., Fairlie D.P., McCluskey J., Rossjohn J. Drugs and drug-like molecules can modulate the function of mucosal-associated invariant T cells. *Nat. Immunol.*, 2017, Vol. 18, no. 4, pp. 402-411.
53. Kinjo Y., Kitano N., Kronenberg M. The role of invariant natural killer T cells in microbial immunity. *J. Infect. Chemother.*, 2013, Vol. 19, pp. 560-570.
54. Kjer-Nielsen L., Patel O., Corbett A.J., Le Nours J., Meehan B., Liu L., Bhati M., Chen Z., Kostenko L., Reantragoon R., Williamson N.A., Purcell A.W., Dudek N.L., McConville M.J., O'Hair R.A., Khairallah G.N., Godfrey D.I., Fairlie D.P., Rossjohn J., McCluskey J. MR1 presents microbial vitamin B metabolites to MAIT cells. *Nature*, 2012, Vol. 491, pp. 717-723.
55. Knowlden S., Georas S.N. The autotaxin-LPA axis emerges as a novel regulator of lymphocyte homing and inflammation. *J. Immunol.*, 2014, Vol. 192, pp. 851-857.
56. Koay H.F., Gherardin N.A., Enders A., Loh L., Mackay L.K., Almeida C.F., Russ B.E., Nold-Petry C.A., Nold M.F., Bedoui S., Chen Z., Corbett A.J., Eckle S.B., Meehan B., d'Udekem Y., Konstantinov I.E., Lappas M., Liu L., Goodnow C.C., Fairlie D.P., Rossjohn J., Chong M.M., Kedzierska K., Berzins S.P., Belz G.T., McCluskey J., Uldrich A.P., Godfrey D.I., Pellicci D.G. A three-stage intrathymic development pathway for the mucosal-associated invariant T cell lineage. *Nat. Immunol.*, 2016, Vol. 17, pp. 1300-1311.
57. Koay H.-F., Godfrey D.I., Pellicci D.G. Development of mucosal-associated invariant T cells. *Immunol. Cell Biol.*, 2018, Vol. 96, no. 6, pp. 598-606.
58. Kok W.L., Denney L., Benam K., Cole S., Clelland C., McMichael A.J., Ho L.-P. Pivotal advance: Invariant NKT cells reduce accumulation of inflammatory monocytes in the lungs and decrease immune-pathology during severe influenza a virus infection. *J. Leukoc. Biol.*, 2012, Vol. 91, no. 3, pp. 357-368.
59. LaMarche N.M., Kane H., Kohlgruber A.C., Dong H., Lynch L., Brenner M.B. Distinct iNKT cell populations use IFNgamma or ER stress-induced IL-10 to control adipose tissue homeostasis. *Cell Metab.*, 2020, Vol. 32, no. 2, pp. 243-258.e6.
60. Le Bourhis L., Martin E., Peguillet I., Guihot A., Froux N., Coré M., Lévy E., Dusseaux M., Meyssonier V., Premel V., Ngo C., Riteau B., Duban L., Robert D., Huang S., Rottman M., Soudais C., Lantz O. Antimicrobial activity of mucosal-associated invariant T cells. *Nat. Immunol.*, 2010, Vol. 11, pp. 701-708.
61. Lee Y.J., Holzapfel K.L., Zhu J., Jameson S.C., Hogquist K.A. Steady-state production of IL-4 modulates immunity in mouse strains and is determined by lineage diversity of iNKT cells. *Nat. Immunol.*, 2013, Vol. 14, pp. 1146-1154.
62. Lee S., Koh J., Chang Y., Kim H.Y., Chung D.H. Invariant NKT cells functionally link microbiota-induced butyrate production and joint inflammation. *J. Immunol.*, 2019, Vol. 203, no. 12, pp. 3199-3208.
63. Leeansyah E., Loh L., Nixon D.F., Sandberg J.K. Acquisition of innate-like microbial reactivity in mucosal tissues during human fetal MAIT-cell development. *Nat. Commun.*, 2014, Vol. 5, 3143. doi: 10.1038/ncomms4143.
64. Leng T., Akther H.D., Hackstein C.P., Powell K., King T., Friedrich M., Christoforidou Z., McCuaig S., Neyazi M., Arancibia-Carcamo C.V., Hagel J., Powrie F., Oxford I.B.D.I., Peres R.S., Millar V., Ebner D., Lamichhane R., Ussher J., Hinks T.S.C., Marchi E., Willberg C., Klennerman P. TCR and inflammatory signals tune human MAIT cells to exert specific tissue repair and effector functions. *Cell Rep.*, 2019, Vol. 28, no. 12, pp. 3077-3091.e5.
65. Liew P.X., Lee W.Y., Kubes P. iNKT cells orchestrate a switch from inflammation to resolution of sterile liver injury. *Immunity*, 2017, Vol. 47, no. 4, pp. 752-765.e5.
66. Loh L., Ivarsson M.A., Michaelsson J., Sandberg J.K., Nixon D.F. Invariant natural killer T cells developing in the human fetus accumulate and mature in the small intestine. *Mucosal Immunol.*, 2014, Vol. 7, no. 5, pp. 1233-1243.
67. Loh L., Wang Z., Sant S., Koutsakos M., Jegaskanda S., Corbett A.J., Liu L., Fairlie D.P., Crowe J., Rossjohn J., Xu J., Doherty P.C., McCluskey J., Kedzierska K. Human mucosal-associated invariant T cells contribute to antiviral influenza immunity via IL-18-dependent activation. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 2016, Vol. 113, pp. 10133-10138.

68. Lynch L., Michelet X., Zhang S., Brennan P.J., Moseman A., Lester C., Besra G., Vomhof-Dekrey E.E., Tighe M., Koay H.F., Godfrey D.I., Leadbetter E.A., Sant'Angelo D.B., von Andrian U., Brenner M.B. Regulatory iNKT cells lack expression of the transcription factor PLZF and control the homeostasis of T cells and macrophages in adipose tissue. *Nat. Immunol.*, 2014, Vol. 16, pp. 85-95.
69. MacLeod A.S., Hemmers S., Garijo O., Chabod M., Mowen K., Witherden D.A., Havran W.L. Dendritic epidermal T cells regulate skin antimicrobial barrier function. *J. Clin. Invest.*, 2013, Vol. 123, pp. 4364-4374.
70. Mann A.O., Hanna B.S., Munoz-Rojas A.R., Sandrock I., Prinz I., Benoist C., Mathis D. IL-17A-producing gammadeltaT cells promote muscle regeneration in a microbiota-dependent manner. *J. Exp. Med.*, 2022, Vol. 219, no. 5, e20211504. doi: 10.1084/jem.20211504.
71. Maricic I., Sheng H., Marrero I., Seki E., Kisseleva T., Chaturvedi S., Molle N., Mathews S.A., Gao B., Kumar V. Inhibition of type I natural killer T cells by retinoids or following sulfatide-mediated activation of type II natural killer T cells attenuates alcoholic liver disease in mice. *Hepatology*, 2015, Vol. 61, pp. 1357-1369.
72. Matsuda J.L., Mallevaey T., Scott-Browne J., Gapin L. CD1d-restricted iNKT cells, the 'Swiss-Army knife' of the immune system. *Curr. Opin. Immunol.*, 2008, Vol. 20, pp. 358-368.
73. Mayassi T., Ladell K., Gudjonson H., McLaren J.E., Shaw D.G., Tran M.T., Rokicka J.J., Lawrence I., Grenier J.C., van Unen V., Ciszewski C., Dimaano M., Sayegh H.E., Kumar V., Wijmenga C., Green P.H.R., Gokhale R., Jericho H., Semrad C.E., Guandalini S., Dinner A.R., Kupfer S.S., Reid H.H., Barreiro L.B., Rossjohn J., Price D.A., Jabri B. Chronic inflammation permanently reshapes tissue-resident immunity in celiac disease. *Cell*, 2019, Vol. 176, pp. 967-981.e919.
74. Miyazaki Y., Miyake S., Chiba A., Lantz O., Yamamura T. Mucosal-associated invariant T cells regulate Th1 response in multiple sclerosis. *Int. Immunol.*, 2011, Vol. 23, pp. 529-535.
75. Nair S., Boddupalli C.S., Verma R., Liu J., Yang R., Pastores G.M., Mistry P.K., Dhodapkar M.V. Type II NKT-TFH cells against Gaucher lipids regulate B-cell immunity and inflammation. *Blood*, 2015, Vol. 125, pp. 1256-1271.
76. Ogata M., Itoh T. Gamma/delta intraepithelial lymphocytes in the mouse small intestine. *Anat. Sci. Int.*, 2016, Vol. 91, pp. 301-312.
77. Olivares-Villagómez D., van Kaer L. Intestinal intraepithelial lymphocytes: sentinels of the mucosal barrier. *Trends Immunol.*, 2018, Vol. 39, pp. 264-275.
78. Olszak T., An D., Zeissig S., Vera M.P., Richter J., Franke A., Glickman J.N., Siebert R., Baron R.M., Kasper D.L., Blumberg R.S. Microbial exposure during early life has persistent effects on natural killer T cell function. *Science*, 2012, Vol. 336, pp. 489-493.
79. Parekh V.V., Wilson M.T., Olivares-Villagomez D., Singh A.K., Wu L., Wang C.R., Joyce S., van Kaer L. Glycolipid antigen induces long-term natural killer T cell anergy in mice. *J. Clin. Invest.*, 2005, Vol. 115, no. 9, pp. 2572-2583.
80. Reantragoon R., Corbett A.J., Sakala I.G., Gherardin N.A., Furness J.B., Chen Z., Eckle S.B., Uldrich A.P., Birkinshaw R.W., Patel O., Kostenko L., Meehan B., Kedzierska K., Liu L., Fairlie D.P., Hansen T.H., Godfrey D.I., Rossjohn J., McCluskey J., Kjer-Nielsen L. Antigen-loaded MR1 tetramers define T cell receptor heterogeneity in mucosal-associated invariant T cells. *J. Exp. Med.*, 2013, Vol. 210, pp. 2305-2320.
81. Rider P., Voronov E., Dinarello C.A., Apte R.N., Cohen I. Alarmins: Feel the Stress. *J. Immunol.*, 2017, Vol. 198, pp. 1395-1402.
82. Riva A., Patel V., Kurioka A., Jeffery H.C., Wright G., Tarff S., Shawcross D., Ryan J.M., Evans A., Azarian S., Bajaj J.S., Fagan A., Patel V., Mehta K., Lopez C., Simonova M., Katzarov K., Hadzhiolova T., Pavlova S., Wendon J.A., Oo Y.H., Klenerman P., Williams R., Chokshi S. Mucosa-associated invariant T cells link intestinal immunity with antibacterial immune defects in alcoholic liver disease. *Gut*, 2018, Vol. 67, no. 5, pp. 918-930.
83. Rolf J., Berntman E., Stenström M., Smith E.M., Månsson R., Stenstad H., Yamagata T., Agace W., Sigvardsson M., Cardell S.L. Molecular profiling reveals distinct functional attributes of CD1d-restricted natural killer (NK) T cell subsets. *Mol. Immunol.*, 2008, Vol. 45, pp. 2607-2620.
84. Rouxel O., Da Silva J., Beaudoin L., Nel I., Tard C., Cagninacci L., Kiaf B., Oshima M., Diedisheim M., Salou M., Corbett A., Rossjohn J., McCluskey J., Scharfmann R., Battaglia M., Polak M., Lantz O., Beltrand J., Lehuen A. Cytotoxic and regulatory roles of mucosal-associated invariant T cells in type 1 diabetes. *Nat. Immunol.*, 2017, Vol. 18, pp. 1321-1331.
85. Ruijing X., Mengjun W., Xiaoling Z., Shu P., Mei W., Yingcheng Z., Yuling H., Jinquan T. Ja33⁺ MAIT cells play a protective role in TNBS induced intestinal inflammation. *Hepatology*, 2012, Vol. 59, pp. 762-767.
86. Salou M., Nicol B., Garcia A., Baron D., Michel L., Elong-Ngono A., Hulin P., Nedellec S., Jacq-Foucher M., le Frère F., Jousset N., Bourreille A., Wiertlewski S., Soullillou J.P., Brouard S., Nicot A.B., Degauque N., Laplaud D.A. Neuropathologic, phenotypic and functional analyses of mucosal associated Invariant T cells in multiple sclerosis. *Clin. Immunol.*, 2016, Vol. 166-167, pp. 1-11.
87. Sandrock I., Zięta N., Łyszkiewicz M., Oberdörfer L., Witzlau K., Krueger A., Prinz I. MicroRNA-181a/b-1 is not required for innate gammadelta NKT effector cell development. *PLoS One*, 2015, Vol. 10, no. 12, e0145010. doi: 10.1371/journal.pone.0145010.

88. Savage A.K., Constantinides M.G., Han J., Picard D., Martin E., Li B., Lantz O., Bendelac A. The transcription factor PLZF directs the effector program of the NKT cell lineage. *Immunity*, 2008, Vol. 29, pp. 391-403.
89. Serriari N.-E., Eoche M., Lamotte L., Lion J., Fumery M., Marcelo P., Chatelain D., Barre A., Nguyen-Khac E., Lantz O., Dupas J.L., Treiner E. Innate mucosal-associated invariant T (MAIT) cells are activated in inflammatory bowel diseases. *Clin. Exp. Immunol.*, 2014, Vol. 176, pp. 266-274.
90. Shah H.B., Devera T.S., Rampuria P., Lang G.A., Lang M.L. Type II NKT cells facilitate alum-sensing and humoral immunity. *J. Leukoc. Biol.*, 2012, Vol. 92, pp. 883-893.
91. Sullivan Z.A., Khoury-Hanold W., Lim J., Smillie C., Biton M., Reis B.S., Zwick R.K., Pope S.D., Israni-Winger K., Parsa R., Philip N.H., Rashed S., Palm N., Wang A., Mucida D., Regev A., Medzhitov R. gamma delta T cells regulate the intestinal response to nutrient sensing. *Science*, 2021, Vol. 371, no. 6535, eaba8310. doi: 10.1126/science.aba8310.
92. Swamy M., Abeler-Dörner L., Chettle J., Mahlaköiv T., Goubau D., Chakravarty P., Ramsay G., Reis e Sousa C., Staeheli P., Blacklaws B.A., Heeney J.L., Hayday A.C. Intestinal intraepithelial lymphocyte activation promotes innate antiviral resistance. *Nat. Commun.*, 2015, Vol. 6, 7090. doi: 10.1038/ncomms8090.
93. Swarbrick G.M., Gela A., Cansler M.E., Null M.D., Duncan R.B., Nemes E., Shey M., Nsereko M., Mayanja-Kizza H., Kiguli S., Koh J., Hanekom W.A., Hatherill M., Lancioni C., Lewinsohn D.M., Scriba T.J., Lewinsohn D.A. Postnatal Expansion, Maturation, and Functionality of MR1T Cells in Humans. *Front. Immunol.*, 2020, Vol. 11, 556695. doi: 10.3389/fimmu.2020.556695.
94. Terashima A., Watarai H., Inoue S., Sekine E., Nakagawa R., Hase K., Iwamura C., Nakajima H., Nakayama T., Taniguchi M. A novel subset of mouse NKT cells bearing the IL-17 receptor B responds to IL-25 and contributes to airway hyperreactivity. *J. Exp. Med.*, 2008, Vol. 205, pp. 2727-2733.
95. Toubal A., Kiaz B., Beaudoin L., Cagninacci L., Rhimi M., Fruchet B., da Silva J., Corbett A.J., Simoni Y., Lantz O., Rossjohn J., McCluskey J., Lesnik P., Maguin E., Lehuen A. Mucosal-associated invariant T cells promote inflammation and intestinal dysbiosis leading to metabolic dysfunction during obesity. *Nat. Commun.*, 2020, Vol. 11, no. 1, 3755. doi: 10.1038/s41467-020-17307-0.
96. van Kaer L., Parekh V.V., Wu L. The response of CD1d-restricted invariant NKT cells to microbial pathogens and their products. *Front. Immunol.*, 2015, Vol. 6, 226. doi:10.3389/fimmu.2015.00226.
97. Vogt S., Mattner J. NKT cells contribute to the control of microbial infections. *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, 2021, Vol. 11, 718350. doi: 10.3389/fcimb.2021.718350.
98. von Gerichten J., Lamprecht D., Opalka L., Souillard D., Marsching C., Pilz R., Sencio V., Herzer S., Galy B., Nordstrom V., Hopf C., Grone H.J., Trottein F., Sandhoff R. Bacterial immunogenic alpha-galactosylceramide identified in the murine large intestine: dependency on diet and inflammation. *J. Lipid Res.*, 2019, Vol. 60, no. 11, pp. 1892-1904.
99. Wang J., Cho S., Ueno A., Cheng L., Xu B.Y., Desrosiers M.D., Shi Y., Yang Y. Ligand-dependent induction of noninflammatory dendritic cells by anergic invariant NKT cells minimizes autoimmune inflammation. *J. Immunol.*, 2008, Vol. 181, no. 4, pp. 2438-2445.
100. Wang J.J., Macardle C., Weedon H., Beroukas D., Banovic T. Mucosal-associated invariant T cells are reduced and functionally immature in the peripheral blood of primary Sjogren's syndrome patients. *Eur. J. Immunol.*, 2016, Vol. 46, pp. 2444-2453.
101. Wei J.J., Kim H.S., Spencer C.A., Brennan-Crispi D., Zheng Y., Johnson N.M., Rosenbach M., Miller C., Leung D.H., Cotsarelis G., Leung T.H. Activation of TRPA1 nociceptor promotes systemic adult mammalian skin regeneration. *Sci. Immunol.*, 2020, Vol. 5, no. 50, eaba5683. doi: 10.1126/sciimmunol.aba5683.
102. Wesley J.D., Tessmer M.S., Chaukos D., Brossay L. NK cell-like behavior of Valpha14i NK T cells during MCMV infection. *PLoS Pathog.*, 2008, Vol. 4, e1000106. doi:10.1371/journal.ppat.1000106.
103. Wilharm A., Tabib Y., Nassar M., Reinhardt A., Mizraji G., Sandrock I., Heyman O., Barros-Martins J., Aizenbud Y., Khalaileh A., Eli-Berchoer L., Elinav E., Wilensky A., Forster R., Bercovier H., Prinz I., Hovav A.H. Mutual interplay between IL-17-producing gammadeltaT cells and microbiota orchestrates oral mucosal homeostasis. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 2019, Vol. 116, no. 7, pp. 2652-2661.
104. Wingender G., Stepniak D., Krebs P., Lin L., McBride S., Wei B., Braun J., Mazmanian S.K., Kronenberg M. Intestinal microbes affect phenotypes and functions of invariant natural killer T cells in mice. *Gastroenterology*, 2012, Vol. 143, no. 2, pp. 418-428.
105. Witherden D.A., Watanabe M., Garijo O., Rieder S.E., Sarkisyan G., Cronin S.J., Verdino P., Wilson I.A., Kumanogoh A., Kikutani H., Teyton L., Fischer W.H., Havran W.L. The CD100 receptor interacts with its plexin B2 ligand to regulate epidermal gammadelta T cell function. *Immunity*, 2012, Vol. 37, pp. 314-325.
106. Wolf B.J., Tatituri R.V., Almeida C.F., le Nours J., Bhowruth V., Johnson D., Uldrich A.P., Hsu F.F., Brigl M., Besra G.S., Rossjohn J., Godfrey D.I., Brenner M.B. Identification of a potent microbial lipid antigen for diverse NKT cells. *J. Immunol.*, 2015, Vol. 195, pp. 2540-2551.
107. Yoshida S., Mohamed R.H., Kajikawa M., Koizumi J., Tanaka M., Fugo K., Otsuka N., Maenaka K., Yagita H., Chiba H., Kasahara M. Involvement of an NKG2D ligand H60c in epidermal dendritic T cell-mediated wound repair. *J. Immunol.*, 2012, Vol. 188, pp. 3972-3979.

108. Zajonc D.M., Girardi E. Recognition of microbial glycolipids by natural killer T cells. *Front. Immunol.*, 2015, Vol. 6, 400. doi: 10.3389/fimmu.2015.00400.
109. Zanvit P., Konkel J.E., Jiao X., Kasagi S., Zhang D.F., Wu R.Q., Chia C., Ajami N.J., Smith D.P., Petrosino J.F., Abbatiello B., Nakatsukasa H., Chen Q.M., Belkaid Y., Chen Z.J., Chen W.J. Antibiotics in neonatal life increase murine susceptibility to experimental psoriasis. *Nat. Commun.*, 2015, Vol. 6, 8424. doi: 10.1038/ncomms9424.
110. Zeng D., Dick M., Cheng L., Amano M., Dejbakhsh-Jones S., Huie P., Sibley R., Strober S. Subsets of transgenic T cells that recognize CD1 induce or prevent murine lupus: role of cytokines. *J. Exp. Med.*, 1998, Vol. 187, pp. 525-536.
111. Zhang Y., Kong D., Wang H. Mucosal-Associated Invariant T cell in liver diseases *Int. J. Biol. Sci.*, 2020, Vol. 16, pp. 460-470.
112. Zhao J., Weng X., Bagchi S., Wang C.R. Polyclonal type II natural killer T cells require PLZF and SAP for their development and contribute to CpG-mediated antitumor response. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 2014, Vol. 111, pp. 2674-2679.

Авторы:

Топтыгина А.П. — д.м.н., главный научный сотрудник, руководитель лаборатории цитокинов ФБУН «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Г.Н. Габричевского» Роспотребнадзора; профессор кафедры иммунологии биологического факультета ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», Москва, Россия

Authors:

Toptygina A.P., PhD, MD (Medicine), Chief Research Associate, Head, Laboratory of Cytokines, G.N. Gabrichevsky Research Institute for Epidemiology and Microbiology; Professor, Department of Immunology, Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation

Поступила 18.10.2023
Отправлена на доработку 11.11.2023
Принята к печати 14.11.2023

Received 18.10.2023
Revision received 11.11.2023
Accepted 14.11.2023

СТЕРИЛЬНОЕ ВОСПАЛЕНИЕ, КРОСС-ПРЕЗЕНТАЦИЯ, АУТОФАГИЯ И АДАПТИВНЫЙ ИММУНИТЕТ ПРИ ИММУНОВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ РЕВМАТИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ

Саидов М.З.

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

Резюме. Доминирующими этиологическими факторами стерильного воспаления при иммуновоспалительных ревматических заболеваниях являются провоспалительные вне- и внутриклеточные DAMPs, генерирующиеся при системной прогрессирующей дезорганизации рыхлой волокнистой неоформленной соединительной ткани, регулируемой гибели клеток и некрозе клеток. Стерильное воспаление является многоступенчатым процессом, при котором индуцируется последовательность реакций, опосредованных лейкоцитами и резидентными клетками макрофагально-моноцитарного ряда, направленных на очищение очага воспаления от клеточного и тканевого детрита, с последующим восстановлением гомеостаза поврежденной ткани. Важная роль в этом процессе принадлежит транс-эндотелиальной миграции лейкоцитов в очаг стерильного воспаления и формирование клеточного воспалительного инфильтрата. Ключевой особенностью указанных процессов является реактивность PRR-рецепторов и, как следствие PRR-DAMPs взаимодействий, последующий запуск молекулярно-клеточных процессов, итогом которых является картина локальных и/или системных проявлений стерильного воспаления. Следствием PRR-DAMPs взаимодействий является активация врожденного иммунитета и запуск молекулярно-клеточных реакций, позволяющих отнести иммуновоспалительные ревматические заболевания к категории системных стерильных аутовоспалительных процессов. Генерализованность патофизиологических эффектов провоспалительных DAMPs и, соответственно, системность и полиорганность поражения тканей и внутренних органов при иммуновоспалительных ревматических заболеваниях обусловлено широкой распространенностью рецепторов к «сигналам опасности». В развитии DAMP-опосредованного стерильного воспаления важнейшее место занимает феномен кросс-презентации и аутофагия. Кросс-презентация обуславливает презентацию внеклеточных DAMPs из интернализированных белков с молекулами МНС класса I аутореактивным CD8⁺ цитотоксическим Т-лимфоцитам. Аутофагия обеспечивает процессинг внутриклеточных пептидных DAMPs, их загрузку на молекулы МНС класса II с последующей индукцией CD4⁺Т-клеточного адап-

Адрес для переписки:

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

Address for correspondence:

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

Образец цитирования:

М.З. Саидов «Стерильное воспаление, кросс-презентация, аутофагия и адаптивный иммунитет при иммуновоспалительных ревматических заболеваниях» // Медицинская иммунология, 2024. Т. 26, № 3. С. 465-502.
doi: 10.15789/1563-0625-SIC-2790

© Саидов М.З., 2024

Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

M.Z. Saidov "Sterile inflammation, cross-presentation, autophagy and adaptive immunity in immunoinflammatory rheumatic diseases", Medical Immunology (Russia)/ Meditsinskaya Immunologiya, 2024, Vol. 26, no. 3, pp. 465-502. doi: 10.15789/1563-0625-SIC-2790

© Saidov M.Z., 2024

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

DOI: 10.15789/1563-0625-SIC-2790

тивного иммунного ответа. Важный вклад в указанные процессы вносят врожденные лимфоидные клетки. Модель функциональной сопряженности и взаимодополняемости ILCs и Th-CD4⁺T-клеток расширило наши представления об иммунной регуляции, распространив активность врожденного и адаптивного иммунитета в область поддержания тканевого гомеостаза, морфогенеза, репарации, регенерации и воспаления. Следствием PRR-DAMP взаимодействий тканевых ILCs и последующего подключения клеточных пар ILC – Th-CD4⁺T-клеток является прогрессирование системного стерильного воспаления. Представленные в настоящем обзоре материалы определяют перспективные молекулярные и клеточные мишени с целью регуляции и/или ингибирования активности стерильного воспаления при иммуновоспалительных ревматических заболеваниях.

Ключевые слова: стерильное воспаление, ревматические болезни, адаптивный иммунитет, DAMPs, PRR-рецепторы, кросс-презентация, аутофагия

STERILE INFLAMMATION, CROSS-PRESENTATION, AUTOPHAGY AND ADAPTIVE IMMUNITY IN IMMUNOINFLAMMATORY RHEUMATIC DISEASES

Saidov M.Z.

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

Abstract. Proinflammatory extracellular and intracellular DAMPs are the dominant etiological factors of sterile inflammation in immuno-inflammatory rheumatic diseases. They are generated by systemic progressive disorganization of loose fibrous unformed connective tissue, programmed cell death and cell necrosis. Sterile inflammation is a multi-stage process which is induced by a sequence of reactions mediated by leukocytes and resident cells of the macrophage-monocyte series, aimed at cleansing the focus of inflammation from cellular and tissue detritus, followed by restoration of homeostasis of damaged tissue. An important role in this process belongs to the transendothelial migration of leukocytes to the focus of sterile inflammation and formation of cellular inflammatory infiltrate. The key feature of these events is the reactivity of PRR receptors followed by a cascade of PRR-DAMPs interactions with subsequent launch of molecular and cellular processes causing the local and/or systemic manifestations of sterile inflammation. Activation of innate immunity is the result of PRR-DAMPs interactions which launches the molecular and cellular reactions. Hence, it is possible to attribute the immunoinflammatory rheumatic diseases to the category of systemic sterile autoinflammatory processes. Generalization of the pathophysiological effects of pro-inflammatory DAMPs and, accordingly, the systemic and multi-organ nature of tissue and internal organ damage in immunoinflammatory rheumatic diseases is due to the wide occurrence of receptors for “danger signals”. The most important place in the development of DAMP-mediated sterile inflammation is occupied by the phenomenon of cross-presentation and autophagy. The cross-presentation causes exposition of extracellular DAMPs from internalized proteins with MHC class I molecules to autoreactive CD8⁺ cytotoxic T lymphocytes. Autophagy provides processing of intracellular peptide DAMPs, their loading onto MHC class II molecules with subsequent induction of adaptive immune response in CD4⁺T cell populations. The innate lymphoid cells (ILC) make an important contribution to these processes. The model of functional coupling and complementarity between ILCs and Th-CD4⁺T cells has expanded our understanding of immune regulation by extending the activity of innate and adaptive immunity to the level of maintaining tissue homeostasis, morphogenesis, repair, regeneration and inflammation. Progression of systemic sterile inflammation may be a result of PRR-DAMP interactions of tissue ILCs followed by switching of ILC/Th-CD4⁺T cell partners. The data presented in this review define the promising molecular and cellular targets aiming for regulation and/or inhibition of sterile inflammation in immunoinflammatory rheumatic diseases.

Keywords: sterile inflammation, rheumatic diseases, adaptive immunity, DAMPs, PRR receptors, cross-presentation, autophagy

Введение

Уникальной особенностью многовековой истории изучения воспаления является применение постоянно обновляющихся концептуальных подходов и идей, основанных на достижениях медицинской науки на определенных исторических рубежах. Патогенез воспаления включает в себя нарушение функционального состояния всех жизнеобеспечивающих систем органов, тканей и клеток и базируется на последних достижениях в области фундаментальной иммунологии, генетики и молекулярной биологии. Иммуновоспалительные ревматические заболевания (ИВРЗ) являют собой пример, когда интерпретация патогенеза ИВРЗ основывается на новаторских теориях иммунитета, формирующих основные направления научных исследований в этой области и клиническое применение полученных знаний.

Ярким примером обобщения и переосмысления общей теории иммунозависимого воспаления является предложенная Polly Matzinger в 1994 г. «теория опасности» [90], явившаяся некой альтернативой доминирующей в то время теории дискриминации «я/не я» по Burnet F.M. (модель самораспознавания, или иммунного надзора) [1] и одновременно дополнявшей революционизирующую модель Janeway С.А., касающуюся PRR-распознавания высококонсервативных молекулярных структур патогенов (PAMPs) и, как следствие, индуцирующих АГ-специфический адаптивный анти-инфекционный иммунный ответ [59].

Основополагающий тезис «теории опасности» Polly Matzinger состоял в том, что воспалительный иммунный ответ индуцируется «сигналами тревоги от поврежденных тканей, а не распознаванием “не-я”». Иными словами, базисные основы «иммунного надзора» по Burnet F.M. заменялись на участие реактивности системы иммунитета в нарушении динамического тканевого гомеостаза и появление в процессах тканевой деструкции, некроза клеток и регулируемой гибели клеток (РГК) «сигналов опасности/тревоги», обозначаемых как DAMPs, индуцирующих АГ-специфический адаптивный иммунный ответ через PRR-рецепторы дендритных клеток (ДК), а также клеток макрофагально-моноцитарного ряда.

В предыдущем обзоре [6] представлены материалы, свидетельствующие о том, что «инициальный» этап высвобождения DAMPs при ИВРЗ связан с процессами системной прогрессирующей дезорганизации рыхлой волокнистой неоформленной соединительной ткани, некроти-

ческой гибелью клеток и РГК, с обязательным вовлечением в патологический процесс стенок сосудов. Эти явления, в аспекте динамики развития патологического процесса на светооптическом уровне, согласно Klempereger P. [69], а также Струкову А.И. и Берляряну А.Г. [7], претерпевают стадийность. Начальная стадия связана с мукоидным набуханием (слизистый отек) основного вещества соединительной ткани. Следующая стадия — стадия фибриноидных изменений, и на этой стадии фибриноидный некроз, являясь этапом необратимого ремоделирования соединительной ткани, становится источником массивного выделения и поступления в кровото- и лимфоток преимущественно внеклеточных DAMPs. На этом фоне формируется важнейшее патогенетическое звено продуктивного воспаления при ИВРЗ — формирование клеточного воспалительного инфильтрата (КВИ). КВИ представлен неорганизованной формой — диффузным клеточным инфильтратом и организованными формами в виде эктопических фолликулоподобных лимфоидных структур (ELS) и ГЗТ-гранулем.

На завершающей стадии указанных процессов превалируют процессы фиброза и склероза, при которых ключевое значение приобретает активность фибробластов. Все вышеобозначенные процессы в полной мере относятся и к стенкам сосудов, что обуславливает формирование васкулитов.

Представленные изменения относятся к категории типовых патологических процессов, основанных на уникальном качестве реактивности рыхлой волокнистой неоформленной соединительной ткани, состоящей в том, что воздействие различных по своим характеристикам флогенов сопровождается однотипной реакцией этой ткани, в каких бы органах она ни располагалась.

Важной особенностью продуктивного воспаления и формирования КВИ при ИВРЗ является отсутствие этиологически значимых микроорганизмов, размножение и жизнедеятельность которых обуславливало бы формирование основных звеньев патогенеза ИВРЗ. Подобный вид воспаления носит название стерильного, в этиологии которого доминирующими являются провоспалительные вне- и внутриклеточные DAMPs, генерирующиеся при системной прогрессирующей дезорганизации рыхлой волокнистой неоформленной соединительной ткани, РГК и некрозе клеток [3, 28, 111, 151].

В условиях иммунозависимого стерильного воспаления эволюционно закрепленные генетические механизмы внутри- и внеклеточных моле-

кулярных процессов (прежде всего ферментных) приобретают характер фундаментальных, что обуславливает широкие терапевтические перспективы как в отношении разработки средств и методов воздействия на молекулярно-клеточные мишени, так и в отношении идентификации кандидатных генов, ассоциированных с ИВРЗ.

Модель Janeway С.А. связывала индукцию анти-инфекционного иммунного ответа с взаимодействием PRR-рецепторов на клетках врожденного иммунитета с PAMPs патогенов и последующей активацией АГ-специфического адаптивного анти-инфекционного иммунного ответа. Следствием подобного рода процессов является продукция АТ, специфичных к эпитопам соответствующего патогена, а также индукция АГ-специфических CD8⁺T-цитотоксических клеток. Тестирование указанных показателей является широко распространенным в диагностической практике.

Однако, в связи с появлением «теории опасности» Polly Matzinger в 1994 г. и результатами последующих многочисленных исследований, все фундаментальные молекулярно-клеточные механизмы PRR-PAMPs взаимодействий оказались применимы и в отношении PRR-DAMPs взаимодействий. Таким образом, стало очевидным, что «анти-инфекционный иммунитет» представляет собой только часть всеобъемлющего механизма индукции иммунного ответа, направленного на поддержание структурно-функционального постоянства внутренней среды организма.

Соответственно, если при анти-инфекционном АГ-специфическом иммунном ответе генерируются АГ-специфические анти-инфекционные АТ и АГ-специфические анти-инфекционные CD8⁺T-цитотоксические клетки, то при стерильном АГ-специфическом иммунном ответе в организме генерируется весь спектр нозологически и DAMP-специфичных ауто-АТ и DAMP-специфических ауто-CD8⁺T-цитотоксических клеток.

Важным и неотъемлемым компонентом патогенетической динамики воспаления при ИВРЗ являются молекулярно-клеточные следствия регулируемой и некритической гибели клеток в КВИ. В обзоре [5] показано, что наиболее значимыми видами регулируемой (некоторые исследователи используют термин «программируемой») гибели клеток в КВИ при ИВРЗ являются аутофагия, апоптоз, некроптоз, пироптоз и нектоз. По каскаду молекулярно-клеточных процессов между ними существует тесная взаимосвязь. Эта взаимосвязь сформировалась в процессе биологической эволюции, отличается высоким

консерватизмом и подчиняется общебиологическим закономерностям молекулярно-клеточных процессов в клетке. Важнейшим качеством указанных видов РГК является продукция провоспалительных вне- и внутриклеточных DAMPs, инициирующих стерильное воспаление при ИВРЗ.

Однако проводить знак равенства между механизмами инфекционного и стерильного воспаления нельзя, поскольку только при стерильном воспалении генерация провоспалительных вне- и внутриклеточных DAMPs является «точкой отсчета» запуска патологических процессов при ИВРЗ. Важным, но не единственным, источником DAMPs в этих случаях являются некроз клеток и все виды упомянутых выше РГК.

Каковы же основные молекулярно-клеточные закономерности стерильного воспаления при ИВРЗ?

Стерильное воспаление при иммуновоспалительных ревматических заболеваниях

Стерильное воспаление следует рассматривать как многоступенчатый процесс, при котором индуцируется последовательность реакций, опосредованных лейкоцитами и резидентными клетками макрофагально-моноцитарного ряда, направленных на очищение очага воспаления от клеточного и тканевого детрита, а также провоспалительных DAMPs, присутствующих в *locus morbi*, с последующим восстановлением гомеостаза поврежденной ткани. Для инициирования этой последовательности необходимо острое воспаление. Однако неконтролируемая активность клеток острого воспаления может быть причиной стойкого повреждения тканей, лежащих в основе нозологических форм ИВРЗ. В ситуации, когда стерильный стимул не устранен, существенно возрастает вероятность хронизации воспаления и продолжения повреждения тканей [92, 151].

Ключевой патогенетической особенностью указанных процессов является реактивность PRR-рецепторов и, как следствие, PRR-DAMPs взаимодействия с последующим запуском комплексных, взаимозависимых молекулярно-клеточных процессов, итогом которых является картина локальных и/или системных проявлений стерильного воспаления. Широкая распространенность PRR-рецепторов как на клетках врожденного иммунитета, так и на клетках практически всех гистогенетических линий, определяет фундаментальную роль PRR-рецепторов не только в поддержании тканевого гомеостаза, но и в важном качестве ИВРЗ — прогрессирующем течении и полиорганности поражения. С учетом того, что следствием PRR-DAMPs взаимодей-

ствий является активация врожденного иммунитета, динамика патологических изменений позволяет отнести их к категории системных стерильных аутовоспалительных процессов. Наблюдающаяся при этом гиперпродукция IL-1 β и IL-1 α обуславливает мобилизацию эффекторных клеток адаптивной иммунной системы, способствуя экспансии аутореактивных Th1- и Th17-лимфоцитов и ингибируя активность регуляторных Т-лимфоцитов (Treg). Указанные «лимфоцитарные» реакции инициируют собственно аутоиммунные процессы [81].

Свойства DAMPs в контексте иммунновоспалительных процессов

DAMPs были идентифицированы по их способности индуцировать воспалительные реакции *in vitro* и/или *in vivo* и по наблюдаемому уменьшению воспаления при избирательном истощении этих агентов, а также по их способности при исходе воспаления стимулировать тканевые регенераторные процессы в *locus morbi* [72, 130].

С тех пор как «теория опасности» Polly Matzinger стала доминирующей при интерпретации патогенеза стерильного воспаления, количество выявленных и выявляемых DAMPs продолжает увеличиваться.

DAMPs являются эндогенными факторами, высвобождающимися из вне- или внутриклеточного пространства после повреждения ткани или гибели клеток [115].

В норме внутриклеточный материал изолирован от внешней среды целостной плазмолеммой, что предотвращает выход внутриклеточного содержимого из клетки и экранирует от распознавания иммунной системой. При некрозе, РГК или клеточном стрессе эти молекулы высвобождаются во внеклеточную среду с последующим развитием стерильного воспаления.

Некоторые исследователи расширили смысловое содержание термина «DAMPs» и предложили включать в эту категорию продукцию агентов, связанных с нарушением клеточного гомеостаза, в частности при клеточном стрессе, а также молекулярные паттерны, индуцированные гипоксией, ацидозом, окислительно-восстановительным дисбалансом, гипертоническим/гипотоническим стрессом, внутриклеточными ионными нарушениями или нарушениями цитоскелета. При этом DAMPs рассматриваются как «внутренние DAMPs», способные внутриклеточно сигнализировать о ситуации «опасности» [75].

Также были предложены новые термины, такие как «молекулярные паттерны, связанные со стрессом» или «молекулярные процессы, изменяющие гомеостаз», расширяющие перечень

агентов, связанных с нарушением клеточно-тканевого гомеостаза [142, 144].

В последнее время в перечень DAMPs включены «сигналы опасности», обладающие подавляющими/ингибирующими эффектами относительно стерильного воспаления. Подобного рода «сигналы опасности» получили название SAMPs (suppressing-associated molecular patterns) [75].

Баланс между уровнями DAMPs и SAMPs необходим для достижения полного поствоспалительного гомеостатического восстановления и репарации ткани. К числу SAMPs относят простагландин E2 (PGE2), резольвины, протектины, марезины и липоксины, которые способствуют разрешению воспалительного процесса и стимулируют регенерацию тканей [49].

Lang W.G. и соавт. (2020) предлагают модель количественного гомеостатического соотношения DAMP:SAMP по уровню этих агентов в сыворотке крови. Расчет соотношения DAMP:SAMP позволяет определить этап стерильного воспаления. В случаях, когда это соотношение превышает 1 (> 1), то эта величина соответствует начальной провоспалительной фазе процесса. Соотношение менее чем 1 (< 1) интерпретируется как фаза разрешения стерильного воспаления [76].

Подобно воспалению, вызванному PAMPs патогенов, DAMPs активируют, прежде всего, клетки врожденной иммунной системы, экспрессирующие PRR-рецепторы, — моноциты/макрофаги, дендритные клетки, нейтрофилы, естественные киллеры (NK), а также неиммунные клетки, такие как эпителиоциты, эндотелиоциты (включая «высокие» эндотелиоциты 2-го типа), фибробласты, эозинофилы, тучные клетки, альвеолоциты, гепатоциты, базофилы, врожденные лимфоидные клетки (см. ниже), клетки центральной нервной системы, мышечные клетки. Столь широкий перечень клеток, реагирующих на DAMPs, позволяет утверждать, что любая жизнеспособная клетка включает в себя мембранные и цитозольные механизмы реагирования на нарушение клеточного гомеостаза.

Перечисленные клетки, участвующие в стерильном воспалении, экспрессируют все четыре основных подсемейства PRR-рецепторов — TLR-рецепторы, NLR-рецепторы, RLR-рецепторы и CLR-рецепторы лектина C-типа. Все перечисленные PRR-рецепторы обладают способностью взаимодействовать со всеми видами провоспалительных DAMPs. DAMPs также активно взаимодействуют и с не-PRR-рецепторами, такими как рецептор конечных продуктов расширенного гликирования (RAGE), CD44, интегрины и CD91. Свойства PRR-рецепторов, важных при

интерпретации патогенеза ИВРЗ, представлены в предыдущем обзоре [4].

С учетом того, что эпителиальная выстилка (кожа, дыхательные пути, желудочно-кишечный тракт, урогенитальный тракт) является первым барьером, с которым сталкиваются патогены, отметим, что эпителиальные клетки, активированные DAMPs, влияют на реактивность клеток врожденного и адаптивного иммунитета посредством продукции провоспалительных цито- и хемокинов, а также экспрессии аллелей МНС класса I и II и костимулирующих молекул. Эндотелиоциты при стерильном воспалении способствуют привлечению иммунных клеток в поврежденную ткань посредством выработки провоспалительных цитокинов, экспрессии молекул адгезии и изменения проницаемости сосудов. Активным участником стерильного воспаления являются и фибробласты, регулирующие функциональную активность клеток врожденного и адаптивного иммунитета посредством выработки провоспалительных цитокинов, хемокинов и факторов роста, а также стимулирующие процессы фиброза, склероза и тканевой регенерации [151].

Как указывалось выше, важным следствием некротической гибели клеток, а также РГК является потеря целостности плазмалеммы и выход внутриклеточного материала во внешнюю среду. В предыдущем обзоре были представлены материалы, свидетельствующие о том, что такие виды РГК, как аутофагия, апоптоз, некроптоз, пироптоз и нетоз, являются основным источником провоспалительных DAMPs при ИВРЗ [5]. Такие конститутивно экспрессируемые и компартиментализирующиеся в ядре, митохондриях и цитозоле DAMPs относятся к внутриклеточным и подразделяются на митохондриальные DAMPs, ядерные DAMPs, цитозольные DAMPs, к ним также относят и белки теплового шока (HSP) [115, 122, 145].

Из перечня внутриклеточных DAMPs наибольшее патогенетическое значение при ИВРЗ имеют следующие: ассоциированный с хроматином высокомолекулярный негистоновый ядерный белок группы box 1 (HMGB1), белки теплового шока (HSP), пуриновые метаболиты, такие как АТФ и мочевая кислота, гистоны, белки S100, белки плазмы, такие как фибриноген, Gc-глобулин, сывороточный амилоид А (SAA). Все перечисленные соединения обладают способностью взаимодействовать с TLR-рецепторами и RAGE-рецепторами [113, 124].

Отметим, что в условиях продуктивного стерильного воспаления *in situ* может сформироваться порочный круг, когда высвободившиеся

DAMPs способны модулировать гибель клеток хозяина посредством взаимодействия с их PRR-рецепторами. Это взаимодействие, в свою очередь, сопровождается индукцией всех форм РГК с последующей активацией множественных провоспалительных сигналов, способствующих усилению воспалительного процесса и выбросом дополнительных порций DAMPs, которые, в свою очередь, способствуют прогрессированию стерильного воспаления.

Внеклеточные DAMPs высвобождаются в результате деградации внеклеточного матрикса во время повреждения тканей, в частности, рыхлой волокнистой неоформленной соединительной ткани. При этом такие фрагменты внеклеточного матрикса, такие как гиалуроновая кислота, гепарансульфат, бигликаны, коллаген, ламинин и эластин образуются в результате протеолиза ферментами, высвобождаемыми из умирающих клеток, или в результате протеолиза матриксными металлопротеиназами (MMP1-MMP9), активируемыми в процессе регенерации и ремоделирования тканей [12, 115].

Наиболее распространенными индукторами стерильного воспаления, в том числе и при ИВРЗ, являются DAMPs, высвобождающиеся при некротической гибели клеток, именуемом некровоспалением. Воздействие некротизирующих факторов (инфекции, токсины, травма, ишемия, гипоксия) сопровождается набуханием клеток, разрывом плазмалеммы и выходом во внеклеточную среду АТФ, HMGB1, АТФ, гистонов, HSP, ДНК, РНК [91].

Важным источником провоспалительных DAMPs при ИВРЗ, как отмечалось выше, являются все виды РГК. На рисунке 1 представлены основные внутриклеточные процессы, приводящие к выделению DAMPs при апоптозе, некроптозе, пироптозе и ферроптозе.

Несмотря на то, что как внеклеточные, так и внутриклеточные DAMPs неоднородны структурно и по химической природе, стерильная воспалительная реакция на эти стимулы, в частности по сосудистым и клеточным проявлениям, как правило, однотипна. Стереотипность этой реакции настолько выражена, что по патоморфологическим признакам возможно определение даже времени повреждения ткани [111].

Внеклеточные DAMPs вовлекают множественные PRR-рецепторы, инициируя быструю воспалительную реакцию. Активированные IL-1 α и IL-33 ДК и Мф начинают *de novo* синтез дополнительных растворимых DAMPs, пополняя тем самым пул внеклеточных DAMPs. Одновременно ряд молекул, которые в норме являются

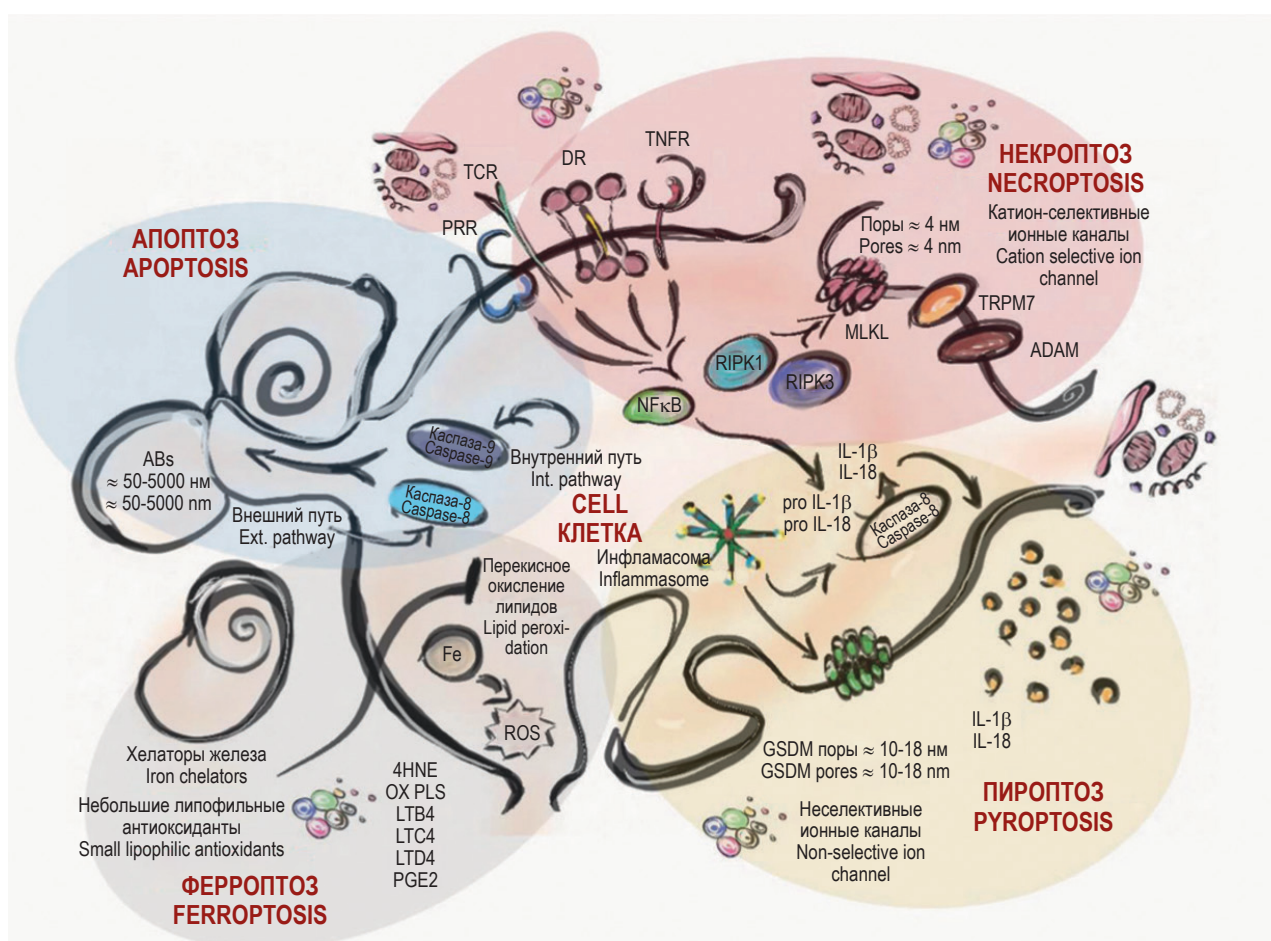


Рисунок 1. Основные процессы, приводящие к выделению DAMPs при апоптозе, некроптозе, пироптозе и ферроптозе, пояснения в тексте, по материалам [91]

Примечание. Сокращения: PRR – образ распознающие рецепторы; DR – рецептор смерти; GSDM – газдермины, поры-формирующие белки; ADAM – металлопротеиназы семейства ADAM; TRPM7 – рецептор катионного канала подсемейство M, член 7; 4HNE – 4-гидроксиноненал; PGE2 – простагландин E2; OX PLS – окисленные глицерофосфолипиды; LTB4 – лейкотриен B4; LTC4 – лейкотриен C4; LTD4 – лейкотриен D4; RIPK1 – рецепторно-взаимодействующая серин/треониновая протеинкиназа; MLKL – доменоподобная псевдокиназа смешанной линии.

При апоптозе, в целом имеющем противовоспалительный характер, внутриклеточные процессы, регулируемые каспазами, приводят к трансформации внутриклеточных компонентов и формированию апоптосом. Последующий эффероцитоз (см. ниже) предотвращает высвобождение DAMPs во внеклеточное пространство. Формирование некрсомы в процессе некроптоза приводит к активации катион-селективных ионных каналов, что приводит к лизису клеток вследствие осмотического шока. Пироптоз характеризуется секрецией провоспалительных цитокинов IL-1β и IL-18 путем активации инфламасом и образованием объемных неселективных пор, образованных GSDMs. При ферроптозе окислительные процессы сопровождаются накоплением токсичных перекисей липидов, которые в конечном итоге вызывают выделение DAMPs.

Figure 1. Main processes leading to the release of DAMPs during apoptosis, necroptosis, pyroptosis and ferroptosis, explanations in the text, based on materials [91]

Note. Abbreviations: PRR, image-recognizing receptors; DR, death receptor; GSDM, gasdermines, pores-forming proteins; ADAM, metalloproteinases of the ADAM family; TRPM7, cation channel receptor subfamily M, member 7; 4HNE, 4-hydroxynonenal; PGE2, prostaglandin E2; OX PLS, oxidized glycerophospholipids; LTB4, leukotriene B4; LTC4, leukotriene C4; LTD4, leukotriene D4; RIPK1, receptor-interacting serine/threonine protein kinase; MLKL, domain-like pseudokinase of the mixed line.

In apoptosis, which is generally anti-inflammatory in nature, intracellular processes regulated by caspases lead to the transformation of intracellular components and the formation of apoptosomes. Subsequent efferocytosis (see below) prevents the release of DAMPs into the extracellular space. The formation of necrosome during necroptosis leads to the activation of cation-selective ion channels, which leads to cell lysis due to osmotic shock. Pyroptosis is characterized by the secretion of proinflammatory cytokines IL-1β and IL-18 by activation of inflammasomes and the formation of voluminous nonselective pores formed by GSDMs. In ferroptosis, oxidative processes are accompanied by the accumulation of toxic lipid peroxides, which eventually cause the release of DAMPs.

изолированными компонентами экстрацеллюлярного матрикса, могут быть протеолитически высвобождены после повреждения ткани и затем действовать в своей растворимой форме в качестве DAMPs, в частности бигликан и тенасцин С [116].

С учетом способности DAMPs влиять на гибель клеток посредством взаимодействия со всеми PRR-рецепторами клеток врожденного иммунитета и модификации этих молекул при патологических процессах, появилась необходимость дополнительного разделения DAMPs на конститутивные DAMPs (сDAMP) и индуцируемые DAMPs (iDAMPs) [151].

К сDAMP принадлежат конститутивно экспрессируемые эндогенные молекулы, которые высвобождаются при некрозе клеток и при РГК и которые не модифицируются во время их гибели. сDAMP локализуются в ядре, митохондриях и цитозоле и невидимы для сенсоров иммунной системы. К ним относят АТФ, HMGB1, кристаллы мочевой кислоты, гистоны. Также к сDAMP относят структурные компоненты рыхлой волокнистой неоформленной соединительной ткани — гиалуронан, коллаген, ламинин и эластин. сDAMP взаимодействуют с PRR-рецепторами на ДК, обеспечивая в том числе и миграцию этих клеток в дренирующие лимфатические узлы [126].

К iDAMPs относятся внутриклеточные эндогенные молекулы, высвобождающиеся при неапоптотических видах запрограммированной гибели клеток — некроптозе, пироптозе и нетозе [5]. iDAMPs генерируются в результате «неотранскрипции, неотрансляции и посттрансляционных модификаций». Указанные молекулярно-структурные процессы варьируют в зависимости от вида клеточной гибели. Примером посттрансляционной модификации iDAMPs является генерирование IL-1 β и IL-18 из их предшественников, опосредованной активностью провоспалительных каспазы-1 или каспазы-11, которое происходит в процессе пироптоза [20].

К важнейшим представителям iDAMPs относят IFN I типа, а также белки клеточного стресса (белки теплового шока — HSP), которые задействованы во время повреждения тканей и могут быть презентированы АПК в качестве ауто-АГ.

Перечень DAMPs, индуцирующих стерильное воспаление при ИВРЗ, наряду с их происхождением и DAMP-чувствительными рецепторами, представлен в таблице 1.

Как видно из таблицы 1, все патогенетически значимые при ИВРЗ DAMPs имеют как внеклеточное, так и внутриклеточное происхождение.

DAMP-чувствительные рецепторы относятся преимущественно к группе PRR-рецепторов, из которых наиболее активное участие принадлежит TLR4 и TLR2.

Однако необходимо обратить внимание на следующее обстоятельство. Поскольку патофизиологической основой возникновения, развития и исхода ИВРЗ является системная прогрессирующая дезорганизация рыхлой волокнистой неоформленной соединительной ткани, то в этих условиях одним из основных источников провоспалительных эндогенных DAMPs являются продукты протеолиза внеклеточного матрикса соединительной ткани, осуществляемым матриксными металлопротеиназами (MMP-2, MMP-3, MMP-13), MMP семейства ADAM, гранзимом В и костным морфогенетическим протеином (BMP-1). К ним относятся бигликан, декорин, версикан, продукты протеолитической деградации коллагенового каркаса, гиалуронан, тенасцин-С, фибриноген и фрагменты гепаран-сульфата. Все указанные соединения были идентифицированы как DAMPs, взаимодействующие в первую очередь с TLR4 и TLR2, а также с пуриnergическими рецепторами P2X7/P2X4, белком 6 связанным с рецепторами липопротеинов низкой плотности (LRP6) [98, 147].

Особенностью указанных «соединительнотканых» DAMPs является то, что для реализации функций провоспалительных стерильных агентов эти DAMPs должны, во-первых, присутствовать в растворимой форме, поскольку, будучи связанными с внеклеточным матриксом, они не могут действовать как DAMPs. Во-вторых, их провоспалительный эффект потенцируется путем протеолитического высвобождения из внеклеточного матрикса без необходимости синтеза *de novo*. В-третьих, макрофаги, присутствующие в КВИ, стимулируемые провоспалительными цитокинами, сами начинают синтезировать эти соединения *de novo*, в частности бигликан [103].

DAMP-чувствительные рецепторы при стерильном воспалении

Генерализованность патофизиологических эффектов провоспалительных DAMPs, и соответственно, системность и полиорганность поражения тканей и внутренних органов при ИВРЗ обусловлено широкой распространенностью рецепторов к «сигналам опасности». Именно мембранный и внутриклеточный рецепторный аппарат и его представительство практически на всех клетках организма обеспечивает реализацию указанных клинических проявлений.

За последние 20 лет было обнаружено множество рецепторов DAMPs, изучены сигнальные

ТАБЛИЦА 1. ВНЕ- И ВНУТРИКЛЕТОЧНЫЕ DAMPs, ИНДУЦИРУЮЩИЕ СТЕРИЛЬНОЕ ВОСПАЛЕНИЕ ПРИ ИММУНОВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ РЕВМАТИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ

TABLE 1. EXTRACELLULAR AND INTRACELLULAR DAMPs INDUCING STERILE INFLAMMATION IN IMMUNO-INFLAMMATORY RHEUMATIC DISEASES

DAMPs	DAMP-чувствительные рецепторы DAMP-sensitive receptors
Межклеточный матрикс (протеогликаны, гликозаминогликаны, гликопротеины) Extracellular matrix (proteoglycans, glucosaminoglycans, glycoproteins)	
Бигликан Biglican	TLR2, TLR4, NLRP3
Декорин Decorin	TLR2, TLR4
Версикан Versikan	TLR2, TLR6, CD14
LMW гиалуронан LMW hyaluronan	TLR2, TLR4, NLRP3
Гепаран сульфат Heparan Sulfate	TLR4
Фибронектин (FDA домен) Fibronectin (EDA domain)	TLR4
Фибриноген Fibrinogen	TLR4
Тенасцин С Tenascin C	TLR4
Цитозольные DAMPs Cytosol DAMPs	
Мочевая кислота Uric acid	NLRP3, P2x7
S100 белок S100 protein	TLR2, TLR4, RAGE
Белки теплового шока (HPS) Heat Shock Proteins (HSP)	TLR2, TLR4, CD91
АТФ ATP	P2X7, P2Y2
F-актин F-actin	DNGR-1
Циклофилин А Cyclophilin A	CD147
Ядерные DAMPs Nuclear DAMPs	
Гистоны Histones	TLR2, TLR4
Негистоновый ядерный высокомоби́льный групповой белок 1 (HMGB1) Non-histone nuclear highly mobile group (HMGB1)	TLR2, TLR4, RAGE
Негистоновый хромосомный протеин (HMG-14) Non-histone chromosomal protein HMG-14	TLR4
IL-1α	IL-1R
IL-33	ST2
Субъединица гистонового деацети́лированного комплекса (SAP130) Histone deacetylase complex subunit SAP130	Mincle

Таблица 1 (окончание)
Table 1 (continued)

DAMPs	DAMP-чувствительные рецепторы DAMP-sensitive receptors
ДНК DNA	TLR9, AIM2
РНК RNA	TLR3, TLR7, TLR8, RIG-1, MDA5
Митохондриальные DAMPs Mitochondrial DAMPs	
Митохондриальная ДНК (mtDNA) Mitochondrial DNA (mtDNA)	TLR9
Митохондриальный транскрипционный фактор А (TFAM) Mitochondrial transcription factor A (TFAM)	RAGE
Формил пептиды Formyl peptides	FPR1
Эндоплазматический ретикулум Endoplasmic reticulum	
Кальретикулин Calreticulin	CD91
Внутриклеточные гранулы Intracellular granules	
Дефензины Defensins	TLR4
Кателицидин (LL37) Cathelicidin (LL37)	P2X5, FPR2
Эозинофильный нейротоксин (EDN) Eosinophilic Neurotoxin (EDN)	TLR2
Гранулизин Granulysin	TLR4
Плазматическая мембрана Plasma membrane	
Синдеканы Sindicans	TLR4
Глипиканы Glypicans	TLR4

пути и значение в патогенезе различных воспалительных заболеваний. Важным свойством рецепторов DAMPs является их перекрестная реактивность и сопряженность активируемых ими сигнальных путей, что обуславливает определенную патофизиологическую стереотипность клеточного ответа на DAMP-рецепторное взаимодействие.

Все известные рецепторы DAMPs могут быть разделены на две основные группы – это классические PRR-рецепторы и не-PRR трансмембранные белки-рецепторы.

К первой группе относятся:

I – TLR-рецепторы.

Из десяти TLR-рецепторов у человека наиболее активно взаимодействуют с провоспалительными DAMPs при ИБПЗ TLR2, TLR3, TLR4, TLR7 и TLR9.

Нуклеиновые кислоты, высвобождаемые из поврежденных клеток, в частности при СКВ, могут активировать TLR3, TLR7 и TLR9, а внутриклеточные белки, высвобождаемые из поврежденных клеток, и компоненты основного вещества соединительной ткани, подвергшиеся воздействию матриксных металлопротеиназ (MMP1-MMP9), например при РА, могут активировать TLR2 и TLR4 [67].

II – CLR-рецепторы (С-тип лектиновых рецепторов).
Экспрессия CLR-рецепторов традиционно ассоциировалась с индукцией противогрибкового иммунного ответа [51]. Однако некоторые

члены семейства CLR обнаруживают свойства рецепторов DAMPs. Прежде всего это DNGR-1 (CLEC9A) рецептор. DNGR-1-рецептор представляет собой специфичный для дендритных клеток (ДК) рецептор, который взаимодействует с полимерным F-актином, появляющийся во время некротической гибели клеток. DNGR-1 способствует кросс-презентации некротических DAMPs CD8⁺T-цитотоксическим клеткам [128].

Второй рецептор — это индуцируемый макрофагами Ca²⁺-зависимый лектиновый рецептор (сокращенно Mincle), являющийся членом суперсемейства лектинов C-типа, кодируемого геном CLEC4E. Mincle-рецептор взаимодействует с гликолипидами и белками поврежденной ткани [32].

Третий рецепторный лектин C-типа, взаимодействующий с провоспалительными DAMPs — это Дектин-1. Дектин-1 является хорошо изученным CLR-рецептором, отвечающим за распознавание β-глюканов, а также принимающий участие в контроле грибковой инфекции. Дектин-1 индуцирует адаптивный иммунитет, стимулируя реакции Th1- и Th17-клеток [29].

III — семейство цитоплазматических пиринновых NLR-рецепторов. Особенностью этих рецепторов является их способность инициировать сборку инфламмасом, которые индуцируют секрецию IL-1β и IL-18, что является характерной чертой такого варианта РГК, как пироптоз. При ИВРЗ (СКВ, РА, болезнь Шегрена) наиболее важной из всех инфламмасом является NLRP3-инфламмасома [86].

IV — RIG-I-подобные рецепторы (индуцируемые ретиноевой кислотой ген-I-подобные рецепторы, или RLR-рецепторы). Оптимальными лигандами для RIG-I являются такие DAMPs, как короткие РНК, несущие 5'-дифосфатный или трифосфатный фрагмент, а также двухцепочечные РНК [112].

V — цитоплазматические ДНК сенсоры (CDS-рецепторы).

В роли этих сенсоров выступают циклическая GMP-AMP-синтаза (cGAS) и белок AIM2, способствующий формированию особого типа инфламмасы — ДНК-инфламмасы. Указанные цитоплазматические ДНК-сенсоры взаимодействуют с такими внутриклеточными DAMPs, как ядерная ДНК и митохондриальная ДНК, появляющиеся при некрозе клеток или РГК [70].

Ко второй группе рецепторов DAMPs относятся следующие не-PRR трансмембранные белки-рецепторы:

I — рецептор для конечных продуктов расширенного гликирования — RAGE-рецептор.

Экспрессируется множеством типов клеток, включая моноциты, нейтрофилы, эндотелиальные клетки, клетки гладкой мускулатуры. Может связывать такие DAMPs, как конечные продукты расширенного гликирования (AGEs), белки HMGB1, S100, Аβ, гистоны, фибриноген, сывороточный амилоид А (SAA), ДНК и белки теплового шока (HSP) [56].

II — запускающие рецепторы, экспрессируемые на миелоидных клетках, обозначаемые как TREM1 и TREM2. TREM1 и TREM2, являются врожденными иммунными рецепторами клеточной поверхности, принадлежащими к суперсемейству иммуноглобулиновых рецепторов.

TREM1 экспрессируется на миелоидных клетках, включая моноциты/макрофаги, нейтрофилы и дендритные клетки, а также на неиммунных клетках, таких как эпителиоциты и фибробласты [125].

В отличие от TREM1, TREM2 не экспрессируется нейтрофилами, но высоко экспрессируется другими типами миелоидных клеток, такими как дендритные клетки, макрофаги костного мозга и тканеспецифичные макрофаги [60].

Активация TREM1 на нейтрофилах и моноцитах активирующим антителом не только запускала секрецию провоспалительных цитокинов и хемокинов, но и усиливала воспалительные реакции за счет синергизма с TLR-рецепторами.

В качестве лигандов для TREM1 выступают такие DAMPs, как HMGB1, HSP70, распознающий пептидогликан протеин-1 (PGLYRP1) и экстрацеллюлярный актин [42].

Поскольку HMGB1, HSP70 и актин также могут высвобождаться погибшими клетками в стерильных условиях, TREM1 также может усиливать провоспалительные иммунные реакции в ответ на стерильное повреждение. Ингибирование экспрессии TREM1 генетическими или фармакологическими методами подавляет хемотаксис и активацию иммунных клеток и ограничивает развитие воспалительных заболеваний, в частности при РА. Более того, экспрессия TREM1 резко повышается при различных состояниях, которые включают стерильное воспаление, таких как повреждение тканей и фиброз, РА, атеросклероз и рак [125].

DAMPs, высвобождаемые при повреждении тканей, увеличивают экспрессию TREM1 и способствуют его активации, что может запускать и усиливать стерильный иммунный ответ. Экспрессия генетических вариантов TREM2 может увеличивать риск развития нейродегенеративных расстройств.

III — Ca²⁺-чувствительные рецепторы.

Некротические клетки выделяют большое количество Ca^{2+} во внеклеточное пространство, который действует как хемокин для привлечения моноцитов/макрофагов к местам повреждения тканей посредством активации трансмембранных Ca^{2+} чувствительных рецепторов на этих клетках.

Кроме того, внеклеточный Ca^{2+} может функционировать как DAMP, который стимулирует высвобождение Ca^{2+} в эндоплазматическом ретикулуме и активацию NLRP3-инфламмосомы [77].

IV — ионные каналы.

С провоспалительными DAMPs взаимодействуют два типа ионных каналов. Это каналы перехода рецепторного потенциала — TRP и рецепторы P2X, активирующие различные иммунные клетки.

TRP-рецепторы способствуют стерильному воспалению, взаимодействуя с активными формами O_2 (АФК) и АТФ, которые выделяются из поврежденных митохондрий. Высокие уровни АФК были классифицированы многими исследователями как DAMP, поскольку АФК оказывает повреждающее действие на ткани. TRP-рецепторы (в частности такой представитель, как TRPM2) способствуют попаданию АФК в ткани и АФК-индуцированному притоку Ca^{2+} [113, 143].

Рецепторы P2X, активируя факторы транскрипции, в частности NF- κ B, усиливают продукцию различных цитокинов и хемокинов в различных иммунных клетках и рекрутирование нейтрофилов [114].

Один из представителей этого семейства — рецептор P2X7R — является одним из наиболее мощных активаторов стерильного воспаления с участием NLRP-инфламмосомы с последующим высвобождением зрелого IL-1 β макрофагами, дендритными клетками и нейтрофилами. Чрезмерная активация P2X7R может индуцировать гибель клеток, что усиливает высвобождение DAMPs и стерильное воспаление [36].

V — рецепторы, связанные с G-белком (GPCRs).

DAMPs могут индуцировать стерильное воспаление через GPCRs. В частности, рецептор N-формилпептида (For) взаимодействует с эндогенными N-формилированными пептидами. Другой представитель этой группы рецепторов — P2YRs — распознает внеклеточные нуклеотиды [139].

Таким образом, спектр DAMP-чувствительных рецепторов при стерильном воспалении, имеющих несомненное патогенетическое значение при ИВРЗ, довольно широк и многообразен. В таблице 2 обобщены представленные выше данные по DAMP-чувствительным рецепторам, лигандами которых выступают компоненты основного

вещества рыхлой волокнистой соединительной ткани, а также белковые, липидные, углеводные соединения, имеющие характеристики провоспалительных DAMPs.

Как видно из таблицы 2, экспрессия рецепторов провоспалительных DAMPs, имеющих патогенетическое значение при ИВРЗ, включает в себя широкий перечень иммунных и неиммунных клеток. Столь широкое распространение этих рецепторов обеспечивают генерализацию, полиорганность, системность и хронизацию стерильного воспаления при ИВРЗ.

Перекрестная реактивность DAMP-чувствительных рецепторов

Важным качеством DAMP-чувствительных рецепторов является их перекрестная реактивность. Наряду с широкой экспрессией этих рецепторов практически на всех клетках различных гистогенетических линий, их перекрестная реактивность вносит дополнительный вклад в инициирование, усиление, генерализацию и разрешение стерильного воспаления.

Речь идет, прежде всего, о способности двух или более DAMP-чувствительных рецепторов взаимодействовать с одним типом DAMP и синергически генерировать множественные эффекторные реакции. В частности, такие рецепторы DAMPs, как TLR2, TLR4, RAGE и TREM1, активируются HMGB1 и индуцируют выработку провоспалительных цитокинов, а также способствуют миграции, пролиферации и дифференцировке различных иммунных клеток.

Другим примером является выделение ядерной ДНК при повреждении клеток, например при СКВ, взаимодействующей как cGAS, так и AIM2, индуцирующую продукцию IFN I- и каспаза-1-зависимую секрецию IL-1 β и IL-18, а также процесс пироптоза [50, 53].

Кроме этого, два или более DAMP-чувствительных рецепторов могут быть последовательно активированы одним и тем же DAMP. Такие эндогенные DAMPs, как Alu-PHK, Ca^{2+} , MSU и АТФ, сначала активируют передачу сигналов с таких DAMP-чувствительных рецепторов, как GAS, CaSR/GPRC6A, TRPM2 и P2X7R соответственно, и активация этих рецепторов затем индуцирует сборку воспалительной инфламмосомы NLRP3 [66, 149].

Третьим важным качеством перекрестной реактивности DAMP-чувствительных рецепторов является их способность взаимодействовать друг с другом, тем самым усиливая свои реакции. Например, HMGB1 может связываться с эндогенной ДНК и, взаимодействуя со своим RAGE-рецептором, усиливать ДНК-индуцированную

ТАБЛИЦА 2. DAMP-ЧУВСТВИТЕЛЬНЫЕ РЕЦЕПТОРЫ ПРИ СТЕРИЛЬНОМ ВОСПАЛЕНИИ

TABLE 2. DAMP-SENSING RECEPTORS INVOLVED IN STERILE INFLAMMATION

DAMP-чувствительные рецепторы DAMP-sensing receptors	Клетки, экспрессирующие DAMP-чувствительные рецепторы Cells expressing DAMP sensing receptors	DAMPs	Провоспалительные эффекты Proinflammatory effects
TLR-рецепторы TLR receptors			
TLR2	Дендритные клетки, моноциты, макрофаги, нейтрофилы Dendritic cells, monocytes, macrophages, neutrophils	HMGB1, HSP, SNAPIN, версикан, бигликан, декорин, эозинофильный нейротоксин, сурфактантный белок A/D, β -дефензин 3, гистоны, SAA, A β , β 2-гликопротеин I HMGB1, HSP, SNAPIN, versican, biglycan, decorin, eosinophil-derived neurotoxin, surfactant protein A/D, β -defensin 3, histones, SAA, A β , β 2-glycoprotein I	Способствуют выработке провоспалительных цитокинов и хемокинов Promotes the production of pro-inflammatory cytokines and chemokines
TLR3	Дендритные клетки, моноциты, макрофаги, NK-клетки Dendritic cells, monocytes, macrophages, NK cells	mРНК mRNA	Способствует выработке провоспалительных цитокинов, хемокинов и IFN I типа Promotes the production of pro-inflammatory cytokines, chemokines and IFN I type
TLR4	Дендритные клетки, моноциты, макрофаги, нейтрофилы, эндотелиоциты Dendritic cells, monocytes, macrophages, neutrophils, endothelial cells	HMGB1, тенасцин-С, HSP, S100s, HMGN1, бигликан, декорин, гепарин сульфат, гиалуроновая кислота, фибриноген, фибронектин, сурфактантный белок A/D, β -дефензин 2, гистоны, SAA, лактоферин, нейтрофильная эластаза HMGB1, tenascin-C, HSP, S100s, HMGN1, biglycan, decorin, heparin sulfate, hyaluronic acid, fibrinogen, fibronectin, surfactant protein A/D, β -defensin 2, histones, SAA, neutrophil elastase	Способствует выработке провоспалительных цитокинов, хемокинов и IFN I типа Promotes the production of pro-inflammatory cytokines, chemokines and IFN I type
TLR7	Дендритные клетки, моноциты, макрофаги, В-клетки Dendritic cells, monocytes, macrophages, B cells	IgG-рибонуклеопротеиновый комплекс, микроРНК IgG-ribonucleoprotein complex, microRNAs	Способствует выработке IFN α и других цитокинов и хемокинов Promotes the production of IFN α and other cytokines and chemokines
TLR9	Дендритные клетки, моноциты, макрофаги, В-клетки Dendritic cells, monocytes, macrophages, B cells	IgG-хроматиновый комплекс, мтДНК, HMGB1 IgG-chromatin complex, mtDNA, HMGB1	Способствует выработке IFN α и других цитокинов и хемокинов Promotes the production of IFN α and other cytokines and chemokines

Таблица 2 (продолжение)
Table 2 (continued)

DAMP-чувствительные рецепторы DAMP-sensing receptors	Клетки, экспрессирующие DAMP-чувствительные рецепторы Cells expressing DAMP sensing receptors	DAMPs	Провоспалительные эффекты Proinflammatory effects
CLR-рецепторы CLR receptors			
DNGR1	В основном на дендритных клетках Mainly on dendritic cells	F-актин F-actin	Способствует кросс-презентации ДК-антигена CD8 ⁺ клеткам, ингибирует выработку IL-10 Promotes DC antigen cross-presentation, inhibits IL-10 production
MINCLE	Моноциты, макрофаги, дендритные клетки, нейтрофилы и В-клетки Monocytes, macrophages, dendritic cells, neutrophils and B cells	Sin3A-ассоциированный белок 130, β-глюкозилцерамид Sin3A-associated protein 130, β-glucosylceramide	Способствует выработке провоспалительных цитокинов Promotes pro-inflammatory cytokine production
Dectin-1	Моноциты, макрофаги, дендритные клетки, нейтрофилы, тучные клетки, Т- и В-клетки Monocytes, macrophages, dendritic cells, neutrophils, mast cells, T and B cells	N-гликаны N-glycans	Способствует экспрессии IRF5-зависимого гена Promotes IRF5-dependent gene expression
NLR-рецепторы NLR receptors			
NLRP3	Дендритные клетки, нейтрофилы, моноциты и макрофаги Dendritic cells, neutrophils, monocytes and macrophages	MSU, глюкоза, кристаллы холестерина, Аβ, АТФ, oxPAPC, Alu-PHK MSU, glucose, cholesterol crystals, Aβ, ATP, oxPAPC, Alu-RNA	Способствует секреции IL-1β и IL-18 и инициирует пироптоз Promotes IL-1β and IL-18 secretion and initiates pyroptosis
RLR-рецепторы RLR receptors			
RIG-1	Эпителиоциты и миелоидные клетки Epithelial cells and myeloid cells	Эндогенная 5'ppp РНК Endogenous 5'ppp RNA	Способствует выработке IFN I типа и других цитокинов и хемокинов Promotes the production of IFN I type and other cytokines and chemokines
MDA5	Эпителиоциты и миелоидные клетки Epithelial cells and myeloid cells	Неотредактированная длинная собственная дцРНК, эндогенная ретровирусная РНК Unedited long self-dsRNA, endogenous retroviral RNA	Способствует выработке IFN I типа и других цитокинов и хемокинов Promotes the production of IFN I type and other cytokines and chemokines
CDS-рецепторы CDS receptors			
cGAS	Эпителиоциты, дендритные клетки, моноциты, макрофаги и Т-клетки Epithelial cells, dendritic cells, monocytes, macrophages and T cells	Цитоплазматическая ДНК Cytoplasmic DNA	Способствует выработке IFN I типа и других цитокинов и хемокинов Promotes the production of IFN I type and other cytokines and chemokines

Таблица 2 (продолжение)
Table 2 (continued)

DAMP-чувствительные рецепторы DAMP-sensing receptors	Клетки, экспрессирующие DAMP-чувствительные рецепторы Cells expressing DAMP sensing receptors	DAMPs	Провоспалительные эффекты Proinflammatory effects
AIM2	Эпителиоциты, дендритные клетки, моноциты, макрофаги, В-клетки и NK-клетки Epithelial cells, dendritic cells, monocytes, macrophages, B cells and NK cells	Цитоплазматическая ДНК, поврежденная ядерная ДНК Cytoplasmic DNA, damaged DNA in the nucleus	Способствует секреции IL-1 β и IL-18 и инициирует пироптоз Promotes IL-1 β and IL-18 secretion and initiates pyroptosis
RAGE-рецепторы RAGE receptors			
RAGE	Практически на всех клетках On almost all cells	AGEs, HMGB1, S100s, А β , ДНК AGEs, HMGB1, S100s, А β , DNA	Способствует экспрессии провоспалительных генов, а также миграции клеток, пролиферации и апоптозу Promotes the expression of pro-inflammatory genes, as well as cell migration, proliferation and apoptosis
TREM1	Миелоидные клетки, эпителиальные клетки, эндотелиальные клетки и фибробласты Myeloid cells, epithelial cells, endothelial cells and fibroblasts	HMGB1, HSP70, PGLYRP1, актин HMGB1, HSP70, PGLYRP1, actin	Способствует секреции провоспалительных цитокинов и хемокинов Promotes pro-inflammatory cytokine and chemokine secretion
TREM2	Миелоидные клетки, высоко экспрессируются на дендритных клетках, моноцитах, макрофагах и нейтрофилах Myeloid cells, highly expressed in dendritic cells, monocytes, macrophages and neutrophils	PA, PC, PE, PG, PI, PS, CL, SF, SM, APOA1, APOA2, APOB, APOE, APOJ, LDL, HDL, VLDL, Lp(a), HSP60	Модулирует дифференцировку клеток, выживание, фагоцитоз, хемотаксис Modulates cell differentiation, survival, phagocytosis, chemotaxis
TRP- и P2X-рецепторы TRP и P2X receptors			
TRPM2	Практически на всех клетках On almost all cells	АФК ROS	Способствует выработке хемокинов и активации NLRP3 Promotes chemokine production and NLRP3 activation
P2X7R	Практически на всех клетках On almost all cells	АТФ ATP	Способствует выработке цитокинов и хемокинов, активации инфламмасомы NLRP3 и активации Т-клеток Promotes cytokine and chemokine production, NLRP3 inflammasome activation and T cell activation

Таблица 2 (окончание)
Table 2 (continued)

DAMP-чувствительные рецепторы DAMP-sensing receptors	Клетки, экспрессирующие DAMP-чувствительные рецепторы Cells expressing DAMP sensing receptors	DAMPs	Провоспалительные эффекты Proinflammatory effects
Рецепторы, связанные с G-белком (GPCRs) G-protein coupled receptors (GPCRs)			
FRP1, FRP2, P2Y2R, P2Y6R и др./etc.	Эпителиальные клетки, нейтрофилы, дендритные клетки, моноциты, макрофаги, Т-клетки epithelial cells, neutrophils, dendritic cells, monocytes, macrophages, T cells	N-формилированные пептиды, катепсин G, FAM19A4, аннексин 1 N-formylated peptides, cathepsin G, FAM19A4, annexin 1	Способствует хемотаксису нейтрофилов и моноцитов и макрофагов Promotes chemotaxis of neutrophils and monocytes and macrophages

активацию TLR9 с последующей гиперпродукцией провоспалительных цитокинов [127].

Синергическое взаимодействие DAMP-чувствительных рецепторов может способствовать активации множества сигнальных путей. Например, бигликан, являющийся лигандом для TLR2 и TLR4, может вызывать активацию и взаимодействие TLR2 и TLR4 с такими не-PRR-рецепторами, как P2X4R и P2X7R, что стимулирует сборку NLRP3-инфламмосомы [12].

Возможно сопряжение внутриклеточных сигнальных путей. Так, передача сигналов с TREM1 может усиливать воспалительный ответ и индуцировать устойчивую выработку провоспалительных цитокинов за счет синергизма с сигнальными путями активированных TLR-рецепторов [18].

Самопосебеактивация DAMP-чувствительных рецепторов способствует продукции провоспалительных цитокинов, хемокинов и IFN I типа, что, в свою очередь, способствует дальнейшему высвобождению DAMPs и прогрессированию стерильного воспаления.

Такие типичные DAMPs, как HMGB1, S100s и АТР, могут не только пассивно высвобождаться умирающими клетками, но также секретироваться активированными клетками. Например, такие цитокины, как IFN γ , TNF α и IL-1 β , могут индуцировать активную секрецию HMGB1 макрофагами и моноцитами. Эти же цитокины могут увеличивать экспрессию таких DAMP-чувствительных рецепторов, как TLRs, cGAS, RLRs и RAGE [13, 84].

Таким образом сопряжение указанных механизмов перекрестной реактивности DAMP-

чувствительных рецепторов существенно усиливает интенсивность воспалительного процесса и способствует его прогрессированию.

Однако существует несколько механизмов, позволяющих избежать чрезмерной активации DAMP-чувствительных рецепторов. Они включают посттрансляционные модификации, активацию ингибиторов, а также деградацию рецепторов и адапторных молекул.

Прежде всего активация DAMP-чувствительных рецепторов может индуцировать окисление и денатурацию внеклеточных DAMPs. Например, активация передачи сигналов HMGB1–RAGE в эозинофилах индуцирует высвобождение пероксидазы эозинофилов и генерацию АФК, которая окисляет и инактивирует HMGB1 [82].

Кроме этого, активация этих рецепторов может привести к выработке противовоспалительных медиаторов, подавляющих иммунные реакции. Так, такие противовоспалительные цитокины и липиды, как IL-10 и простагландин D2, могут высвобождаться во время стерильного воспаления, что способствует не только супрессии иммунного ответа, но регенерации и заживлению тканей [71].

Наконец, некоторые DAMP-чувствительные рецепторы могут ингибировать активацию другого сигнального рецепторного пути. Например, активация NLRP3-инфламмосомы ингибирует передачу сигналов cGAS посредством расщепления каспазой-1 cGAS [137].

Основные механизмы перекрестной реактивности DAMP-чувствительных рецепторов представлены на рисунке 2.

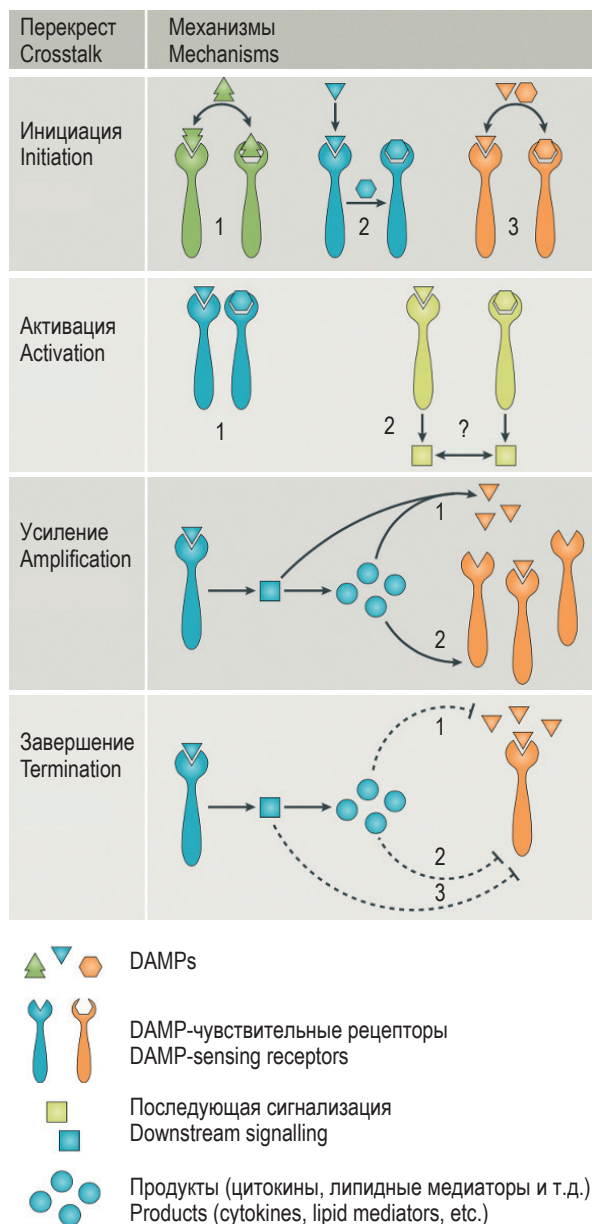


Рисунок 2. Реактивность DAMP-чувствительных рецепторов при инициации, активации, усилении и завершении стерильного воспаления, пояснения в тексте, по материалам [46]

Примечание. Этап инициации:

1. Два или более DAMP-чувствительных рецепторов распознают одну и ту же молекулу DAMP, например, HMGB1 активирует несколько DAMP-чувствительных рецепторов, таких как TLR2, TLR4, RAGE и TREM1.
2. Одна молекула DAMP может активировать два DAMP-чувствительных рецептора, например, АТФ активирует инфламмасому NLRP3 посредством передачи сигналов с двух DAMP-чувствительных рецепторов – cGAS и P2X7R.
3. Одна молекула DAMP взаимодействует с другой молекулой DAMP и способствует активации DAMP-чувствительных рецепторов, например, HMGB1 связывается с ДНК и усиливает ДНК-индуцированную активацию TLR9 посредством другого DAMP-чувствительного рецептора – RAGE.

Этап активации:

1. Два DAMP-чувствительных рецептора взаимодействуют со своими лигандами непосредственно, например, TLR2 и TLR4 взаимодействуют с P2X4 и P2X7.

2. Два DAMP-чувствительных рецептора синергически индуцируют иммунную сигнализацию, например, TREM 1 усиливает воспалительную реакцию за счет синергизма с TLRs.

Этап усиления:

1. DAMPs, после взаимодействия с DAMP-чувствительными рецепторами, индуцируют иммунный ответ и в процессе иммунного ответа секретируются дополнительные порции провоспалительных DAMPs, например, HMGB1 может активно высвобождаться при активации инфламмасы или стимуляции цитокинами.

2. Экспрессия DAMP-чувствительных рецепторов может усиливаться на начальных этапах иммунного ответа, например, продукция IFN I типа при иммунном ответе может увеличить экспрессию cGAS и RLRs.

Этап завершения:

1. Активация DAMP-чувствительных рецепторов индуцирует окисление и денатурацию внеклеточных DAMPs, например, взаимодействие HMGB1–RAGE индуцирует высвобождение эозинофильной пероксидазы и генерацию АФК с последующим окислением и инактивацией HMGB1.
2. Противовоспалительные цитокины и липиды предотвращают активацию DAMP-чувствительных рецепторов, например, IL-10 подавляет DAMP-индуцированный иммунный ответ.
3. Один DAMP-чувствительный рецептор ингибируется другим активированным DAMP-чувствительным рецептором, например, активация инфламмасы ингибирует передачу сигналов cGAS через опосредованное каспазой-1 расщепление cGAS.

Figure 2. Reactivity of DAMP-sensitive receptors during initiation, activation, enhancement and completion of sterile inflammation, explanations in the text, based on materials [46]

Note. The initiation stage:

1. Two or more DAMP-sensitive receptors recognize the same DAMP molecule, for example, HMGB1 activates several DAMP-sensitive receptors such as TLR2, TLR4, RAGE and TREM1.
2. One DAMP molecule can activate two DAMP-sensitive receptors, for example, ATP activates the NLRP3 inflammasome by transmitting signals from two DAMP-sensitive receptors – cGAS and P2X7R.
3. One DAMP molecule interacts with another DAMP molecule and promotes the activation of DAMP-sensitive receptors, for example, HMGB1 binds to DNA and enhances DNA-induced activation of TLR9 through another DAMP-sensitive receptor – RAGE.

Activation step:

1. Two DAMP-sensitive receptors interact with their ligands directly, for example, TLR2 and TLR4 interact with P2X4 and P2X7.
2. Two DAMP-sensitive receptors synergistically induce immune signaling, for example, TREM 1 enhances the inflammatory response due to synergy with TLRs.

The reinforcement stage:

1. DAMPs, after interacting with DAMP-sensitive receptors, induce an immune response and additional portions of pro-inflammatory DAMPs are secreted during the immune response, for example, HMGB1 can be actively released upon activation of the inflammasome or stimulation by cytokines.

2. The expression of DAMP-sensitive receptors can be enhanced at the initial stages of the immune response, for example, the production of type I IFN in the immune response can increase the expression of cGAS and RLRs.

Completion stage:

1. Activation of DAMP-sensitive receptors induces oxidation and denaturation of extracellular DAMPs, for example, the HMGB1–RAGE interaction induces the release of eosinophilic peroxidase and the generation of ROS, followed by oxidation and inactivation of HMGB1.
2. Anti-inflammatory cytokines and lipids prevent the activation of DAMP-sensitive receptors, for example, IL-10 suppresses the DAMP-induced immune response.
3. One DAMP-sensitive receptor is inhibited by another activated DAMP-sensitive receptor, for example, activation of the inflammasome inhibits the transmission of cGAS signals through caspase-1 mediated cleavage of cGAS.

DAMPs при иммуновоспалительных ревматических заболеваниях

Несомненное патогенетическое значение провоспалительных DAMPs подтверждаются результатами многих исследований. Так уровень S100A8/9/11/12 белков был повышен в синовиальной ткани, синовиальной жидкости и в сыворотке крови пациентов с РА [24]. Уровень другого DAMP — HMGB1 — также был повышен в сыворотке крови и синовиальной жидкости у пациентов с РА [45].

Поскольку HMGB1 стимулирует выработку провоспалительных цитокинов, таких как TNF α и IL-1 β , нейтрализация HMGB1 защищает суставной хрящ от деградаци и предотвращает разрушение кости в экспериментальных моделях РА [117].

У пациентов с РА, получавших метотрексат, уровни HMGB1 и матриксных металлопротеиназ — MMP-2 и MMP-13, были снижены по сравнению с уровнями этих соединений в сыворотке крови у пациентов с РА без лечения MTX [79].

Воспаление суставов способствует клеточному стрессу, сопровождающемуся увеличением концентрации стрессовых белков теплового шока (HSP) в синовиальной ткани, в частности, уровень HSP70 и другого белка теплового шока — gp96 — в синовиальной жидкости пациентов с РА был повышен по сравнению с контролем. Авторы относят эти изменения за счет активации Мф посредством передачи сигналов с TLR2 [54, 87].

Цитруллинированные гистоны и их иммунные комплексы функционируют в качестве DAMPs при РА. В частности, цитруллинированный H2B был повышен в синовиальной жидкости пациентов с РА и активировал Мф с последующей выработкой провоспалительных цитокинов (TNF α и IL-1 β). H2B входил в состав провоспалительных IgG-содержащих иммунных комплексов. Более того, иммунизация цитруллинированным H2B индуцировала воспалительный артрит на мышинной модели РА [121].

При СКВ экспрессия HMGB1 была статистически значимо выше по сравнению с контролем и коррелировала с индексом активности заболевания СКВ [8]. При волчаночном нефрите уровень HMGB1 в моче был повышен по сравнению с контролем [63]. Окисленная митохондриальная ДНК (мтДНК) была обнаружена в нейтрофилах крови пациентов с СКВ, кроме этого окисленная мтДНК стимулировала выработку IFN I типа путем активации плазматитоидных ДК [22]. У пациентов с активной СКВ наблюдалось усиленное внеклеточное высвобождение мтДНК как следствие нетоза нейтрофилов. Уровень этих DAMPs коррелировал с индексом активности заболевания, повышенными антителами к мтДНК и показателем IFN I типа [41].

При синдроме Шегрена в слюнных железах документирована гиперэкспрессия TLR9, актив-

но взаимодействующего с митохондриальными DAMPs с последующей индукцией провоспалительного ответа. Соответственно, у пациентов с синдромом Шегрена повышен уровень митохондриальной глутамин-оксалоуксусной трансаминазы (m-GOT) в слюне и у 3-27% пациентов имеются анти-митохондриальные антитела [39].

При дерматомиозите, полимиозите и ювенильном дерматомиозите определяется увеличение количества Нф, подвергшихся нетозу — источнику внутриклеточных провоспалительных DAMPs. Это подтверждается высоким содержанием LL37 в плазме и циркулирующими в крови свободной ДНК (cfDNA) и IL-8. Принципиально такая же картина определялась и при ювенильном идиопатическом артрите с системным началом [37].

Таким образом, даже из представленных неполных данных очевидно, что патогенетическая роль DAMPs при ИВРЗ является ведущей, также не менее очевидно, что коррекция сигнальных провоспалительных путей является перспективным направлением изыскания медикаментозных средств модуляции стерильного воспаления.

Трансэндотелиальная миграция клеток воспалительного инфильтрата при стерильном воспалении

После запуска стерильная воспалительная реакция развиваться очень быстро. Расширение сосудов может произойти в течение нескольких секунд, а выход жидкой части крови и лимфы, а также эмиграция лейкоцитов могут произойти в течение минут или часов [107].

Ключевая роль в этом процессе принадлежит трансэндотелиальной миграции лейкоцитов в очаг воспаления и формирование указанных выше видов КВИ. Не меньшая роль в определении клеточного состава КВИ принадлежит активированным резидентным клеткам макрофагально-моноцитарного ряда и фибробластам. Стерильное воспаление и последующее восстановление тканей зависят от хорошо организованной последовательности миграции лейкоцитов в *locus morbi*.

После того, как лейкоциты транспортируются кровью к месту стерильного воспаления, они должны преодолеть определенные барьеры для выхода из кровотока. Миграция клеток воспалительного инфильтрата через стенку сосуда требует преодоления трех различных барьеров: это миграция через эндотелиальную выстилку, затем через базальную мембрану веноулярного отдела капилляров и венул (поскольку именно из этой части сосудистого русла идет процесс эмиграции лейкоцитов) и оболочку перицита. Все указанные этапы жестко регулируются [106].

Активация эндотелиоцитов медиаторами воспаления является основным этапом миграции лейкоцитов и может быть разделена на два варианта.

Первый вариант активации — быстрый, или I тип, (минуты), независимый от синтеза функционально активных белков (прежде всего адгезинов), второй тип, или II тип, — медленный (часы), при котором активация зависит от синтеза новых белков. При обоих вариантах определяется усиление кровотока и стимуляция кровеносных сосудов *in situ* для эффективного перемещения лейкоцитов, что приводит к типичным клиническим признакам воспаления: *rubor* (покраснение), *calor* (тепло) и *tumor* (припухлость). Четвертый симптом *dolor* (боль) вызывается раздражением сенсорных нервных волокон С-типа медиаторами воспаления [108].

Быстрая активация эндотелиоцитов опосредуется рецепторами, связанными с цитоплазматическими G-белками (GPCRs), такими как гистаминовые H₁-рецепторы. Эти процессы в конечном итоге приводят к выработке простагландина I₂ (PGI₂) и NO, которые являются мощными сосудорасширяющими агентами, а также способствуют увеличению экспрессии Р-селектина за счет быстрого экзоцитоза везикул и индукции кальций-зависимых модификаций клеточной адгезии. Сигналы через GPCRs функционируют в течение 20–30 мин., после чего рецепторы становятся десенсибилизированными. Примером подобной воспалительной реакции с быстрой активацией эндотелиоцитов являются все виды крапивниц.

Медленная активация обеспечивается активацией эндотелиоцитов II типа, при этом главными эффекторными провоспалительными цитокинами являются TNF α и IL-1 [108].

Передача сигналов TNF α в эндотелиоцитах включает активацию транскрипционных факторов — ядерного фактора (NF)- κ B и белка-активатора-1 (AP1) [83]. IL-1 активирует аналогичные пути и этот цитокин в наибольшей степени вовлечен в стерильное воспаление, о чем подробнее будет сказано ниже.

Активация этих факторов транскрипции приводит к индукции синтеза Е-селектина, ICAM1, VCAM1, хемокинов и COX2. Синтез этих молекул занимает часы. Эффекты активации II типа аналогичны активации I типа и включают расширение сосудов, повышенную проницаемость эндотелия и адгезию лейкоцитов [108].

Активация II типа не только более устойчива, чем активация типа I, но и имеет тенденцию развиваться по нарастающей с течением времени. Например, экспрессия Е-селектина постепенно снижается с течением времени, а экспрессия VCAM1, ICAM1 и CCL2 увеличивается, что приводит к переходу от инфильтрата, богатого нейтрофильными клетками, к инфильтрату, богатому мононуклеарными клетками [105].

Активированные эндотелиоциты посткапиллярных венул в условиях усиленного кровотока экспрессируют Е- и Р-селектины. Эти селекти-

ны взаимодействуют с лейкоцитами, экспрессирующими гликозилированные селективные лиганды, такие как гликопротеиновый лиганд Р-селектина-1 — PSGL-1, гликозилированный CD44, лиганд Е-селектина-1. Этот процесс называется «привязыванием или захватом», но из-за преходящего характера этого взаимодействия лейкоциты могут как бы катиться вдоль сосуда, что обозначается термином «роллинг» [78].

Еще одной важной группой белков, способствующей рекрутированию лейкоцитов при стерильном воспалении, являются интегрины. Их конститутивная экспрессия на клетках воспалительного инфильтрата обычно поддерживаются в состоянии низкой аффинности. В процессе роллинга лейкоцитов эндотелиальный Е-селектин индуцирует промежуточное сродство интегринов лейкоцитов. Это запускает низкоаффинные связи между лейкоцитами и эндотелием, что замедляет роллинг лейкоцитов [16].

В результате создаются условия для индукции активирующих эндотелиальных сигналов (хемоаттрактанты и хемокины) и привлечения к месту воспаления лейкоцитов через упомянутые выше цитоплазматические G-белки (GPCRs) на лейкоцитах. В результате между лейкоцитами и эндотелием устанавливается прочная, устойчивая к сдвигу связь. Высокоаффинные интегрины нейтрофилов, такие как α 4 β 7, VLA4 (α 4 β 1) и LFA1 (α L β 2), связываются с соответствующими эндотелиальными лигандами MADCAM1, VCAM1 и ICAM1. Это прочное связывание, или адгезия, приводит к остановке лейкоцитов в месте воспаления [78].

Эффекторные лейкоциты, прочно прикрепившись к эндотелию, инициируют поляризованную подвижность, которая позволяет им перемещаться либо непосредственно через эндотелиальную стенку, либо в пределах веноулярного просвета. Процесс прикрепления и бокового перемещения внутри воспаленных сосудов называется «ползанием», что позволяет лейкоцитам подойти как можно ближе к очагу стерильного повреждения и уменьшить сопутствующий ущерб в здоровых зонах [92].

Молекулярной основой процесса ползания является классический актин-миозиновый механизм, и направление клеточного движения обуславливается градиентами хемокинов и липидных хемоаттрактантов [120]. 80–90% клеток воспалительного инфильтрата проникают в *locus morbi* через межэндотелиальные щели. Эти щели в условиях стерильного воспаления формируются в результате структурно-функциональных изменений адгезионных молекул, таких как VE-кадгерина, семейство соединительных адгезионных молекул JAM и молекулы адгезии ESAM [23].

После проникновения через эндотелий лейкоциты должны преодолеть два дополнительных слоя: базальную мембрану и оболочку перици-

тов. Базальная мембрана представляет собой сложную сеть ламининов и коллагена IV типа. При воспалении зоны низкой плотности ламинина и коллагена IV типа базальной мембраны существенно увеличиваются, что облегчает эмиграцию клеток [133].

Последний барьер формируется перицитами. Перициты окружают эндотелиальные клетки прерывистым образом и тесно связаны с базальной мембраной. Подобно эндотелиальным клеткам, перициты активно участвуют в транспорте лейкоцитов. Эти клетки экспрессируют PRR-рецепторы (прежде всего TLRs и NLRs), что позволяет им оперативно реагировать на иммуностимулирующие сигналы, в частности DAMPs, и воспалительные сигналы, такие как TNF α и IL-1, с помощью рецептора к TNF α (TNFRI), TNFRII и IL-1R [123].

Активированные перициты экспрессируют ключевые молекулы адгезии, такие как ICAM1, VCAM1 и хемокины, в частности CXCL1, CXCL2, а также фактор, ингибирующий миграцию макрофагов (MIF) [44, 132].

Перициты играют ключевую роль в субэндотелиальной подвижности нейтрофилов, процессе, опосредованном интегринами ICAM1-Mac1 и LFA. Субэндотелиальная подвижность обеспечивает более точное попадание этих клеток в *locus morbi* [11].

Нейтрофилы (Нф) являются первыми лейкоцитами, которые попадают в течение 30 мин. в очаг стерильного воспаления из кровотока. Основным стимулом направленного движения Нф является градиент хемоаттрактантов, в первую очередь градиент DAMPs, исходящий непосредственно от места повреждения. Трансэндотелиальная миграция Нф в интерстициальное пространство осуществляется благодаря градиенту концентрации таких DAMPs, как N-формильные пептиды, митохондриальная ДНК (мтДНК) и АТФ. При этом Нф используют свои рецепторы к формильному пептиду, связанному с G-белками (FPR), а также рецепторы P2 (P2Rs) и TLR9. Хемотаксис вдоль этого DAMPs-градиента получил название «некротаксис» [151].

Для эффективного перемещения Нф к месту воспаления необходимо формирование нескольких градиентов хемоаттрактантов. Например, для перемещения на расстояние 600 мкм, что составляет приблизительно 60 длин клеток, количество последующего градиента должно было превалировать над предыдущим градиентом. Это т. н. иерархический хемотаксис был описан McDonald B. и соавт. (2010) [93].

Важным механизмом повреждения тканей Нф, а также продукции DAMPs, в частности АТФ, является формирование внеклеточных ловушек (сеток) нейтрофильных клеток – нетоза, а также продукции активных форм O₂ (АФК), про-

теолитических ферментов и противомикробных белков [5].

Однако, помимо провоспалительных эффектов активированных Нф *in situ* при стерильном воспалении, эти клетки необходимы и для своевременной поствоспалительной регенерации ткани. Нф способствуют восстановлению тканей тремя способами. Во-первых, они удаляют некротический материал посредством фагоцитоза, во-вторых, они вносят значительный вклад в не-ангиогенез, продуцируя фактор роста эндотелия сосудов (VEGF) и, в-третьих, апоптоз Нф и последующий фагоцитоз нейтрофильного апоптотического материала макрофагами способствуют продукции последними противовоспалительных цитокинов – трансформирующего фактора роста (TGF- β) и IL-10 [47, 136].

Фагоцитоз Мф продуктов апоптотической гибели Нф опосредуется фосфатидилсерином (PS), экспрессируемым на апоптотических Нф, и усиливается высвобождением α -дефензинов [95].

Также этот процесс сопровождается поляризацией Мф в сторону фенотипа M2, продуцирующих TGF- β , IL-10, PGE2 и VEGF. M2-субпопуляция Мф способствует поствоспалительной репаративной регенерации тканей. Эта субпопуляция продуцирует липоксин A4, резольвины и протектины, которые ингибируют хемотаксис нейтрофилов и усиливают фагоцитоз апоптотических Нф. Этот процесс получил название «эффероцитоз» [64].

В последнее время на моделях стерильного воспаления с применением метода микроскопии *in vivo* было исследовано явление, называемое обратной трансмиграцией клеток воспалительного инфильтрата – гТЕМ [34].

гТЕМ описывает процесс миграции Нф из очага стерильного воспаления обратно в сосудистую сеть. Эту функцию выполняет группа Нф, конститутивно экспрессирующая высокой плотности внутриклеточную адгезионную молекулу-1 – ICAM1^{high} и рецептор-1 к хемокинам группы CXCL низкой плотности – CXCR1^{low} [21].

Важным регулятором процесса гТЕМ является экспрессия на эндотелиоцитах молекул адгезии семейства JAMs (Junctional adhesion molecules) – эндотелиального JAM-C. Блокада или генетическая делеция эндотелиального JAM-C приводили к увеличению гТЕМ нейтрофилов [140].

Локальное протеолитическое расщепление JAM-C эндотелиальной эластазой нейтрофильных клеток способствует попаданию Нф, экспрессирующих ICAM1^{high} CXCR1^{low}, в кровоток, что может привести к системному воспалению [30].

Также гТЕМ регулировался индуцируемым гипоксией фактором 1 α (HIF-1 α) и передачей сигналов CXCL8/CXCR2. CXCL8/CXCR2 были идентифицированы как специфическая пара лиганд–рецептор, которая организует хемотаксис

через интерстициальное пространство обратно к кровеносным сосудам [109].

Открытие феномена обратной трансмиграции клеток воспалительного инфильтрата подчеркивает патогенетический динамизм КВИ при стерильном воспалении. Предполагается, что обратная трансмиграция клеток воспалительного инфильтрата может быть средством, с помощью которого стерильное местное воспаление

(например, ревматоидный синовит) может распространиться на отдаленные участки (например, легкие) или стать системным. Кроме того не исключается роль гТЕМ в разрешении очага продуктивного воспаления [141]. Рисунок 3 иллюстрирует основные патофизиологические принципы гТЕМ.

Другими важнейшими клетками, участвующими в формировании КВИ при стерильном

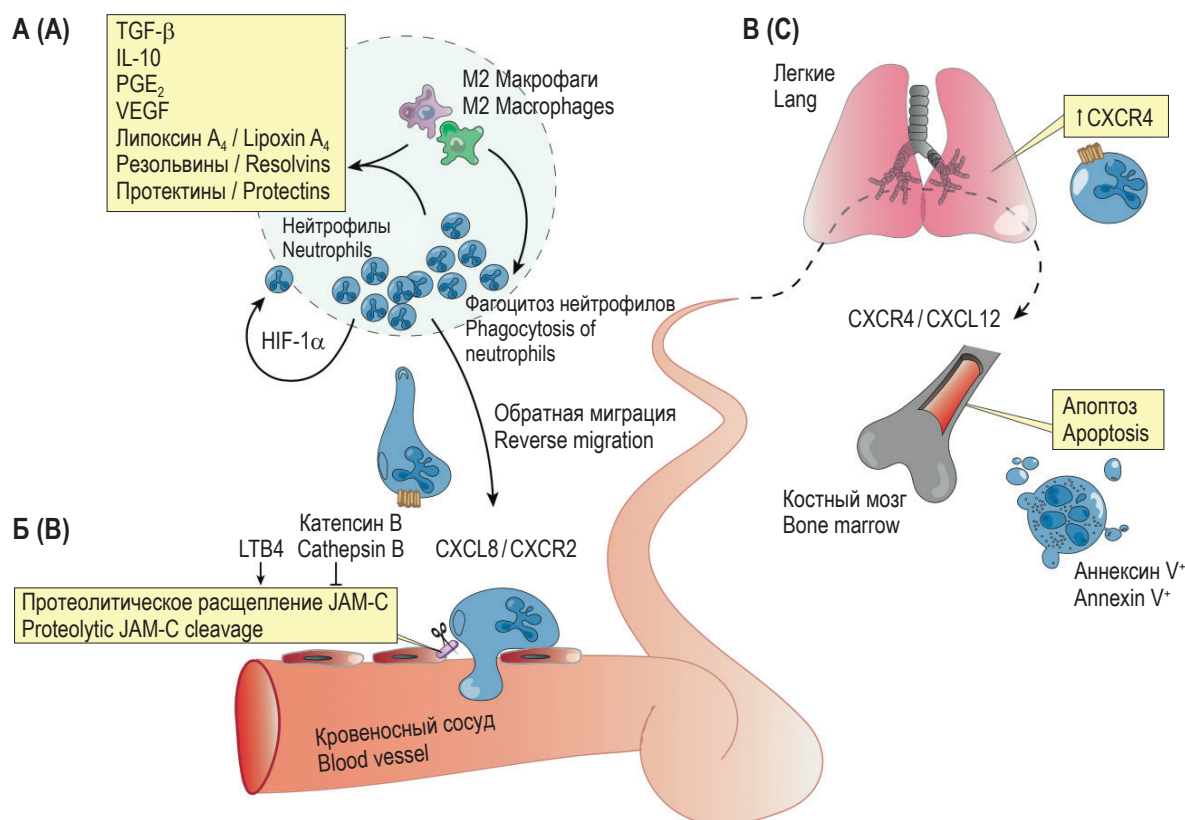


Рисунок 3. Обратная трансмиграция лейкоцитов, пояснения в тексте, по материалам [151]

Примечание. Сокращения: DAMPs – молекулярные паттерны, связанные с повреждением; HIF-1α – индуцируемый гипоксией фактор 1α; JAM-C – соединительная эндотелиальная молекула адгезии C; LTB4 – лейкотриен B4; CXCL8 – хемокин группы CXC; CXCR2 – рецептор к хемокинам группы CXC.

А – по мере элиминации DAMPs с места повреждения нейтрофилы и макрофаги начинают вырабатывать противовоспалительные медиаторы. Некоторые нейтрофилы могут быть фагоцитированы макрофагами. Однако большинство нейтрофилов участвует в обратном миграционном процессе, который необходим для эффективного восстановления гомеостаза. Обратный хемотаксис через интерстициальное пространство зависит от градиента хемоаттрактантов CXCL8/CXCR2. Б – обратная трансэндотелиальная миграция в просвет сосуда зависит от протеолитического расщепления эндотелиального адгезина JAM-C. Этот процесс индуцируется LTB4 и катепсином В.

В – затем нейтрофилы циркулируют в капиллярах легких, где они, взаимодействуя с CXCR4-рецептором, возвращаются в костный мозг. В костном мозге нейтрофилы подвергаются апоптозу, становясь чувствительными к аннексину V.

Figure 3. Reverse transmigration of leukocytes, explanations in the text, based on materials [151]

Note. Abbreviations: DAMPs, molecular patterns associated with damage; HIF-1α, hypoxia-induced factor 1α; JAM-C, connective endothelial adhesion molecule C; LTB4, leukotriene B4; CXCL8, chemokine of the CXC group; CXCR2, receptor for chemokines of the CXC group.

A, as DAMPs are eliminated from the site of injury, neutrophils and macrophages begin to produce anti-inflammatory mediators. Some neutrophils can be phagocytized by macrophages. However, most neutrophils participate in the reverse migration process, which is necessary for the effective restoration of homeostasis. Reverse chemotaxis through the interstitial space depends on the gradient of CXCL8/CXCR2 chemoattractants.

B, reverse transendothelial migration into the vessel lumen depends on the proteolytic cleavage of JAM-C endothelial adhesion. This process is induced by LTB4 and cathepsin B.

C, then neutrophils circulate in the capillaries of the lungs, where they interact with the CXCR4 receptor and return to the bone marrow. In the bone marrow, neutrophils undergo apoptosis, becoming sensitive to annexin V.

воспалении и подвергающимися трансэндотелиальной миграции, являются клетки макрофагально-моноцитарного гистогенеза.

Замечательной особенностью патогенетического участия этих клеток при стерильном воспалении является их локальная пролиферация в *locus morbi*, на что указывает повышенная экспрессия маркера пролиферации Ki67 и усиление адгезивных свойств этих клеток. При этом локальная пролиферация тканевых резидентных Мф была связана с индукцией Th2-адаптивного иммунного ответа [61].

Одновременно *in situ* индуцируется поляризация Мф в сторону фенотипа M2, экспрессирующих маркеры CD273 и CD206, что, как сказано выше, способствует поствоспалительной репаративной регенерации тканей [135].

Хемоаттрактантами в случаях трансэндотелиальной и трансмезотелиальной миграции Мф служит градиент DAMPs, продуцирующийся в очаге стерильного воспаления. При ИБРЗ значимыми в этом отношении являются такие DAMPs как АТФ и взаимодействующий с ним макрофагальный пуринергический рецептор P2X7, а также один из главных компонентов основного вещества соединительной ткани — гиалуроновая кислота и макрофагальный рецептор к ней — CD44 [135].

Отметим, что эффекторные неспецифические механизмы, используемые врожденной иммунной системой для элиминации патогенов и избыточно продуцирующихся DAMPs, являются довольно мощными, обладая при этом потенциалом цитотоксического действия на собственные клетки. Речь идет, в частности, о продукции активных форм кислорода (АФК), гипохлорита натрия или цитолитических протеаз. И здесь возникает чрезвычайно важное, с точки зрения патогенеза ИБРЗ, обстоятельство. Соотношение защитных и патогенных качеств стерильного воспаления может сместиться в сторону последних и усугубить альтерацию клеток и тканей, вызванную другими агентами, в частности инфекциями. Более того, если стерильный стимул не устранен, это может привести к хроническому воспалению и продолжающемуся повреждению тканей [111].

В этих условиях индуцируется активная патогенная нейтрофильная воспалительная реакция, в которой ключевая роль принадлежит IL-1 α и IL-1 β . Подобное заключение основано на результатах исследований, согласно которым мыши, у которых отсутствовал адаптерный белок MyD88, необходимый для передачи сигнала большинством TLR-рецепторов, почти не вызывали нейтрофильного воспаления на такие DAMPs, как кристаллы урата натрия (MSU), а также на

DAMPs некротических клеток и клеток, повергшихся РГК. Нейтрализация антителами IL-1 ингибирует нейтрофильную воспалительную реакцию у мышей на указанные DAMPs. IL-1 α важен для рекрутирования Нф в очаг стерильного воспаления. Также IL-1 α , высвобождающийся при некротической гибели клеток, необходим для продукции хемокина CXCL1 (GRO α) клетками воспалительного инфильтрата, индуцирующий хемотаксис Нф и мезотелиальных клеток в очаг стерильного воспаления по градиенту провоспалительных DAMPs [38].

Генерализованность действия IL-1 обусловлена большой распространенностью рецепторов к IL-1 — IL-1R. IL-1R широко экспрессируется на клетках разных гистогенетических линий, органах и тканях, что и обуславливает полиорганный эффект IL-1 при ИБРЗ [26, 27, 73].

IL-1 β является мощным провоспалительным цитокином, который продуцируется главным образом Мф и обладает многими биологическими функциями, которые важны при стерильном воспалении. Речь идет, прежде всего, об усилении экспрессии молекул адгезии на эндотелиоцитах, важных для рекрутирования Нф и моноцитов и для индукции дополнительных провоспалительных медиаторов [43].

В условиях стерильного воспаления секреция IL-1 β достигает своего максимума при такой форме РГК, как пироптоз. Этот процесс в значительной степени зависит от формирования мультипротеинового комплекса, называемого инфламмасомой, отличительной особенностью которого является активация каспазы-1. После активации каспазы-1 протеолитически расщепляет предшественник IL-1 β до его биологически активной формы. Каспаза-1 также расщепляет еще одного члена семейства IL-1 — это IL-18 до его активной формы, который также вовлечен в стерильные реакции.

Из всех инфламмасом, обладающих способностью активации каспазы-1 с последующим массивным выбросом активных форм IL-1 β и IL-18, наибольшее патогенетическое значение при стерильном воспалении имеют инфламмасома NLRP3 и инфламмасома AIM2.

На основании того, что формирование NLRP3-инфламматомы происходит в присутствии таких стерильных раздражителей, как диоксид кремния, кристаллы MSU и CPPD55, кристаллы холестерина и бета-амилоидные фибриллы было введено понятие «NLRP-3 воспаление» [48].

Важным продуцентом IL-1 при ИБРЗ являются активированные DAMPs клетки макрофагально-моноцитарного ряда. При этом источ-

ником провоспалительных DAMPs являются, прежде всего, клетки в составе КВИ, подвергшиеся некрозу, а также такие виды РГК, как аутофагия, пироптоз, некроптоз, нетоз и ферроптоз (рис. 1). Перепрограммирование моноцитов *in situ* в провоспалительные М1-макрофаги, несущие фенотип CD80, CD86, CD215, опосредуется взаимодействием этих клеток с IL-4 и IL-10, вырабатываемых в том числе и клетками КВИ. Также в подобном перепрограммировании моноцитов в М1-макрофаги *in situ* принимают участие NK-клетки, которые альтернативно активируются CD1d⁺ ауто-антиген-презентирующими клетками и цитокинами – IL-12 и IL-18 [151].

Патогенетическая значимость гиперпродукции IL-1 в индукции стерильного воспаления представлена на рисунке 4.

На рисунке 4 представлены стерильные стимулы, которые включают в себя DAMPs, стерильные частицы и внутриклеточные цитокины, высвобождаемые из некротических клеток. Также DAMPs высвобождаются и при таких формах РГК, как пироптоз, некроптоз, аутофагия, нетоз и ферроптоз. Указанные стерильные стимулы могут активировать иммунную систему и индуцировать стерильное воспаление тремя

возможными путями, которые не являются взаимоисключающими. Во-первых, провоспалительные DAMPs и стерильные частицы активируют врожденную систему иммунитета посредством взаимодействия с PRR-рецепторами, а именно – TLR-рецепторами и NOD-рецепторами (последние входят в состав NLRP3-инфламмасом), а также с RAGE-рецептором, не принадлежащим к семейству PRR-рецепторов. Активация этих рецепторов приводит к усилению продукции IL-1 β , рекрутирующего дополнительные воспалительные клетки в очаг воспаления. Во-вторых, внутриклеточные цитокины, такие как IL-1 α и IL-33, которые высвобождаются при некрозе клеток и РГК, активируют провоспалительные сигнальные пути, не зависящие от активации PRR-рецепторов. В-третьих, эндогенные DAMPs могут непосредственно взаимодействовать с провоспалительными рецепторами, не принадлежащими к семейству PRR-рецепторов, и которые не участвуют в обнаружении микробов.

Не менее важен факт взаимодействия провоспалительных DAMPs с PRR-рецепторами на клетках «первой встречи», приводящий к выработке другого провоспалительного цитокина – TNF α , а также вазоактивных аминов (гистамина

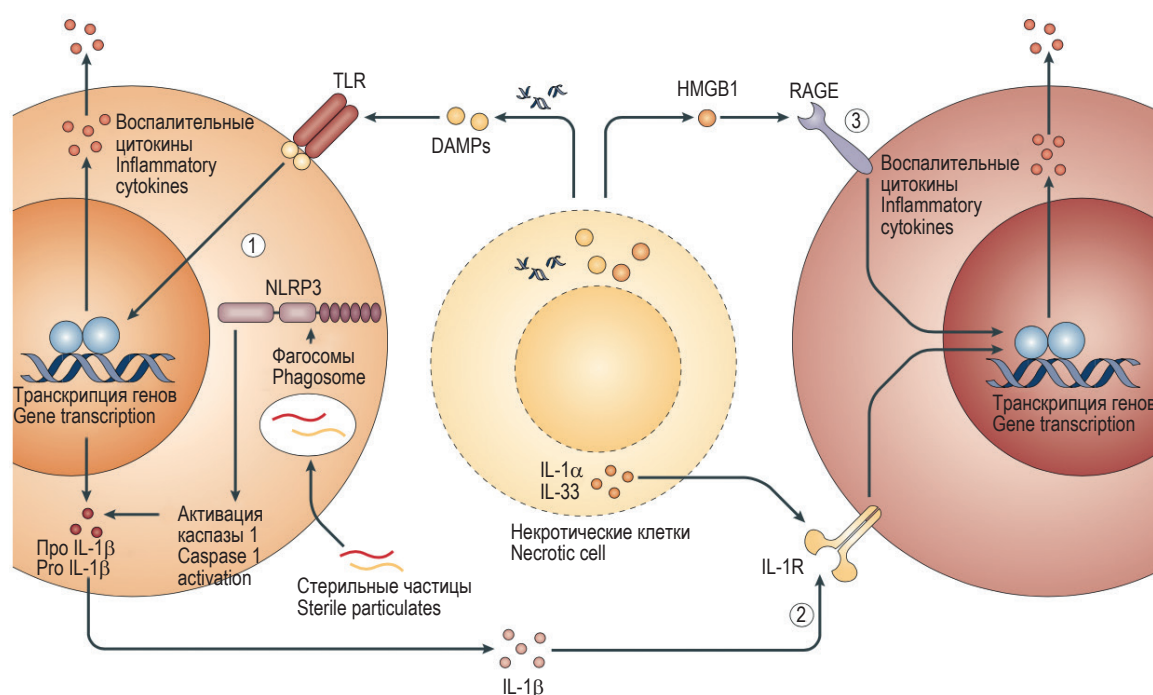


Рисунок 4. Некоторые механизмы индукции стерильного воспаления, пояснения в тексте, по материалам [28]

Примечание. Сокращения: IL-1R – рецептор IL-1; RAGE – рецептор, связывающий конечные продукты расширенного гликирования, такие как гликопротеины и гликаны; HMGB1 – негистоновый ядерный высокомолекулярный групповой белок 1; TLR – Toll-подобный рецептор; DAMPs – молекулярные паттерны, связанные с повреждением тканей.

Figure 4. Some mechanisms of induction of sterile inflammation, explanations in the text, based on materials [28]

Note. Abbreviations: IL-1R, IL-1 receptor; RAGE, receptor binding the end products of extended glycation, such as glycoproteins and glycans; HMGB1, non-histone nuclear highly mobile group protein 1; TLR, Toll-like receptor; DAMPs, molecular patterns associated with tissue damage.

и серотонина), оксида азота (NO), активных форм кислорода (АФК), нейропептидов и метаболитов арахидоновой кислоты (простагландины, лейкотриены), продуктов активации системы комплемента, имеющих несомненное патогенетическое значение при стерильном воспалении [55].

Помимо Нф и клеток макрофагально-моноцитарного ряда активное участие в стерильном воспалении принимают и тромбоциты. Тромбоциты активируются факторами свертывания, такими как фактор Виллебранда (через гликопротеиновый рецептор GP-Ib), фибриноген и фибронектин (через рецептор GPIIb-GPIIIa), а также при контакте с другими белками внеклеточного матрикса, такими как коллаген (через рецептор GPVI). Кроме того, тромбоциты экспрессируют такие PRR-рецепторы, как TLR2 и TLR4 [35, 104].

Более того, тромбоциты могут напрямую рекрутировать иммунные клетки. Иллюстративным примером являются связанные с эндотелием тромбоциты, которые экспрессируют Р-селектин, который связывает лиганд-1 гликопротеина Р-селектина (PSGL1) на лейкоцитах и облегчает их рекрутирование в очаг воспаления [146].

Патогенетическое значение кросс-презентации при иммуновоспалительных ревматических заболеваниях

В развитии DAMP-опосредованного стерильного воспаления при ИВРЗ важнейшее место занимает феномен кросс-презентации. Кросс-презентации — это способность АПК (в основном дендритных клеток) поглощать, обрабатывать внеклеточные пептиды из интернализированных белков, микробных патогенов и трансформированных или умирающих клеток и представлять их с молекулами МНС класса I CD8⁺T-цитотоксическим лимфоцитам, несущим T-клеточные рецепторы (TCR), специфичные к представленному пептиду [15].

Особую значимость кросс-презентации придает тот факт, что она позволяет презентировать экзогенные АГ (обычно представляемые в комплексе с молекулами МНС класса II CD4⁺T-лимфоцитам) в составе молекул МНС класса I на всех субтипах ДК, что позволяет многократно потенцировать АГ-специфический цитолитический эффект наивных CD8⁺T-лимфоцитов. Все представленные выше пептидные варианты DAMPs (табл. 1, 2), после первичного контакта с ДК, обладают способностью индуцировать кросс-презентацию с последующим цитопатогенным действием наивных CD8⁺T-лимфоцитов. На основании имеющихся результатов исследований можно утверждать, что кросс-презентация

имеет решающее значение во всех реакциях CD8⁺T-лимфоцитов. Отметим, что, помимо ДК, способностью к перекрестной презентации (в меньшей степени) обладают Мф, В-лимфоциты, эндотелиоциты, клетки Лангерганса [62].

Кросс-презентация отражает весьма интересную трансформацию внутриклеточных процессов утилизации антигенного материала. В случаях инфицирования всех ядродержащих клеток вирусами или другими внутриклеточными инфекционными агентами, эндогенные инфекционные АГ, комплексуясь с молекулами МНС класса I в эндоплазматическом ретикулуме (ER) с последующим экспонированием на поверхности клетки, индуцируют ауто-цитотоксический ответ наивных CD8⁺T-лимфоцитов. Иными словами, инфицированная клетка посредством своей собственной гибели тормозит распространение инфекции в организме. Механизмы же кросс-презентации предусматривают использование МНС класса I пути утилизации экзогенного материала неинфицированными ДК с индукцией адаптивного CD8⁺ опосредованного АГ-специфического иммунного ответа и с сохранением жизнеспособности ДК. В случаях ИВРЗ подобный путь является отражением специализированной функции ДК, а в качестве АГ выступают все пептидные провоспалительные DAMPs [15].

Необходимо отметить важное качество процесса кросс-презентации. Во вторичных лимфоидных органах исход кросс-презентации комплекса пептид-молекулы МНС класса I на ДК может быть двояким: либо инактивация, либо примирование наивных CD8⁺T-лимфоцитов, в зависимости от сопутствующей экспрессии на ДК костимулирующих молекул CD80/CD86. В ситуации недостаточной экспрессии этих молекул индуцируется супрессия кросс-презентации, в случаях достаточной экспрессии — активация CD8⁺T-лимфоцитов. Экспрессия костимулирующих молекул на поверхности ДК является результатом внутренней клеточной сигнализации от TLR-рецепторов, активируемых при ИВРЗ провоспалительными DAMPs. В частности, такой DAMP, как двухцепочечная (ds) РНК, высвобождаемая из умирающих клеток, является естественным лигандом для TLR3 [100].

Из отдельных подтипов ДК уникальной способностью захватывать процессировать и представлять DAMPs некротических клеток или клеток, подвергшихся РГК, на молекулах МНС класса I CD8⁺T-лимфоцитам обладают мышечные ДК, несущие маркер CD8α, а также ДК человека, экспрессирующие маркер CD141. В последнем случае эти клетки экспрессируют высокий

уровень TLR3, они же в состоянии активации продуцируют высокие уровни IFN β , CXCL10 и IL-12, обеспечивая тем самым оптимальные условия для кросс-презентации в микроокружении КВИ [148].

На CD141⁺ ДК человека селективно экспрессируется один из вариантов лектинов С-типа — молекула CLEC9A (называемой также DNNGR-1), выполняющей функции регулятора кросс-презентации и сенсора DAMPs. CLEC9A обладает способностью связываться с DAMPs, появляющихся в результате некротической гибели клеток или в результате РГК в составе КВИ [57].

Способность CD141⁺ ДК к кросс-презентации после стимуляции TLR3 и селективная экспрессия CLEC9A предполагают специализированную роль CD141⁺ ДК в кросс-презентации DAMPs из мертвых или умирающих клеток [65].

Взаимодействие DAMPs с CLEC9A активирует иммунорецептор hemITAM на основе тирозина (hemITAM) в его внутриклеточной части, который позволяет рекрутировать Syk-тирозинкиназу. hemITAM-зависимые и hemITAM-независимые сигналы от CLEC9A регулируют эндоцитарный трафик материала мертвых клеток и способствуют процессингу и кросс-презентации пептидных DAMPs, ассоциированных с мертвыми клетками. Соответственно, CLEC9A (DNNGR-1) является ключевым врожденным иммунным рецептором к провоспалительным DAMPs, индуцирующим Т-клеточный адаптивный иммунный ответ [9].

Помимо CLEC9A-рецептора, в процессах кросс-презентации принимают участие ряд других лектиновых рецепторов С-типа. Показано, что кросс-презентация ДК человека усиливается в случае взаимодействия антигена с лектиновыми рецепторами С-типа «лангерин» и DEC-205 на клетках Лангерганса, а также рецептора CLEC4A на ДК моноцитарного гистогенеза [40].

Подчеркнем ключевой момент кросс-презентации при ИВРЗ, а именно — вовлеченность TLR-рецепторов, экспрессирующихся на ДК и взаимодействующих с провоспалительными пептидными DAMPs, в усиление активации наивных CD8⁺Т-лимфоцитов. Подобное усиление является следствием повышения эффективности загрузки пептида на МНС класса I в ДК, посредством стимулирования активности цитохромного фермента NOX2 [134].

Эти наблюдения позволяют предположить, в полном соответствии с «теорией опасности» Polly Matzinger, что активированные через DAMP-специфические TLR-рецепторы ДК принимают участие в мониторинге тканевого гомеостаза *in situ*, что позволяет непрерывно взаимодействовать

с DAMPs, высвобождающимися в ходе системной прогрессирующей дезорганизации рыхлой волокнистой неоформленной соединительной ткани, некротической гибели клеток и РГК при ИВРЗ. Это приводит к эффективной кросс-презентации пептидных «соединительнотканых» DAMPs и индукции аутореактивных CD8⁺Т-лимфоцитов.

Также в оптимизации кросс-презентации активное участие принимают белки теплового шока (HSP) посредством взаимодействия с «рецепторами-поглотителями» на ДК, такими как SREC1/SCARF1, LOX-1 и SR/CD204 [102].

HSP индуцируются во время клеточного стресса, и умирающие клетки экспрессируют повышенные уровни HSP. Внутриклеточные HSP, такие как HSP70 и HSP90, могут участвовать в цитозольной транслокации эндосомальных DAMPs. Внеклеточные HSP, такие как gp96, взаимодействуют с CD91-рецептором на поверхности ДК [14].

Распознавание мембраносвязанных HSP на поверхности некротических клеток или клеток, подвергнутых РГК, лектиноподобным рецептором LDL-1 способствует кросс-презентации DAMPs из этих умирающих клеток [150].

Кросс-презентация провоспалительных DAMPs в клетках осуществляется двумя основными путями — вакуолярным и цитозольным. Вакуолярный путь устойчив к ингибиторам протеасом и протекает независимо от протеасомной деградации полипептидов. В этих случаях белки, поступившие в цитозоль посредством эндоцитоза, разлагаются эндосомальными протеазами и полученные пептиды загружаются на молекулы МНС класса I независимо от цитозольной протеасомной деградации и функции транспортера, связанного с обработкой антигена (TAP). Цитозольный путь процессинга DAMPs может блокироваться ингибиторами протеасом. Соответственно в этой ситуации транслокация DAMPs из эндосом в цитоплазму сопровождается протеасомной деградацией DAMPs и продукты деградации, формируя эндосомы, загружаются на молекулы МНС класса I [62].

Необходимо отметить, что во время кросс-презентации внеклеточные белки, доставляемые в эндосомы, физически располагаются в компартменте, отличном от эндоплазматического ретикула (ER). Молекулы же МНС класса I формируются непосредственно в ER. Комплексообразование внеклеточных белков (в нашем случае DAMPs) с молекулами МНС класса I осуществляется посредством ключевого процесса — формирования цитоплазматического комплекса загрузки пептидов (PLC).

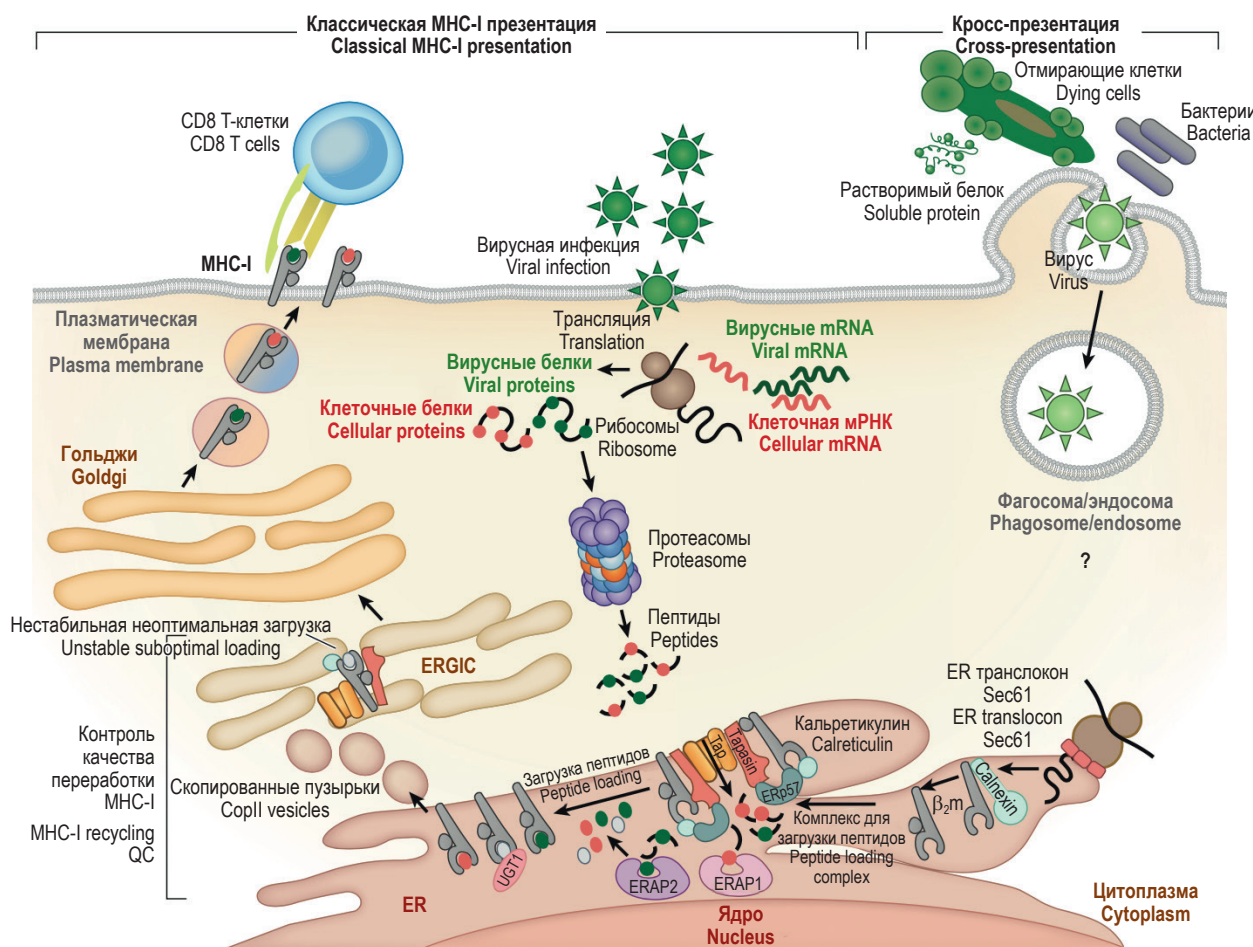


Рисунок 5. Основные внутриклеточные процессы кросс-презентации, пояснения в тексте, по материалам [15]

Figure 5. Main intracellular processes are cross-presentations, explanations in the text, based on materials [15]

Более подробно указанные внутриклеточные процессы кросс-презентации представлены на рисунке 5.

Как видно из рисунка 5, задача пространственной загрузки аллелей МНС класса I пептидом из внеклеточного источника решается следующим образом. Загрузка молекул МНС класса I пептидами, полученными из внеклеточного источника, таких как умирающие клетки (зеленого цвета), бактерии или вирусы, проводится поэтапно. Прежде всего формируются эндосомы/фагосомы, как следствие фагоцитоза, либо эндоцитоза указанного антигенного материала. Эндосомы/фагосомы, физически отдалены от эндоплазматического ретикулума (ER), где молекулы МНС класса I синтезируются, сворачиваются и загружаются пептидами. Полипептид с тяжелой цепью молекулы МНС класса I транслируется в просвет ER через комплекс Sec61. После взаимодействия с шапероном кальнексином, следует комплексообразование с β_2 -микроглобулином (β_2m). Гетеродимер тяжелой цепи МНС-I/ β_2m на этой стадии нестабилен и посредством кальретикули-

на этот гетеродимер формирует комплекс загрузки пептидов (PLC). Для стабилизации молекулы молекулы МНС класса I необходима ассоциация этих молекул с тапазином и ERp57 непосредственно в PLC в результате чего формируется канавка, восприимчивая к связыванию высокоаффинных пептидов в ER. Внутри PLC транспортер, связанный с обработкой антигена (TAP), комплексируется с цитозольными пептидами в ER, которые образуются в результате протеасомной деградации эндогенных белков (в нашем случае с пептидных DAMPs). Эти пептиды дополнительно обрезаются ER-ассоциированными аминопептидазами ERAP1 и ERAP2, чтобы соответствовать длине пептида, предпочтительной для МНС класса I. После загрузки пептидом молекулы МНС класса I перемещаются в промежуточный отсек между комплексом Гольджи и ER, обозначенном как ERGIC, через везикулы, покрытые COPII, где они подвергаются контролю качества (QC) с помощью кальретикулина, тапазина и гликопротеина глюкозилтрансферазы (UGT1). Молекулы МНС класса I с низкоаффин-

ными пептидами (серые овалы) накапливаются в ERGIC. Молекулы МНС класса I с низкоаффинными пептидами служат субстратами для UGT1, а некоторые накапливаются в ERGIC и повторно поступают в PLC для другого цикла загрузки пептидов. Стабильные, оптимально загруженные молекулы МНС класса I, которые проходят контроль качества, высвобождаются и экспортируются в плазматическую мембрану для распознавания CD8⁺Т-лимфоцитами.

Классический путь презентации МНС класса I имеет место во всех ядросодержащих клетках, тогда как кросс-презентация является специализированной функцией, выполняемой преимущественно ДК.

Таким образом, кросс-презентация относится к фундаментальным патогенетическим механизмам стерильного воспаления при ИВРЗ, усиливающих альтерацию клеток и тканей и течение воспалительного процесса.

Аутофагия и презентация ауто-DAMP при стерильном воспалении

Аутофагия относится к категории фундаментальных, эволюционно консервативных внутриклеточных процессов, обеспечивающих гомеостаз и жизнеспособность клеток за счет внутриклеточной лизосомальной деградации цитоплазматических компонентов и переработки питательных веществ. Важнейшим качеством аутофагии является участие этого процесса в лизосомальном протеолизе эндогенных цитозольных и ядерных пептидов и их доставке в загрузочные отсеки МНС класса II с последующей экспрессией на АПК и индукцией АГ-специфического иммунного ответа. 20-30% природных лигандов МНС класса II происходит из эндогенных цитозольных и ядерных антигенов [33].

В процессах презентации АГ принимают участие два вида аутофагии — макроаутофагия и аутофагия, опосредованная шаперонами (СМА) [5]. При этом определяется интересная закономерность. Если кросс-презентация обуславливает презентацию внеклеточных пептидов из интернализированных белков с молекулами МНС класса I CD8⁺ цитотоксическим Т-лимфоцитам, то аутофагия обеспечивает процессинг внутриклеточных пептидов для загрузки на молекулы МНС класса II и индукции CD4⁺Т-клеточного адаптивного иммунного ответа.

При стерильном воспалении АГ-презентирующая функция аутофагии, в основном макроаутофагии, обусловлена рецептор-опосредованным эндоцитозом провоспалительных пептидных DAMPs, формированием ключевого молекулярного комплекса LC3-II, состоящего из

белков Atg5-Atg12, связанных с микротрубочками и фосфатидилэтаноламином (PE) [97].

Комплекс LC3-II закрепляется на внутренней стороне мембраны аутофагосомы и доставляет клеточные органеллы, такие как митохондрии, а также белковые агрегаты, непосредственно в аутофагосомы. Аутофагосомы, сливаясь с лизосомами, формируют аутолизосомы, где изолированное содержимое расщепляется лизосомальными гидролазами. 50% аутолизосомы последовательно сливаются с загрузочными отсеками МНС класса II [118].

Показано, что ковалентное связывание антигенов с N-концом комплекса Atg8/LC3 усиливает их презентацию на молекулах МНС класса II CD4⁺Т-клеткам, эпителиальными клетками, В-клетками и дендритными клетками до 20 раз [31].

Во время аутофагии, опосредованной шаперонами (СМА), связанный с лизосомой мембранный белок 2а (LAMP-2а) с помощью белков теплового шока (БТШ70) импортирует цитозольные субстраты сигнальным пептидо-зависимым способом непосредственно в лизосомы [118]. При этом в пузырьках слияния определялись молекулы МНС класса II, связанные с LAMP-2а [101].

Необходимо отметить ключевой момент в отношении участия аутофагии в презентации пептидных ауто-DAMPs при ИВРЗ. Речь идет об активации PRR-рецепторов после взаимодействия с ауто-DAMPs, с последующим инициированием ауто-DAMP-презентирующей функции аутофагии в составе МНС класса II.

В рецептор-опосредованном эндоцитозе и индукции АГ-презентирующей функции аутофагии в отношении пептидных провоспалительных DAMPs при ИВРЗ принимают участие следующие PRR-рецепторы, экспрессирующиеся прежде всего на ДК:

I — это группа TLR-рецепторов, состоящая из TLR3, TLR7, TLR8 и TLR9, которые экспрессируются исключительно во внутриклеточных структурах, таких как эндоплазматический ретикулум (ER), эндосомы, лизосомы и эндолизосомы [67].

Значение TLR-рецепторов в индукции АГ-презентирующей функции аутофагии подчеркивают, в частности, данные, свидетельствующие о том, что в фагосомах, несущих цитологический признак аутофагии — комплекс Atg8/LC3, был идентифицирован агонист TLR из материала апоптотических клеток [138]. Показано также, что АГ-презентирующая функция ДК с последующей стимуляцией Т-клеток дополнительно

усиливается при индукции аутофагии в ДК после стимуляции TLR4, NOD1 и NOD2 [68].

II — это некоторые члены семейства лектиновых рецепторов C-типа — CLR-рецепторы. В частности, DNGR-1 (CLEC9A) рецептор, специфичный для ДК [128].

III — это семейство цитоплазматических пирриновых NLR-рецепторов, а также цитоплазматические ДНК сенсоры (CDS-рецепторы), такие как циклическая GMP-AMP-синтаза (сGAS) и белок AIM2 [70]. В случаях цитоплазматической экспрессии указанных PRR-рецепторов лизосомальную деградацию пептидных DAMPs, обеспечивает макроаутофагия.

Аутофагия принимает участие в презентации DAMPs, связанные с выработкой аутоантител у пациентов с РА на цитруллинированные пептиды. При этом процесс везикулярного транспорта и презентации указанных пептидов в составе МНС класса II на ДК был связан с наличием белка аутофагии — Atg5 [58].

Однако задействование аутофагии в дендритных клетках в отношении презентации пептидных DAMPs с МНС класса II может способствовать противоположному эффекту, а именно индукции DAMP-специфической толерантности. Известно, что незрелые ДК очень хорошо улавливают DAMPs из отмирающих клеток и, комплексируясь с молекулами МНС класса II в процессе макроаутофагии, индуцируют толерантность к собственным антигенам [89].

Также необходимо упомянуть о том, что аутофагия ассоциирован с процессом кросс-презентацией DAMP-пептидов на МНС класса I в ДК. Так, индукция активности серин-треониновой протеинкиназы — GCN2 в ДК активирует аутофагию в этих клетках, способствуя кросс-презентации на МНС класса I [110]. Этот механизм кросс-презентации может быть объяснен участием белков аутофагии (Atg-белков) в доставке интернализованных антигенов в компартменты, которые содержат молекулы МНС класса I [129].

Механизм аутофагии особенно важен для кросс-презентации растворимых DAMPs, но не DAMPs, доставляемых посредством рецепторопосредованного эндоцитоза [96].

Как видно из представленных результатов последних исследований патогенетическое участие аутофагии в презентации ауто-DAMP при стерильном воспалении очевидно и это придает дополнительные возможности для научной разработки средств регулирования указанных молекулярно-клеточных процессов.

Врожденные лимфоидные клетки и адаптивный иммунитет при стерильном воспалении

Выше указывалось, что теоретическим базисом патогенеза стерильного воспаления является

теория опасности Polly Matzinger, в соответствии с которой реактивность PRR-рецепторов ДК и клеток макрофагально-моноцитарного ряда позволяет сканировать состояние тканевого гомеостаза организма. При системной прогрессирующей дезорганизации рыхлой волокнистой неоформленной соединительной ткани, некроза клеток и РГК генерация «сигналов опасности/тревоги» с последующим PRR-DAMP взаимодействием способствует индукции DAMP-специфического адаптивного иммунного ответа. Важный вклад в указанные процессы вносит открытый в последнее десятилетие уникальный класс клеток врожденного иммунитета — врожденные лимфоидные клетки (ILCs).

ILCs — это тканевые резидентные лимфоциты, у которых отсутствуют адаптивные АГ-специфические рецепторы (TCR- и BCR-рецепторы). ILCs глубоко интегрированы в структуру практически всех видов тканей, и эти клетки являются врожденными аналогами CD4⁺T-клеток-помощников (Th1, Th2 и Th17). Факторы тканевой среды, а также продуцируемый сторожевыми иммунными клетками спектр цитокинов, имеют решающее значение для определения дифференцировки ILCs [10].

Крайне важно то, что биология ILCs выходит за рамки классической иммунологии и функциональная активность этих клеток распространяется в область поддержания тканевого и метаболического гомеостаза, ремоделирования тканей, морфогенеза, репарации, регенерации, а также регуляции воспаления [10].

ILCs разделены на главные подтипы — ILC1, ILC2 и ILC3 в соответствии с направлением их дифференцировки из предшественников ILCs. Эти направления определяются ключевыми факторами транскрипции и факторами тканевого микроокружения.

Как часть врожденного иммунитета, эти клетки рано реагируют на инфекции, а также на провоспалительные DAMPs и регулируют иммунный ответ главным образом за счет выработки ими соответствующей панели цитокинов [91].

Дифференцировку клеток-предшественников в направлении ILC1 определяет экспрессия транскрипционных факторов T-box T-bet с последующей продукцией цитокинов IFN γ , TNF α и TGF- β 1. На основании идентичности продуцируемых цитокинов ILC1 считается врожденным аналогом Th1 CD4⁺T-клеток. У человека ILC1 экспрессируют CD127 — рецептор IL-7. IL-7 является лимфопоэтическим фактором роста, имеющим ключевое значение в созревании и размножении клеток лимфоидного ряда.

Дифференцировка ILC2 зависит от экспрессии транскрипционного фактора Gata-3 и продукции ими IL-4, IL-5 и IL-13. На этом основании ILC2 считается врожденным аналогом Th2 CD4⁺T-клеток. ILC2 несут характерные поверхностные маркеры и рецепторы хемокинов, которые необходимы для их распространения по разным тканям. У человека ILC2 экспрессируют CRTH2, KLRG1, SST2, CD161 и CD25.

Клетки группы ILC3 нуждаются в экспрессии ядерного фактора транскрипции ROR γ t и в активном состоянии секретируют IL-17 и/или IL-22, а также IFN γ и GM-CSF. Соответственно, ILC3 относят к врожденным аналогам Th17 CD4⁺T-клеток. ILC3 участвуют во врожденном иммунном ответе на провоспалительные DAMPs, а также на бактериальное и грибковое заражение. Они играют важную роль в обеспечении гомеостаза кишечных бактерий и в регуляции активности Th17 CD4⁺T-клеток. У человека ILC3 локализуются преимущественно в собственной пластинке кишечника, в миндалинах, селезенке, коже, эндометрии. Представленные цитокины определяют направление иммунного ответа и типы воспаления.

Кроме этого, нельзя не упомянуть и об аналогии клеток естественных киллеров (NK) с функциональной активностью CD8⁺ цитотоксических T-клеток [131].

В контексте патогенеза ИБПЗ указанные параллели имеют достаточно обоснованный иммунологический смысл. Речь идет о том, что при всех формах РГК, индуцирующих стерильное воспаление при ИБПЗ и приводящих к секреции провоспалительных DAMPs или SAMPs [5], первыми клетками, реагирующими на тканевые «сигналы опасности» являются ILCs. Активируясь, ILCs поддерживают и дополняют CD4⁺T-клеточный адаптивный иммунный ответ [75].

Роль ILCs в поддержании тканевого и метаболического гомеостаза, ремоделирования тканей, процессах регенерации и регуляции воспаления подчеркивалась выше. Находящиеся в соединительной ткани ILCs активируются на ранних стадиях иммунного ответа, быстро реагируя на провоспалительные DAMPs или цитокины-индукторы, посредством специфических PRR-DAMP взаимодействий. Эти взаимодействия приводят к взаимодополняемости, а не полному дублированию функций адаптивной иммунной системы.

При ИБПЗ внеклеточное появление таких DAMPs, как F-актин, HMGB1, HSP60 способствует активации ILC1 посредством PRR-DAMP-взаимодействия и, как следствие, дифференцировке Th0 в направлении Th1 CD4⁺T-клеток [19].

При окислительном стрессе при витилиго взаимодействия между указанными DAMPs и Th1-поддерживающими ILC-клетками, приводят к более высокой продукции IFN γ в ILC1 и NK-клетках [17]. Известно, что клеточный окислительный стресс является важным патогенетическим звеном при ИБПЗ.

ILC2 экспрессируют высокий уровень TLR1, TLR4 и TLR6 (уровень экспрессии этих рецепторов был даже выше, чем у своего аналога адаптивного иммунитета — Th2 CD4⁺T-клеток) и взаимодействие этих рецепторов с DAMPs индуцирует продукцию IL-5 и IL-13. Более того, было обнаружено, что ILC2 экспрессирует CD154 (лиганд рецептора CD40, играющего роль костимулирующей молекулы при активации АПК). Напомним, что CD40L экспрессируется на Th2 CD4⁺T-клетках в момент индукции TCR-МНС II + пептид адаптивного иммунного ответа [85].

IL-33 был идентифицирован как некроптотический DAMP из-за его повышенной экспрессии в некроптотических эпидермальных кератиноцитах. Активное участие этого цитокина в индукции Th2 адаптивного иммунного ответа связывает таким образом некроптоз с иммунным ответом 2-го типа [74, 119]. IL-33 участвует не только в дифференцировке Th2, но и в активации клеток ILC2. Ткане-резидентные ILC2 в легких активируются вдыхаемыми аллергенами через эпителиальный IL-33 [88]. При некроптозе кардиомиоцитов ILC2, продуцируя IL-4, дополнительно усиливают влияние некроптоза на дифференцировку Th0 в направлении Th2 CD4⁺T-клеток.

На ILC3 экспрессируются молекулы МНС класса II, что позволяет этим клеткам выполнять АГ-презентирующую функцию в отношении провоспалительных DAMPs и индукции эффекторных реакций Th17 CD4⁺T-клеток [52]. Также ILC3 помогают поддерживать резидентные тканевые регуляторные T-клетки (Treg) посредством продукции GM-CSF и воздействия этого фактора на толерогенные миелоидные популяции [99]. Существует мнение, что ILC3, так же как и ILC2, действуют как важная контрольная точка в генерации, в частности DAMP-специфичных T-клеточно-зависимых ответов в поддержании тканевого гомеостаза [94]. Такой DAMP, как внеклеточный АТФ, активирует ILC3 с последующей продукцией IL-22 — типичного цитокина Th17 адаптивного иммунного ответа [80]. Кроме того, увеличенное количество ILC3-клеток ассоциируется с повышенным уровнем IL-1 β и усугублением воспалительного артрита у мышей. Соответственно, лечение антагонистами IL-1 эффективно снижало уровень ILC3-клеток и уменьшало воспаление суставов [25].

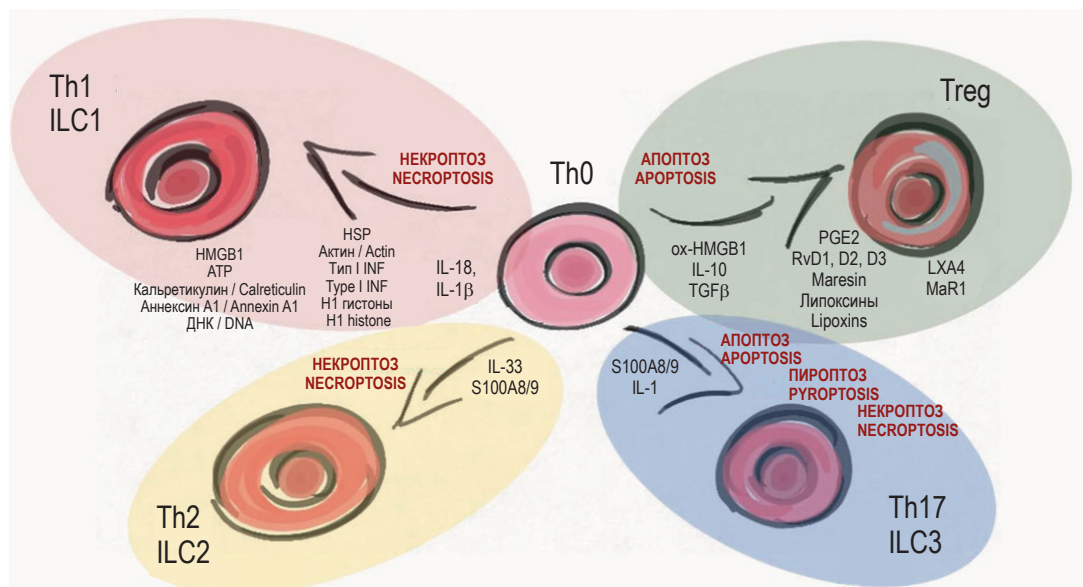


Рисунок 6. Зависимость направления дифференцировки Th0-клеток и ILCs от типа РГК и появляющихся при этом в тканевой среде молекул DAMPs или SAMPs, по материалам [91]

Примечание. Сокращения: HMGB1 – негистоновый ядерный высокомолекулярный групповой белок-1; PGE2 – простагландин E2; TGF-β – трансформирующий фактор роста-бета.

Figure 6. Dependence of the direction of differentiation of Th0 cells and ILCs on the type of RG and the DAMPs or SAMPs molecules appearing in the tissue medium, according to materials [91]

Note. Abbreviations: HMGB1, non-histone nuclear highly mobile group protein 1; PGE2, prostaglandin E2; TGF-β, transforming growth factor – beta.

Рисунок 6 иллюстрирует взаимодополняемость основных подтипов ILC-клеток с вариантами CD4⁺ клеток, имеющих несомненное патогенетическое значение при стерильной воспалении. Учитывая, что основным источником провоспалительных DAMPs при ИВРЗ являются некроз клеток и все формы РГК, на рисунке 6 представлены основные виды DAMPs, генерируемые при конкретных вариантах РГК и некрозе. Также на этом рисунке представлена схема функциональной сопряженности пар ILC1-Th1, ILC2-Th2, ILC3-Th17, обуславливающих индукцию DAMP-специфического адаптивного CD4⁺Т-клеточного иммунного ответа.

Из рисунка 6 видно, что некроз, а также некроптоз, пироптоз и провоспалительный апоптоз клеток, находящихся в составе КВИ *in situ*, сопровождается выбросом провоспалительных DAMPs. Первыми клетками, реагирующими на указанные DAMPs, являются тканевые резидентные ILC-клетки. Экспрессия указанных выше транскрипционных факторов определяет дифференцировку общего предшественника ILCs в направлении ILC1, ILC2 и ILC3. Взаимодействие PRR-рецепторов указанных подтипов ILCs с DAMPs сопровождается продукцией провоспалительных цитокинов, определяющей в том числе и направление дифференцировки Th0 клеток. Эти процессы формируют функциональ-

ную сопряженность и взаимодополняемость пар ILC-Th.

Взаимодействие ILC1 с такими DAMPs, как HMGB1 АТФ, ДНК, БТШ, кальретикулин, аннексин А1, Н1 гистон сопровождается продукцией IFN типа I, IL-18 и IL-1β, что обуславливает поляризацию хелперных Т-клеток и ILCs в направлении ILC1-Th1.

Взаимодействие ILC2 с такими DAMPs, как S100A8/9, сопровождается продукцией, в частности IL-33 и поляризацией хелперных Т-клеток и ILCs в направлении ILC2-Th2.

Аналогично, взаимодействие S100A8/9 с ILC3 индуцирует продукцию, в частности IL-1, и поляризацию хелперных Т-клеток и ILCs в направлении ILC3-Th17.

Представленные модели функциональной сопряженности и взаимодополняемости ILCs и Th-CD4⁺Т-клеток расширило наши представления об иммунной регуляции, распространив активность врожденного и адаптивного иммунитета в область поддержания тканевого гомеостаза. Дезорганизация рыхлой волокнистой неоформленной соединительной ткани при ИВРЗ сопровождаются закономерным выбросом провоспалительных DAMPs. Следствием PRR-DAMP взаимодействия тканевых ILCs и последующего подключения клеточных пар ILC-Th при ИВРЗ является индукция прогрессирующего системного стерильного воспаления.

Заключение

Настоящий обзор является заключительным по предшествующему циклу работ, посвященных молекулярно-клеточному базису стерильного воспаления при ИВРЗ [4, 5, 6]. Концептуальные основы патогенеза ИВРЗ, в соответствии с современными представлениями, отводят реактивности врожденного и адаптивного иммунитета роль сенсора провоспалительных внутри- и внеклеточных DAMPs, появляющихся при изменениях гомеостаза рыхлой волокнистой неоформленной соединительной ткани. Поскольку эволюционное предназначение системы иммунитета состоит в сохранении структурно-функциональной целостности внутренней среды организма, PRR-DAMP взаимодействия составляют патогенетическую основу стерильного воспаления при ИВРЗ. Это фундаментальное положение подтверждает известный тезис: иммунологический гомеостаз — есть гомеостаз структурный [7].

Фагоцитарная активность клеток макрофагально-моноцитарного гистогенеза в отношении утилизации тканевого и клеточного детрита (клетки-мусорщики) по сути является главным эволюционным предназначением этих клеток и сводится к функции поддержания гомеостатических тканевых параметров в пределах физиологических норм. Именно эта функциональная направленность Мф является эволюционно закрепленной, и именно ей придавал главенствующее значение автор открытия этих клеток, наш великий соотечественник И.И. Мечников. Участие Мф в анти-инфекционном иммунитете является частным примером адаптации макрофагальной активности в отношении индукции иммунного ответа.

Логическим следствием систематического анализа результатов исследований «сигналов опасности/тревоги», появляющихся при повреждении тканей, стало появление в 1994 г. «теории опасности» Polly Matzinger. Идеологическим базисом этой теории является положение о том, что воспалительный иммунный ответ индуцируется указанными сигналами опасности/тревоги от поврежденных тканей, а не распознаванием «не-я». Подобное положение коренным образом изменило наше понимание иммунопатогенеза многих заболеваний и прежде всего ИВРЗ. Надо отдать должное дару научного предвидения и глубине анализа научных фактов Polly Matzinger, поскольку основные положения этой теории лежат в основе современных представлений о патогенезе стерильного воспаления при ИВРЗ.

В процессах тканевой деструкции, некроза клеток и РГК появляются триггеры стерильного воспаления при ИВРЗ — провоспалительные DAMPs. Уникальной чертой провоспалительных

DAMPs является их способность взаимодействовать с DAMP-чувствительными рецепторами, прежде всего с рецепторами врожденного иммунитета — PRR-рецепторами. Широкая распространенность этих рецепторов как на клетках врожденного иммунитета, так и на клетках тканей различного гистогенеза (табл. 2) позволяет им непрерывно сканировать состояние тканевого гомеостаза организма в целом и немедленно реагировать на появление провоспалительных DAMPs. При этом определение сыровоточных провоспалительных DAMPs при ИВРЗ имеет несомненное диагностическое значение, а расчет соотношения DAMP:SAMP позволяет определить этап стерильного воспаления.

Генерализованность патофизиологических эффектов провоспалительных DAMPs и, соответственно, системность и полиорганность поражения тканей и внутренних органов при ИВРЗ обусловлено широкой распространенностью рецепторов к «сигналам опасности». При ИВРЗ следствием активности мембранного и внутриклеточного аппарата DAMP-чувствительных рецепторов является прогрессирующее течение стерильного воспаления и полиорганность поражения.

С учетом того, что, в частности, PRR-DAMPs взаимодействия являются триггерами активации врожденного иммунитета, ИВРЗ можно отнести к категории системных стерильных аутовоспалительных процессов. Сопутствующая этим процессам гиперпродукция IL-1 β и IL-1 α обуславливает мобилизацию эффекторных клеток адаптивной иммунной системы, способствуя экспансии аутореактивных Th1- и Th17-лимфоцитов и ингибируя активность регуляторных Т-лимфоцитов (Treg). Указанные «лимфоцитарные» процессы индуцируют собственно адаптивный аутоиммунный ответ.

Дополнительный вклад в инициирование, усиление, генерализацию и разрешение стерильного воспаления при ИВРЗ вносит перекрестная реактивность DAMP-чувствительных рецепторов, т. е. способность двух или более этих рецепторов взаимодействовать с одним типом DAMP и синергически генерировать множественные эффекторные реакции.

Стерильное воспаление является многоступенчатым процессом, при котором индуцируется последовательность реакций, опосредованных лейкоцитами и резидентными клетками макрофагально-моноцитарного ряда, направленных на очищение очага воспаления от клеточного и тканевого детрита, а также провоспалительных DAMPs, присутствующих в *locus morbi*, с последующим восстановлением гомеостаза поврежденной ткани. Инициация этих процессов начинается с этапа острого воспаления. Однако

неконтролируемая активность клеток острого воспаления может быть причиной стойкого повреждения тканей, лежащих в основе нозологических форм ИВРЗ. В ситуации, когда стерильный стимул не устранен, существенно возрастает вероятность хронизации воспаления и продолжения повреждения тканей.

Формирование КВИ при системном стерильном воспалении также зависит от хорошо организованной трансэндотелиальной миграции Нф — гТЕМ. При гТЕМ документируются процессы миграции Нф из очага стерильного воспаления обратно в сосудистую сеть. Эту функцию выполняет группа Нф, конститутивно экспрессирующая внутриклеточную адгезионную молекулу-1 — ICAM1^{high} высокой плотности и рецептор-1 к хемокинам группы СХС низкой плотности — CXCR1^{low}. Не исключается роль гТЕМ в разрешении очага продуктивного воспаления. Не меньшая роль в определении клеточного состава КВИ в *locus morbi* принадлежит миграционной активности резидентных клеток макрофагально-моноцитарного ряда и фибробластам.

Хемоаттрактантами в случаях трансэндотелиальной и трансэпителиальной миграции Мф служит градиент провоспалительных DAMPs, продуцирующихся в очаге стерильного воспаления.

В развитии DAMP-опосредованного стерильного воспаления при ИВРЗ видное место занимает феномен кросс-презентации. На основе презентации экзогенных, внеклеточных, DAMPs из интернализованных белков и трансформированных или умирающих клеток с молекулами МНС класса I CD8⁺T-цитотоксическим лимфоцитам активируется специфический адаптивный иммунитет.

Также, в полном соответствии с «теорией опасности» Polly Matzinger, активированные через DAMP-специфические TLR-рецепторы ДК принимают участие в мониторинге тканевого го-

меостаза *in situ*, что позволяет непрерывно взаимодействовать с DAMPs, высвобождающимися в ходе системной прогрессирующей дезорганизации рыхлой волокнистой неоформленной соединительной ткани, некротической гибели клеток и РГК при ИВРЗ. Это приводит к эффективной кросс-презентации дендритными клетками пептидных «соединительнотканых» DAMPs и индукции аутореактивных CD8⁺T-лимфоцитов.

При стерильном воспалении не менее патогенетически значима аутофагия. Лизосомальный протеолиз эндогенных цитозольных и ядерных пептидов, их доставка в загрузочные отсеки МНС класса II с последующей экспрессией на АПК индуцирует DAMP-специфический адаптивный иммунный ответ. Также важно участие аутофагии, точнее, белков аутофагии (Atg-белков), в кросс-презентации DAMP-пептидов на МНС класса I в ДК.

Модель функциональной сопряженности и взаимодополняемости ILCs и Th-CD4⁺T-клеток расширила наши представления об иммунной регуляции, распространив активность врожденного и адаптивного иммунитета в область поддержания тканевого гомеостаза, морфогенеза, репарации, регенерации и воспаления. Следствием PRR-DAMP взаимодействия тканевых ILCs и последующего подключения клеточных пар ILC-Th при ИВРЗ является индукция прогрессирующего системного стерильного воспаления.

Таким образом, представленные в настоящем обзоре материалы отражают различные аспекты патогенеза стерильного воспаления при ИВРЗ. Эти материалы, а также материалы предшествующих обзоров, отражают полную картину современных представлений о молекулярно-клеточных основах патогенеза ИВРЗ и определяют перспективные молекулярные и клеточные мишени с целью регуляции и/или ингибирования активности стерильного воспаления при ИВРЗ.

Список литературы / References

1. Бернет Ф. Клеточная иммунология. М.: Мир, 1971 г. 541 с. [Burnet M. Cellular immunology]. Moscow: Mir, 1971. 541 p.
2. Воспаление. Руководство для врачей. Под ред. В.В. Струкова, В.С. Паукова. М.: Медицина, 1995. С. 219. [Inflammation. A guide for doctors. Ed. V.V. Strukov, V.S. Paukov]. Moscow: Meditsina, 1995. P. 219.
3. Потапнев М.П. Иммунные механизмы стерильного воспаления // Иммунология, 2015. Т. 36, № 5. С. 312-318. [Potapnev M.P. Immune mechanisms of sterile inflammation. *Immunologiya = Immunology*, 2015, Vol. 36, no. 5, pp. 312-318. (In Russ.)]
4. Саидов М.З. DAMP-опосредованное воспаление и регулируемая гибель клеток при иммуновоспалительных ревматических заболеваниях // Медицинская иммунология, 2023. Т. 25, № 1. С. 7-38. [Saidov M.Z. DAMP-mediated inflammation and regulated cell death in immunoinflammatory rheumatic diseases. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2023, Vol. 25, no. 1, pp. 7-38. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-DMI-2557.
5. Саидов М.З. Аутофагия, апоптоз, некроптоз, пироптоз и нетоз в патогенезе иммуновоспалительных ревматических заболеваний // Медицинская иммунология, 2022. Т. 24, № 4. С. 659-704. [Saidov M.Z.

Autophagy, apoptosis, necroptosis, pyroptosis and netosis in pathogenesis of immunoinflammatory rheumatic diseases. *Meditinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2022, Vol. 24, no. 4, pp. 659-704. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-AAN-2482.

6. Саидов М.З. Патогенетическое значение клеточного инфильтрата при иммуновоспалительных ревматических заболеваниях // Медицинская иммунология, 2021. Т. 23, № 6. С. 1239-1274. [Saidov M.Z. Pathogenetic value of cell infiltrate in immunoinflammatory rheumatic diseases. *Meditinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2021, Vol. 23, no. 6, pp. 1239-1274. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-PVO-2386.

7. Струков А.И., Бегларян А.Г. Патологическая анатомия и патогенез коллагеновых болезней. М.: Медгиз, 1963. 323 с. [Strukov A.I., Beglarian A.G. Pathological anatomy and pathogenesis of collagen diseases]. Moscow: Medgiz, 1963. 323 p.

8. Abdulahad D.A., Westra J., Bijzet J., Limburg P.C., Kallenberg C.G., Bijl M. High mobility group box 1 (HMGB1) and anti-HMGB1 antibodies and their relation to disease characteristics in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res. Ther.*, 2011, Vol. 13, no. 3, R71. doi: 10.1186/ar3332.

9. Ahrens S., Zelenay S., Sancho D., Hanč P., Kjær S., Feest, C., Fletcher G., Durkin C., Postigo A., Skehel M., Batista F., Thompson B., Way M., Reis e Sousa C., Schulz O. F-actin is an evolutionarily conserved damage-associated molecular pattern recognized by DNGR-1, a receptor for dead cells. *Immunity*, 2012, Vol. 36, no. 4, pp. 635-645.

10. Almeida F.F., Belz G.T. Innate lymphoid cells: models of plasticity for immune homeostasis and rapid responsiveness in protection. *Mucosal Immunol.*, 2016, Vol. 9, no. 5, pp. 1103-1112.

11. Ayres-Sander C.E., Lauridsen H., Maier C.L., Sava P., Pober J.S., Gonzalez A.L. Transendothelial migration enables subsequent transmigration of neutrophils through underlying pericytes. *PLoS One*, 2013, Vol. 8, no. 3, e60025. doi: 10.1371/journal.pone.0060025.

12. Babelova A., Moreth K., Tsalas-Greul W., Zeng-Brouwers J., Eickelberg O., Young M.F., Bruckner P., Pfeischifter J., Schaefer R.M., Grone H.-J., Schaefer L. Biglycan, a danger signal that activates the NLRP3 inflammasome via Toll-like and P2X receptors. *J. Biol. Chem.*, 2009, Vol. 284, no. 36, pp. 24035-24048.

13. Bertheloot D., Latz E. HMGB1, IL-1 α , IL-33 and S100 proteins: dual-function alarmins. *Cell Mol. Immunol.*, 2017, Vol. 14, no. 1, pp. 43-64.

14. Binder R. Functions of heat shock proteins in pathways of the innate and adaptive immune system. *J. Immunol.*, 2014, Vol. 193, no. 12, pp. 5765-5771.

15. Blander J.M. Regulation of the cell biology of antigen cross-presentation. *Annu. Rev. Immunol.*, 2018, Vol. 36, no. 1, pp. 717-753.

16. Block H., Herter J.M., Rossaint J., Stadtmann A., Kliche S., Lowel C.A., Zarbock A. Crucial role of SLP-76 and ADAP for neutrophil recruitment in mouse kidney ischemia-reperfusion injury. *J. Exp. Med.*, 2012, Vol. 209, no. 2, pp. 407-421.

17. Boniface K., Passeron T., Seneschal J., Tulic M.K. Targeting innate immunity to combat cutaneous stress: the vitiligo perspective. *Front. Immunol.*, 2021, Vol. 12, 613056. doi: 10.3389/fimmu.2021.613056.

18. Bouchon A., Facchetti F., Weigand M.A., Colonna M. TREM-1 amplifies inflammation and is a crucial mediator of septic shock. *Nature*, 2001, Vol. 410, no. 6832, pp. 1103-1107.

19. Brenu E. W., Staines D.R., Tajouri L., Huth T., Ashton K.J., Marshall-Gradisnik S.M. Heat shock proteins and regulatory T cells. *Autoimmune Dis.*, 2013, Vol. 2013, 813256. doi: 10.1155/2013/813256.

20. Broz P., Dixit V.M. Inflammasomes: mechanism of assembly, regulation and signalling. *Nat. Rev. Immunol.*, 2016, Vol. 16, no. 7, pp. 407-420.

21. Buckley C.D., Ross E.A., McGettrick H.M., Osborne C.E., Haworth O., Schmutz C., Stone P.C., Salmon M., Matharu N.M., Vohra R.K., Nash G.B., Rainger G.E. Identification of a phenotypically and functionally distinct population of long-lived neutrophils in a model of reverse endothelial migration. *J. Leukoc. Biol.*, 2006, Vol. 79, no. 2, pp. 303-311.

22. Caielli S., Athale S., Domic B., Murat E., Chandra M., Banchereau R., Baisch J., Phelps K., Clayton S., Gong M., Wright T., Punaro M., Palucka K., Guiducci C., Banchereau J., Pascual V. Oxidized mitochondrial nucleoids released by neutrophils drive type I interferon production in human lupus. *J. Exp. Med.*, 2016, Vol. 213, no. 5, pp. 697-713.

23. Carman C.V., Sage P.T., Sciuto T.E., de la Fuente M.A., Geha R.S., Ochs H.D., Dvorak H.F., Dvorak A.M., Springer T.A. Transcellular diapedesis is initiated by invasive podosomes. *Immunity*, 2007, Vol. 26, no. 6, pp. 784-797.

24. Cerezo A.L., Šumová, B., Prajzlerová K., Veigl D., Damgaard D., Nielsen C.H., Pavelka K., Vencovský J., Šenolt L. Calgizzarin (S100A11): a novel inflammatory mediator associated with disease activity of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res. Ther.*, 2017, Vol. 19, no. 1, 79. doi:10.1186/s13075-017-1288-y.

25. Chan T.Y., Yen C.L., Huang Y.F., Lo P.C., Nigrovic P.A., Cheng C.Y., Wang W.Z., Wu S.Y., Shieh C.C. Increased ILC3s associated with higher levels of IL-1 β aggravates inflammatory arthritis in mice lacking phagocytic NADPH oxidase. *Eur. J. Immunol.*, 2019, Vol. 49, no. 11, pp. 2063-2073.

26. Chen C.J., Kono H., Golenbock D., Reed G., Akira S., Rock K.L. Identification of a key pathway required for the sterile inflammatory response triggered by dying cells. *Nat. Med.*, 2007, Vol. 13, no. 7, pp. 851-856.

27. Chen C.J., Shi Y., Hearn A., Fitzgerald K., Golenbock D., Reed G., Akira S., Rock K.L. MyD88-dependent IL-1 receptor signaling is essential for gouty inflammation stimulated by monosodium urate crystals. *J. Clin. Invest.*, 2006, Vol. 116, no. 8, pp. 2262-2271.

28. Chen G.Y., Nunez G. Sterile inflammation: sensing and reacting to damage. *Nat. Rev. Immunol.*, 2010, Vol. 10, no. 12, pp. 826-837.

29. Chiba S., Ikushima H., Ueki H., Yanai H., Kimura Y., Hangai S., Nishio J., Negishi H., Tamura T., Saijo S., Iwakura Y., Taniguchi T. Recognition of tumor cells by Dectin-1 orchestrates innate immune cells for anti-tumor responses. *eLife*, 2014, Vol. 3, e04177. doi: 10.7554/eLife.04177.

30. Colom B., Bodkin J.V., Beyrau M., Woodfin A., Ody C., Rourke C., Chavakis T., Brohi K., Imhof B., Nourshargh S. Leukotriene B4-neutrophil elastase axis drives neutrophil reverse transendothelial cell migration *in vivo*. *Immunity*, 2015, Vol. 42, no. 6, pp. 1075-1086.
31. Comber J.D., Robinson T.M., Siciliano N.A., Snook A.E., Eisenlohr L.C. Functional macroautophagy induction by influenza A virus without a contribution to MHC-class II restricted presentation. *J. Virol.*, 2011, Vol. 85, no. 13, pp. 6453-6463.
32. de Rivero Vaccari J.C., Brand F.J., Berti A.F., Alonso O.F., Bullock M.R., Vaccari J.P. Mincle signaling in the innate immune response after traumatic brain injury. *J. Neurotrauma*, 2005, Vol. 32, no. 4, pp. 228-236.
33. Dengjel J., Schoor O., Fischer R., Reich M., Kraus M., Muller M., Kreyenborg K., Altenberend F., Brandenburg J., Kalbacher H., Brock R., Driessen C., Rammensee H.G., Stevanovic S. Autophagy promotes MHC class II presentation of peptides from intracellular source proteins. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.*, 2005, Vol. 102, no. 22, pp. 7922-7927.
34. de Oliveira S., Rosowski E.E., Huttenlocher A. Neutrophil migration in infection and wound repair: going forward in reverse. *Nat. Rev. Immunol.*, 2016, Vol. 16, no. 6, pp. 378-391.
35. Deppermann C., Kubers P. Start a fire, kill the bug: the role of platelets in inflammation and infection. *Innate Immun.*, 2018, Vol. 24, no. 6, pp. 335-348.
36. di Virgilio F., dal Ben D., Sarti A.C., Giuliani A.L., Falzoni S. The P2X7 receptor in infection and inflammation. *Immunity*, 2017, Vol. 47, no. 1, pp. 15-31.
37. Duvvuri B., Pachman L.M., Morgan G., Khojah A.M., Klein-Gitelman M., Curran M.L., Doty S., Lood C. Neutrophil extracellular traps in tissue and periphery in juvenile dermatomyositis. *Arthritis Rheumatol.*, 2020, Vol. 72, no. 2, pp. 348-358.
38. Eigenbrod T., Park J.H., Harder J., Iwakura Y., Nunez G. Cutting edge: critical role for mesothelial cells in necrosis-induced inflammation through the recognition of IL-1 α released from dying cells. *J. Immunol.*, 2008, Vol. 181, no. 12, pp. 8194-8198.
39. Fayyaz A., Kurien B.T., Scofield R.H. Autoantibodies in Sjögren's syndrome. *Rheum. Dis. Clin. North Am.*, 2016, Vol. 42, no. 3, pp. 419-434.
40. Fehres C.M., Kalay H., Bruijns S.C., Musaafr S.A., Ambrosini M., Bloois L., Vliet S.J., Storm G., Garcia-Vallejo J.J., Kooyk Y. Cross-presentation through langerin and DC-SIGN targeting requires different formulations of glycan-modified antigens. *J. Control Release*, 2015, Vol. 203, pp. 67-76.
41. Frangou E., Vassilopoulos D., Boletis J., Boumpas D.T. An emerging role of neutrophils and NETosis in chronic inflammation and fibrosis in systemic lupus erythematosus (SLE) and ANCA-associated vasculitides (AAV): implications for the pathogenesis and treatment. *Autoimmun. Rev.*, 2019, Vol. 18, no. 8, pp. 751-760.
42. Fu L., Han L., Xie C., Li W., Lin L., Pan S., Zhou Y., Li Z., Jin M., Zhang A. Identification of extracellular actin as a ligand for triggering receptor expressed on myeloid cells-1 signaling. *Front. Immunol.*, 2017, Vol. 8, 917. doi: 10.3389/fimmu.2017.00917.
43. Gabay C., Lamacchia C., Palmer G. IL-1 pathways in inflammation and human diseases. *Nat. Rev. Rheumatol.*, 2010, Vol. 6, no. 4, pp. 232-241.
44. Girbl T., Lenn T., Perez L., Rolas L., Barkaway A., Thiriot A., Fresno C.D., Lynam E., Hub E., Thelen M., Graham G., Alon R., Sancho D., Andrian U.H., Voisin M.-B., Rot A., Nourshargh S. Distinct compartmentalization of the chemokines CXCL1 and CXCL2 and the atypical receptor ACKR1 determine discrete stages of neutrophil diapedesis. *Immunity*, 2018, Vol. 49, no. 6, pp. 1062-1076.
45. Goldstein R.S., Bruchfeld A., Yang L., Qureshi A.R., Gallowitsch-Puerta M., Patel N.B., Huston B.J., Chavan S., Rosas-Ballina M., Gregersen P.K., Czura C.J., Sloan R.P., Sama A.E., Tracey K.J. Cholinergic anti-inflammatory pathway activity and High Mobility Group Box-1 (HMGB1) serum levels in patients with rheumatoid arthritis. *Mol. Med.*, 2007, Vol. 13, no. 3-4, pp. 203-209.
46. Gong T., Liu L., Jiang W., Zhou R. DAMP-sensing receptors in sterile inflammation and inflammatory diseases. *Nat. Rev. Immunol.*, 2020, Vol. 20, no. 2, pp. 95-112.
47. Gong Y., Koh D.R. Neutrophils promote inflammatory angiogenesis via release of preformed VEGF in an *in vivo* corneal model. *Cell Tissue Res.*, 2010, Vol. 339, no. 2, pp. 437-448.
48. Halle A., Hornung V., Petzold G.C., Stewart C.R., Monks B.G., Reinheckel T., Fitzgerald K.A., Latz E., Moore K.J., Golenbock D.T. The NALP3 inflammasome is involved in the innate immune response to amyloid- β . *Nat. Immunol.*, 2008, Vol. 9, no. 8, pp. 857-865.
49. Hangai S., Ao T., Kimura Y., Matsuki K., Kawamura T., Negishi H., Nishio J., Kodama T., Taniguchi T., Yanai H. PGE2 induced in and released by dying cells functions as an inhibitory DAMP. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 2016, Vol. 113, no. 14, pp. 3844-3849.
50. Harding S.M., Benti J.L., Irianto J., Discher D.E., Minn A.J., Greenberg R.A. Mitotic progression following DNA damage enables pattern recognition within micronuclei. *Nature*, 2017, Vol. 548, no. 7668, pp. 466-470.
51. Hardison S.E., Brown G.D. C-type lectin receptors orchestrate antifungal immunity. *Nat. Immunol.*, 2012, Vol. 13, no. 9, pp. 817-822.
52. Hepworth M.R., Monticelli L.A., Fung T.C., Ziegler C.G.K., Grunberg S., Sinha R., Mantegazza A.R., Ma H., Crawford A., Angelosanto J.M., Wherry E.J., Koni P.A., Bushman F.D., Elson C.O., Eberl G., Artis D., Sonnenberg G.F. Innate lymphoid cells regulate CD4⁺ T-cell responses to intestinal commensal bacteria. *Nature*, 2013, Vol. 498, no. 7452, pp. 113-117.
53. Hu B., Jin C., Li H.-B., Tong J., Ouyang X., Cetinbas N.M., Zhu S., Strowig T., Lam F.C., Zhao C., Henao-Mejia J., Yimaz O., Fitzgerald K.A., Eisenbarth S.C., Elinav E., Flavell R.A. The DNA-sensing AIM2 inflammasome controls radiation-induced cell death and tissue injury. *Science*, 2016, Vol. 354, no. 6313, pp. 765-768.

54. Huang Q.Q., Sobkoviak R., Jockheck-Clark A.R., Shi B., Mandelin A.M., Tak P.P., Haines G.K., Nicchitta C.V., Pope R.M. Heat shock protein 96 is elevated in rheumatoid arthritis and activates macrophages primarily via TLR2 signaling. *J. Immunol.*, 2009, Vol. 182, no. 8, pp. 4965-4973.
55. Huber-Lang M., Lambris J.D., Ward P.A. Innate immune responses to trauma. *Nat. Immunol.*, 2018, Vol. 19, no. 4, pp. 327-341.
56. Hudson B.I., Lippman M.E. Targeting RAGE signaling in inflammatory disease. *Annu. Rev. Med.*, 2018, Vol. 69, pp. 349-364.
57. Huysamen C., Willment J.A., Dennehy K.M., Brown G.D. CLEC9A is a novel activation C-type lectin-like receptor expressed on BDCA3⁺ dendritic cells and a subset of monocytes. *J. Biol. Chem.*, 2008, Vol. 283, no. 24, pp. 16693-16701.
58. Ireland J.M., Unanue E.R. Autophagy in antigen-presenting cells results in presentation of citrullinated peptides to CD4 T cells. *J. Exp. Med.*, 2011, Vol. 208, no. 13, pp. 2625-2632.
59. Janeway C.A. Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, 1989, Vol. 54, Pt 1, pp. 1-13.
60. Jay T.R., von Saucken V.E., Landreth G.E. TREM2 in neurodegenerative diseases. *Mol. Neurodegener.*, 2017, Vol. 12, no. 1, 56. doi: 10.1186/s13024-017-0197-5.
61. Jenkins S.J., Rucker I.D., Cook P.C., Jones L.H., Finkelman F.D., Local macrophage proliferation, rather than recruitment from the blood, is a signature of TH2 inflammation. *Science*, 2011, Vol. 332, no. 6035, pp. 1284-1288.
62. Joffre O.P., Segura E., Savina A., Amigorena S. Cross-presentation by dendritic cells. *Nat. Rev. Immunol.*, 2012, Vol. 12, no. 8, pp. 557-569.
63. Jog N.R., Blanco I., Lee I., Putterman C., Caricchio R. Urinary high-mobility group box-1 associates specifically with lupus nephritis class V. *Lupus*, 2016, Vol. 25, no. 14, pp. 1551-1557.
64. Jones H.R., Robb C.T., Perretti M., Rossi A.G. The role of neutrophils in inflammation resolution. *Semin. Immunol.*, 2016, Vol. 28, no. 2, pp. 137-145.
65. Jongbloed S.L., Kassianos A.J., McDonald K.J., Clark G.J., Ju X., Angel C.E., Chen C.J., Dunbar P.R., Wadley R.B., Jeet V., Vulink J.A., Hart D.N., Radford K.J. Human CD141⁺(BDCA-3)⁺dendritic cells (DCs) represent a unique myeloid DC subset that cross-presents necrotic cell antigens. *J. Exp. Med.*, 2010, Vol. 207, no. 6, pp. 1247-1260.
66. Karmakar M., Katsnelson M.A., Dubyak G.R. Neutrophil P2X7 receptors mediate NLRP3 inflammasome-dependent IL-1 β secretion in response to ATP. *Nat. Commun.*, 2016, Vol. 7, 10555. doi: org/10.1038/ncomms10555.
67. Kawasaki T., Kawai T. Toll-like receptor signaling pathways. *Front. Immunol.*, 2014, Vol. 5, 461. doi: 10.3389/fimmu.2014.004.
68. Khan N., Vidyarthi A., Pahari S., Negi S., Aqdas M., Nadeem S., Agnihotri T., Agrewala J.N. Signaling through NOD-2 and TLR-4 bolsters the T cell priming capability of dendritic cells by inducing autophagy. *Sci. Rep.*, 2016, Vol. 6, 1908. doi: 10.1038/srep19084.
69. Klemperer P. The concept of collagen diseases. *Am. J. Pathol.*, 1950, Vol. XXVI, no. 4, pp. 505-519.
70. Komada T., Chung H., Lau A., Platnich J.M., Beck P.L., Benediktsson H., Duff H.J., Jenne C.N., Muruve D.A. Macrophage uptake of necrotic cell DNA activates the Aim2 inflammasome to regulate a proinflammatory phenotype in CKD. *J. Am. Soc. Nephrol.*, 2018, Vol. 29, no. 4, pp. 1165-1181.
71. Kong D., Shen Y., Liu G., Zuo S., Ji Y., Lu A., Nakamura M., Lazarus M., Stratakis C.A., Breyer R.M., Yu Y. PKA regulatory II alpha subunit is essential for PGD2-mediated resolution of inflammation. *J. Exp. Med.*, 2016, Vol. 213, no. 10, pp. 2209-2226.
72. Kono H., Rock K.L. How dying cells alert the immune system to danger. *Nat. Rev. Immunol.*, 2008, Vol. 8, no. 4, pp. 279-289.
73. Kono H., Karmakar D., Iwakura Y., Rock K.L. Identification of the cellular sensor that stimulates the inflammatory response to sterile cell death. *J. Immunol.*, 2010, Vol. 184, no. 8, pp. 4470-4478.
74. Kovalenko A., Kim J.C., Kang T.B., Rajput A., Bogdanov K., Dittrich-Breiholz O., Kracht M., Brenner O., Wallach D. Caspase-8 deficiency in epidermal keratinocytes triggers an inflammatory skin disease. *J. Exp. Med.*, 2009, Vol. 206, no. 10, pp. 2161-2177.
75. Land W.G. Role of damage-associated molecular patterns in light of modern environmental research: a tautological approach. *Int. J. Environ. Res.*, 2020, Vol. 14, no. 5, pp. 583-604.
76. Land W.G. Use of DAMPs and SAMPs as therapeutic targets or therapeutics: a note of caution. *Mol. Diagn. Ther.*, 2020, Vol. 24, no. 3, pp. 251-262.
77. Lee G.S., Subramanian N., Kim A., Aksentijevich I., Goldbach-Mansky R., Sacks D.B., Germain R.N., Kastner D.L., Chae J.J., The calcium-sensing receptor regulates the NLRP3 inflammasome through Ca²⁺ and cAMP. *Nature*, 2012, Vol. 492, no. 7427, pp. 123-127.
78. 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.
79. Li Y., Xu P., Xu K., Cai Y.-S., Sun M., Yang L., Sun J., Lu S. Methotrexate affects HMGB1 expression in rheumatoid arthritis, and the downregulation of HMGB1 prevents rheumatoid arthritis progression. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 2016, Vol. 420, no. 1-2, pp. 161-170.
80. Lindahl H., Olsson T. Interleukin-22 Influences the Th1/Th17 Axis. *Front. Immunol.*, 2021, Vol. 12, 618110. doi: 10.3389/fimmu.2021.618110.
81. Lopalco G., Cantarini L., Vitale A., Iannone F., Anelli M.G., Andreozzi L., Lapadula G., Galeazzi M., Riganite D. Interleukin-1 as a common denominator from autoinflammatory to autoimmune disorders: premises, perils, and perspectives. *Mediators Inflamm.*, 2015, Vol. 2015, 194864. doi: 10.1155/2015/194864.

82. Lotfi R., Herzog G.I., DeMarco R.A., Beer-Stolz D., Lee J.J., Rubartelli A., Schrezenmeier H., Lotze M.T. Eosinophils oxidize damage-associated molecular pattern molecules derived from stressed cells. *J. Immunol.*, 2009, Vol. 183, no. 8, pp. 5023-5031.
83. Lukens J.R., Gross J.M., Kanneganti T.D. IL-1family cytokines trigger sterile inflammatory disease. *Front. Immunol.*, 2012, Vol. 3, 315. doi: 10.3389/fimmu.2012.00315.
84. Ma F., Li B., Liu S., Lyer S., Yu Y., Wu A., Cheng G. Positive feedback regulation of type I IFN production by the IFN-inducible DNA sensor cGAS. *J. Immunol.*, 2015, Vol. 194, no. 4, pp. 1545-1554.
85. Maggi L., Montaini G., Mazzoni A., Rossetti B., Capone M., Rossi M.C., Santarlasci V., Liotta F., Rossi O., Gallo O., de Palma R., Maggi E., Cosmi L., Romagnani S., Annunziato F. Human circulating group 2 innate lymphoid cells can express CD154 and promote IgE production. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2017, Vol. 139, no. 3, pp. 964-976.e4.
86. Mangan M.S.J., Olhava E.J., Roush W.R., Seidel H.M., Glick G.D., Latz E. Targeting the NLRP3 inflammasome in inflammatory diseases. *Nat. Rev. Drug Discov.*, 2018, Vol. 17, no. 8, pp. 588-606.
87. Martin C.A., Carsons S.E., Kowalewski R., Bernstein D., Valentino M., Santiago-Schwarz F. Aberrant extracellular and dendritic cell (DC) surface expression of heat shock protein (hsp)70 in the rheumatoid joint: possible mechanisms of hsp/DC-mediated cross-priming. *J. Immunol.*, 2003, Vol. 171, no. 11, pp. 5736-5742.
88. Matha L., Romera-Hernandez M., Steer C.A., Yin Y.H., Orangi M., Shim H., Chang C., Rossi F.M., Takei F. Migration of lung resident group 2 innate lymphoid cells link allergic lung inflammation and liver immunity. *Front Immunol.*, 2021, Vol. 12, 679509. doi: 10.3389/fimmu.2021.679509.
89. Matsuzawa-Ishimoto Y., Hwang S., Cadwell K. Autophagy and inflammation. *Annu. Rev. Immunol.*, 2018, Vol. 36, pp.73-101.
90. Matzinger P. Tolerance, danger, and the extended family. *Annu. Rev. Immunol.*, 1994, Vol. 12, pp. 991-1045.
91. Mázló A., Jenei V., Burai S., Molnár T., Bácsi A., Koncz G. Types of necroinflammation, the effect of cell death modalities on sterile inflammation. *Cell Death Dis.*, 2022, Vol. 13, 423. doi: 10.1038/s41419-022-04883-w.
92. McDonald B., Kubes P. Cellular and molecular choreography of neutrophil recruitment to sites of sterile inflammation. *J. Mol. Med.*, 2011, Vol. 89, no. 11, pp. 1079-1088.
93. McDonald B., Pittman K., Menezes G.B., Hirota S.A., Slaba I., Waterhouse C.C.M., Beck P.L., Muruve D.A., Kubes P. Intravascular danger signals guide neutrophils to sites of sterile inflammation. *Science*, 2010, Vol. 3306, no. 6002, pp. 362-366.
94. Melo-Gonzalez F., Kammoun H., Evren E., Dutton E.E., Papadopoulou M., Bradford B.M., Tanes C., Fardus-Reid F., Swan J.R., Bittinger K., Mabbott N.A., Vallance B.A., Willinger T., Withers D.R., Hepworth M.R. Antigen-presenting ILC3 regulate T cell-dependent IgA responses to colonic mucosal bacteria. *J. Exp. Med.*, 2019, Vol. 216, no. 4, pp.728-742.
95. Miles K., Clarke D.J., Lu W., Sibinska Z., Beaumont P.E., Davidson D.J., Barr T.A., Campopiano D.J., Gray M. Dying and necrotic neutrophils are anti-inflammatory secondary to the release of α -defensins. *J. Immunol.*, 2009, Vol. 183, no. 3, pp. 2122-2132.
96. Minter J.D., Macri C., Chin W.J., Panozza S.E., Segura E., Patterson N.L., Zeller P., Bourges D., Bedoui S., McMillan P.J., Idris A., Nowell C.J., Brown A., Radford J., Johnston A.P., Villadangos J.A. Differential use of autophagy by primary dendritic cells specialized in cross-presentation. *Autophagy*, 2015, Vol. 11, no. 6, pp. 906-917.
97. Mizushima N., Yoshimori T., Levine B. Methods in mammalian autophagy research. *Cell*, 2010, Vol. 140, no. 3, pp. 313-326.
98. Moreth K., Iozzo R.V., Schaefer L. Small leucine-rich proteoglycans orchestrate receptor crosstalk during inflammation. *Cell Cycle*, 2012, Vol. 11, no. 11, pp. 2084-2091.
99. Mortha A., Chudnovskiy A., Hashimoto D., Bogunovic M., Spencer S., Belkaid Y., Merad M. Microbiota-dependent crosstalk between macrophages and ILC3 promotes intestinal homeostasis. *Science*, 2014, Vol. 343, pp. 1439-1440.
100. Mueller D.L., Jenkins M.K., Schwartz R.H. Clonal expansion versus functional clonal inactivation: a costimulatory signalling pathway determines the outcome of T cell antigen receptor occupancy. *Annu. Rev. Immunol.*, 1989, Vol. 7, pp. 445-480.
101. Münz C. Antigen processing for MHC class II presentation via autophagy. *Front. Immunol.*, 2012, Vol. 3, 9. doi: 10.3389/fimmu.2012.00009.
102. Murshid A., Gong J., Calderwood S.K. The role of heat shock proteins in antigen cross presentation. *Front. Immunol.*, 2012, Vol. 3, 63. doi: 10.3389/fimmu.2012.00063.
103. Nastase M.V., Young M.F., Schaefer L. Biglycan. A multivalent proteoglycan providing structure and signals. *J. Histochem. Cytochem.*, 2012, Vol. 60, no. 12, pp. 963-975.
104. Nieswandt B., Watson S.P. Platelet-collagen interaction: Is GPVI the central receptor? *Blood*, 2003, Vol. 102, no. 2, pp. 449-461.
105. Nourshargh S., Alon R. Leukocyte migration into in flamed tissues. *Immunity*, 2014, Vol. 41, no. 5, pp. 694-707.
106. Nourshargh S., Hordijk P.L., Sixt M. Breaching multiple barriers:leukocyte motility through venular walls and the interstitium. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2010, Vol. 11, no. 5, pp. 366-378.
107. Peters N.C., Egen J.G., Secundino N., Debrabant A., Kimblin N., Kamhawi S., Lawyer P., Fay M.P., Germain R.N., Sacks D. *In vivo* imaging reveals an essential role for neutrophils in leishmaniasis transmitted by sand flies. *Science*, 2008, Vol. 321, no. 5891, pp. 970-974.
108. Pober J.S., Sessa W.C. Evolving functions of endothelial cells in inflammation. *Nat. Rev. Immunol.*, 2007, Vol. 7, no. 10, pp. 803-815.

109. Powell D., Tauzin S., Hind L.E., Deng Q., Beebe D.J., Huttenlocher A. Chemokine signaling and the regulation of bidirectional leukocyte migration in interstitial tissues. *Cell Rep.*, 2017, Vol. 19, no. 8, pp. 1572-1585.
110. Ravindran R., Khan N., Nakaya H.I., Li S., Loebbermann J., Maddur M.S., Park Y., Jones D.P., Chappert P., Davoust J., Weiss D.S., Virgin H.W., Ron D., Pulendran B. Vaccine activation of the nutrient sensor GCN2 in dendritic cells enhances antigen presentation. *Science*, 2014, Vol. 343, no. 6168, pp. 313-317.
111. Rock K.L., Latz E., Ontiveros F., Kono H. The sterile inflammatory response. *Annu. Rev. Immunol.*, 2010, Vol. 28, pp. 321-342.
112. Roers A., Hiller B., Hornung V. Recognition of endogenous nucleic acids by the innate immune system. *Immunity*, 2016, Vol. 44, no. 4, pp. 739-754.
113. Roh J.S., Sohn D.H. Damage-associated molecular patterns in inflammatory diseases. *Immune Netw.*, 2018, Vol. 18, no. 4, e27. doi: 10.4110/in.2018.18.e27.
114. Savio L.E.B., Mello P.A., da Silva C.G., Coutinho-Silva R. The P2X7 receptor in inflammatory diseases: angel or demon? *Front. Pharmacol.*, 2018, Vol. 9, 52. doi: 10.3389/fphar.2018.00052.
115. Schaefer L. Complexity of danger: the diverse nature of damage-associated molecular patterns. *J. Biol. Chem.*, 2014, Vol. 289, no. 51, pp. 35237-35245.
116. Schaefer L., Babelova A., Kiss E., Hausser H.J., Baliova M., Krzyzankova M., Marsche G., Young M.F., Mihalik D., Götte M., Malle E., Schaefer R.M., Gröne H.J. The matrix component biglycan is proinflammatory and signals through Toll-like receptors 4 and 2 in macrophages. *J. Clin. Invest.*, 2005, Vol. 115, no. 8, pp. 2223-2233.
117. Schierbeck H., Lundbäck P., Palmblad K., Klevenvall L., Erlandsson-Harris H., Andersson U., Ottosson L. Monoclonal anti-HMGB1 (high mobility group box chromosomal protein 1) antibody protection in two experimental arthritis models. *Mol. Med.*, 2011, Vol. 17, no. 9-10, pp. 1039-1044.
118. Schmid D., Pypaert M., Münz C. Antigen-loading compartments for major histocompatibility complex class II molecules continuously receive input from autophagosomes. *Immunity*, 2007, Vol. 26, no. 1, pp. 79-92.
119. Shlomovitz I., Erlich Z., Speir M., Zargarian S., Baram N., Engler M., Edry-Botzer L., Munitz A., Croker B.A., Gerlic M. Necroptosis directly induces the release of full-length biologically active IL-33 *in vitro* and in an inflammatory disease model. *FEBS J.*, 2019, Vol. 286, no. 3, pp. 507-522.
120. Shulman Z., Shinder V., Klein E., Grabovsky V., Yeger O., Geron E., Montresor A., Bolomini-Vittoti M., Feigelson S.W., Kirchhausen T., Laudanna C., Shakhar G., Alon R. Lymphocyte crawling and transendothelial migration require chemokine triggering of high-affinity LFA-1 integrin. *Immunity*, 2009, Vol. 30, no. 3, pp. 384-396.
121. Sohn D.H., Rhodes C., Onuma K., Zhao X., Sharpe O., Gazitt T., Shiao R., Fert-Bober J., Cheng D., Lahey L.J., Wong H.H., van Eyk J., Robinson W.H., Sokolove J. Local joint inflammation and histone citrullination in a murine model of the transition from preclinical autoimmunity to inflammatory arthritis. *Arthritis Rheumatol.*, 2015, Vol. 67, no. 11, pp. 2877-2887.
122. Sokolove J., Zhao X., Chandra P.E., Robinson W.H. Immune complexes containing citrullinated fibrinogen costimulate macrophages via Toll-like receptor 4 and Fcγ receptor. *Arthritis Rheum.*, 2010, Vol. 63, no. 1, pp. 53-62.
123. Stark K., Eckart A., Haidari S., Tirniceriu A., Lorenz M., von Bruhl, M-L., Gartner F., Khandoga A.G., Legate K.R., Pless R., Hepper I., Lauber K., Walzog B., Massberg S. Capillary and arteriolar pericytes attract innate leukocytes exiting through venules and 'instruct' them with pattern-recognition and motility programs. *Nat. Immunol.*, 2013, Vol. 14, no. 1, pp. 41-51.
124. Sun X.H., Liu Y., Han Y., Wang J. Expression and significance of high-mobility group protein B1 (HMGB1) and the receptor for advanced glycation end-product (RAGE) in knee osteoarthritis. *Med. Sci. Monit.*, 2016, Vol. 22, pp. 2105-2112.
125. Tammaro A., Derive M., Gibot S., Leemans J.C., Florquin S., Dessing M.C. TREM-1 and its potential ligands in non-infectious diseases: from biology to clinical perspectives. *Pharmacol. Ther.*, 2017, Vol. 177, pp. 81-95.
126. Tang D., Kang R., Coyne C.B., Zeh H.J., Lotze M.T. PAMPs and DAMPs: signal 0s that spur autophagy and immunity. *Immunol. Rev.*, 2012, Vol. 249, no. 1, pp. 158-175.
127. Tian J., Avalos A.M., Mao S-Y., Chen B., Senthil K., Wu H., Parroche P., Drabic S., Golenbock D., Sirois C., Hua J., An L.L., Audoly L., LaRosa G., Bierhaus A., Nawroth P., Marshak-Rothstein A., Crow M.K., Fitzgerald A. K., Latz E., Kiener P.A., Coyle A.J. Toll-like receptor 9-dependent activation by DNA-containing immune complexes is mediated by HMGB1 and RAGE. *Nat. Immunol.*, 2007, Vol. 8, no. 5, pp. 487-496.
128. Tullett K.M., Rojas I.L., Minoda Y., Tan P.S., Zhang J-G., Smith C., Khanna R., Shortman K., Caminschi I., Lahoud M.H., Radford K.J. Targeting CLEC9A delivers antigen to human CD141(+) DC for CD4(+) and CD8(+) T cell recognition. *JCI Insight*, 2016, Vol. 1, no. 7, e87102. doi: 10.1172/jci.insight.87102.
129. Uhl M., Kepp O., Jusforgues-Saklani H., Vicencio J.M., Kroemer G., Albert M.L. Autophagy within the antigen donor cell facilitates efficient antigen cross-priming of virus-specific CD8⁺ T cells. *Cell Death Differ.*, 2009, Vol. 16, no. 7, pp. 991-1005.
130. Vénéreau E., Ceriotti C., Bianchi M.E. DAMPs from cell death to new life. *Front. Immunol.*, 2015, Vol. 6, 422. doi: 10.3389/fimmu.2015.00422.
131. Vivier E., Artis D., Colonna M., Diefenbach A., Di Santo J.P., Eberl G., Koyasu S., Locksley R.M., McKenzie A.N., Mebius R.E., Powrie F., Spits H. Innate Lymphoid Cells: 10 Years On. *Cell*, 2018, Vol. 174, no. 5, pp. 1054-1066.
132. Voisin M.B., Nourshargh S. Neutrophil transmigration: emergence of an adhesive cascade within venular walls. *J. Innate Immun.*, 2013, Vol. 5, no. 4, pp. 336-347.
133. Voisin M.B., Pröbstl D., Nourshargh S. Venular basement membranes ubiquitously express matrix protein low-expression regions: characterization in multiple tissues and remodeling during inflammation. *Am. J. Pathol.*, 2010, Vol. 176, no. 1, pp. 482-495.

134. Vulcano M., Dusi S., Lissandrini D., Badolato R., Mazzi P., Riboldi E., Borroni E., Calleri A., Donini M., Plebani A., Notarangelo L., Musso T., Sozzani S. Toll receptor-mediated regulation of NADPH oxidase in human dendritic cells. *J. Immunol.*, 2004, Vol. 173, no. 9, pp. 5749-5756.
135. Wang J., Kubes P. A reservoir of mature cavity macrophages that can rapidly invade visceral organs to affect tissue repair. *Cell*, 2016, Vol. 165, no. 3, pp. 668-678.
136. Wang J. Neutrophils in tissue injury and repair. *Cell Tissue Res.*, 2018, Vol. 371, no. 3, pp. 531-539.
137. Wang Y., Ning X., Gao P., Wu S., Sha M., Lv M., Zhou X., Gao J., Fang R., Meng G., Su X., Jiang Z. Inflammasome activation triggers caspase-1-mediated cleavage of cGAS to regulate responses to DNA virus infection. *Immunity*, 2017, Vol. 46, no. 3, pp. 393-404.
138. Weidberg H., Shpilka T., Shvets E., Abada A., Shimron F., Elazar Z. LC3 and GATE-16 N termini mediate membrane fusion processes required for autophagosome biogenesis. *Dev. Cell*, 2011, Vol. 20, no. 4, pp. 444-454.
139. Weiss E., Kretschmer D. Formyl-peptide receptors in infection, inflammation, and cancer. *Trends Immunol.*, 2018, Vol. 39, no. 10, pp. 815-829.
140. Woodfin A., Voisin M.B., Beyrau M., Colom B., Caille D., Diapouli F.-M., Nash G.B., Chavakis T., Albelda S.M., Rainger G., Meda P., Imhof B.A., Nourshargh S. The junctional adhesion molecule JAM-C regulates polarized transendothelial migration of neutrophils *in vivo*. *Nat. Immunol.*, 2011, Vol. 12, no. 8, pp. 761-769.
141. Wu D., Zeng Y., Fan Y., Wu J., Mulatibieke T., Ni J., Yu G., Wan R., Wang X., Hu G. Reverse-migrated neutrophils regulated by JAM-C are involved in acute pancreatitis-associated lung injury. *Sci. Rep.*, 2016, Vol. 6, 20545. doi: 10.1038/srep20545.
142. Xiahou Z., Wang X., Shen J., Zhu X., Xu F., Hu R., Guo D., Li H., Tian Y., Liu Y., Liang H. NMI and IFP35 serve as proinflammatory DAMPs during cellular infection and injury. *Nat. Commun.*, 2017, Vol. 8, 950. doi: 10.1038/s41467-017-00930-9.
143. Yamamoto S., Shimizu S., Kiyonaka S., Takahashi N., Wajima T., Hara Y., Negoro T., Hiroi T., Kiuchi Y., Okada T., Kaneko S., Lange I., Fleig A., Penner R., Nishi M., Takeshima H., Mori Y. TRPM2-mediated Ca^{2+} influx induces chemokine production in monocytes that aggravates inflammatory neutrophil infiltration. *Nat. Med.*, 2008, Vol. 14, no. 7, pp. 738-747.
144. Yatim N., Cullen S., Albert M.L. Dying cells actively regulate adaptive immune responses. *Nat. Rev. Immunol.*, 2017, Vol. 17, no. 4, pp. 262-275.
145. Ye R.D., Sun L. Emerging functions of serum amyloid A in inflammation. *J. Leukoc. Biol.*, 2015, Vol. 98, no. 6, pp. 923-929.
146. Zarbock A., Singbartl K., Ley K. Complete reversal of acid-induced acute lung injury by blocking of platelet-neutrophil aggregation. *J. Clin. Invest.*, 2006, Vol. 116, no. 12, pp. 3211-3219.
147. Zeng-Brouwers J., Pandey S., Trebicka J., Wygrecka M., Schaefer L. Communications via the small leucine-rich proteoglycans: molecular specificity in inflammation and autoimmune diseases. *J. Histochem. Cytochem.*, 2020, Vol. 68, no. 12, pp. 887-906.
148. Zhang J.-G., Czabotar P.E., Policheni A.N., Caminschi I., San Wan S., Kitsoulis S., Kirsteen M., Tullett K.M., Robin A.Y., Brammananth R., van Delft M.F., Lu J., O'Reilly L.A., Josefsson E.C., Kile B.T., Chin W.J., Mintern J.G., Olshina M.A., Wong W., Baum J., Wright M.D., Huang D.S., Mohandas N., Coppel R.L., Colman P.M., Nicola N.A., Shortman K., Lahoud M.H. The dendritic cell receptor Clec9A binds damaged cells via exposed actin filaments. *Immunity*, 2012, Vol. 36, no. 4, pp. 646-657.
149. Zhong Z., Zhai Y., Liang S., Mori Y., Han R., Sutterwala F.S., Qiao L. TRPM2 links oxidative stress to NLRP3 inflammasome activation. *Nat. Commun.*, 2013, Vol. 4, 1611. doi: 10.1038/ncomms2608.
150. Zhu H., Fang X., Zhang D., Wu W., Shao M., Wang L., Gu J. Membrane-bound heat shock proteins facilitate the uptake of dying cells and cross-presentation of cellular antigen. *Apoptosis*, 2016, Vol. 21, no. 1, pp. 96-109.
151. Zindel J., Kubes P. DAMPs, PAMPs, and LAMPs in immunity and sterile inflammation. *Annu. Rev. Pathol.*, 2020, Vol. 15, pp. 493-518.

Автор:

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

Author:

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

Поступила 14.04.2023

Отправлена на доработку 17.10.2023

Принята к печати 18.10.2023

Received 14.04.2023

Revision received 17.10.2023

Accepted 18.10.2023

ВЛИЯНИЕ СТРЕПТОКОККОВОЙ АРГИНИНДЕИМИНАЗЫ НА ФУНКЦИОНАЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ CD4⁺ И CD8⁺ ПОПУЛЯЦИЙ Т-ЛИМФОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА

Старикова Э.А.^{1, 2, 3}, Маммедова Дж.Т.¹, Ожиганова А.¹,
Лебедева А.М.¹, Левешко Т.А.¹, Бурова Л.А.¹, Кудрявцев И.В.^{1, 2}

¹ ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

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

³ Институт медицинского образования ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр имени В.А. Алмазова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Резюме. Метаболизм аргинина играет важную роль в регуляции функций клеток иммунной системы у млекопитающих. Патогенные микробы используют механизм истощения аргинина для подавления иммунного ответа при инфекции. Аргининдеиминаза — микробный аргинин-гидролизующий фермент, необходимый для выживания при низком рН в очаге инфекции или внутри фаголизосом, а также в условиях низкого содержания глюкозы. Влияние бактериальной аргининдеиминазы на функции клеток адаптивного иммунного ответа остается слабо изученным. Цель исследования состояла в изучении влияния стрептококковой аргининдеиминазы на пролиферацию и аутофагию CD4⁺ и CD8⁺ популяций Т-лимфоцитов периферической крови человека.

Действие фермента на клетки изучали с использованием супернатантов разрушенных ультразвуком *Streptococcus pyogenes* M49-16 и его изогенного мутанта с инактивированным геном *arcA* (*Streptococcus pyogenes* M49-16 Δ arcA). Исследование проводили с использованием крови здоровых доноров. Фракцию мононуклеарных лейкоцитов выделяли путем центрифугирования на градиенте плотности Фиколла. Для оценки пролиферации использовали метод, основанный на окрашивании внутриклеточных белков прижизненным флуоресцентным красителем carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE). Исследование уровня аутофагии в клетках проводили с использованием флуоресцентного красителя Lysotracker Green DND-26. Для анализа пролиферации и аутофагии Т-хелперов (CD3⁺CD4⁺) и цитотоксических Т-лимфоцитов (CD3⁺CD4⁻) клеточные суспензии, окрашивали антителами против CD4, CD45RA, и CD3. Долю клеток в состоянии некроза определяли путем их окрашивания флуо-

Адрес для переписки:

Старикова Элеонора Александровна
ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины»
197376, Россия, Санкт-Петербург,
ул. Акад. Павлова, 12.
Тел.: 8 (812) 234-68-68.
E-mail: Starickova@yandex.ru

Address for correspondence:

Eleonora A. Starikova
Institute of Experimental Medicine
12 Acad. Pavlov St
St. Petersburg
197376 Russian Federation
Phone: +7 (812) 234-68-68.
E-mail: Starickova@yandex.ru

Образец цитирования:

Э.А. Старикова, Дж.Т. Маммедова, А. Ожиганова, А.М. Лебедева, Т.А. Левешко, Л.А. Бурова, И.В. Кудрявцев «Влияние стрептококковой аргининдеиминазы на функциональную активность CD4⁺ и CD8⁺ популяций Т-лимфоцитов периферической крови человека» // Медицинская иммунология, 2024. Т. 26, № 3. С. 503-512.
doi: 10.15789/1563-0625-EOS-2910

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

For citation:

E.A. Starikova, J.T. Mammedova, A. Ozhiganova, A.M. Lebedeva, T.A. Leveshko, L.A. Burova, I.V. Kudryavtsev
“Effect of streptococcal arginine deiminase on the function of CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes”, Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2024, Vol. 26, no. 3, pp. 503-512.
doi: 10.15789/1563-0625-EOS-2910

© Starikova E.A. et al., 2024
The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License
DOI: 10.15789/1563-0625-EOS-2910

ресцентным ДНК-связывающим красителем DAPI. Нормальность распределения оценивали тестом Шапиро–Уилка. Данные были проанализированы с использованием критерия Краскела–Уоллиса с последующим применением критерия Манна–Уитни для попарных сравнений и выражены в виде медианы и межквартильных диапазонов ($Q_{0,25}$ – $Q_{0,75}$).

Сравнение эффектов супернатантов разрушенных стрептококков исходного и мутантного штаммов, которые отличались по экспрессии одного гена аргининдеиминазы, показало, что бактериальный фермент не оказывал влияния на функции неактивированных лимфоцитов. Однако стрептококковая аргининдеиминаза полностью подавляла стимулированную anti-CD2/CD3/CD28 антителами пролиферацию CD4⁺ и CD8⁺Т-лимфоцитов. Эти эффекты сопровождалось снижением в клетках уровня аутофагии. В то же время аргининдеиминаза не обладала цитотоксическими эффектами в отношении лимфоцитов. Введение супрафизиологических концентраций L-аргинина исследуемые восстанавливало клеточные функции. Различий между исследуемыми параметрами CD4⁺ и CD8⁺ популяций Т-лимфоцитов выявлено не было.

Полученные данные показывают, что антипролиферативное действие аргининдеиминазы может быть связано со способностью фермента ингибировать аутофагию и доказывают способность бактериального фермента подавлять адаптивные иммунные реакции организма-хозяина.

Ключевые слова: Т-лимфоциты, аргининдеиминаза, *Streptococcus pyogenes*, аргинин, пролиферация, аутофагия

EFFECT OF STREPTOCOCCAL ARGININE DEIMINASE ON THE FUNCTION OF CD4⁺ AND CD8⁺T LYMPHOCYTES

Starikova E.A.^{a, b, c}, Mammedova J.T.^a, Ozhiganova A.^a, Lebedeva A.M.^a, Leveshko T.A.^a, Burova L.A.^a, Kudryavtsev I.V.^{a, b}

^a Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

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

^c Institute of Medical Education, V. Almazov National Medical Research Centre, St. Petersburg, Russian Federation

Abstract. Arginine metabolism plays an important role in regulating the functions of immune cells in mammals. Pathogenic microbes use the mechanism of arginine depletion to suppress the immune response during infection. Arginine deiminase is a microbial arginine-hydrolyzing enzyme important for survival at low pH in the focus of infection, or in phagolysosomes, as well as under low-glucose conditions. The effect of bacterial arginine deiminase on the functions of adaptive immune cells remains poorly understood. The aim of our study was to evaluate the effect of streptococcal arginine deiminase on the proliferation and autophagy of CD4⁺ and CD8⁺ human peripheral blood T lymphocytes.

The enzyme effects were studied with supernates of ultrasonic lysates from parental *Streptococcus pyogenes* M49-16, and its isogenic mutant with inactivated *arcA* gene (*Streptococcus pyogenes* M49-16delarcA). The study was performed with blood samples of healthy donors. The fraction of mononuclear leukocytes was isolated by centrifugation in a Ficoll density gradient. To evaluate proliferation levels, a method based on the staining of intracellular proteins with vital fluorescent dye carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE) was used. The level of autophagy was studied using the fluorescent Lysotracker Green DND-26 dye. To analyze the proliferation and autophagy of T helper cells (CD3⁺CD4⁺) and cytotoxic T lymphocytes (CD3⁺CD4⁻), the obtained cell suspensions were stained with antibodies against CD4, CD45RA, and CD3. The proportion of necrotic cells was determined by staining with a fluorescent DNA-binding DAPI dye. The normality of the distribution was assessed by Shapiro–Wilk test. The data were analyzed using Kruskal–Wallis criterion, followed by Mann–Whitney criterion for pairwise comparisons and expressed as median and interquartile ranges ($Q_{0,25}$ – $Q_{0,75}$).

When comparing the effects of supernatants from the parental and mutant streptococcal strains, which differed in expression of arginine deiminase gene, we have shown that the bacterial enzyme had no effect on the functions of inactive lymphocytes. However, streptococcal arginine deiminase completely suppressed proliferation of CD4⁺ and CD8⁺T lymphocytes stimulated with anti-CD2/CD3/CD28 antibodies. These effects were accompanied by a decrease in the autophagy levels. At the same time, arginine deiminase did not

exert cytotoxic effects upon lymphocytes. L-arginine applied at the doses exceeding physiological levels caused restoration of the cellular functions. There were no differences between the studied parameters of CD4⁺ and CD8⁺T lymphocyte subsets.

The obtained data show that the antiproliferative effect of arginine demimnase may be associated with ability of the enzyme to inhibit autophagy and confirm an opportunity of the bacterial enzyme to suppress host adaptive immune responses.

Keywords: T lymphocytes, arginine deiminase, *Streptococcus pyogenes*, arginine, proliferation, autophagy

Список сокращений

АДИ — аргининдеиминаза; СРС — супернатант разрушенных стрептококков; CD — cluster of differentiation, кластер дифференцировки; CFSE — carboxyfluorescein succinimidyl ester; DAPI, 4', 6-diamidino-2-phenylindole, 4', 6-диамидин-2-фенилиндол; IL — interleukin, интерлейкин.

Введение

Аргинин — условно незаменимая аминокислота, которая участвует в ключевых метаболических процессах детоксикации аммиака, действует как секретагог, поддерживает гомеостаз сосудов и цитотоксические функции макрофагов, в качестве субстрата для синтеза оксида азота [29]. Опубликовано большое количество данных, которые доказывают важную роль метаболизма этой аминокислоты в регуляции иммунных реакций [21, 26, 29] при физиологических иммунодефицитах [19], в ходе опухолевого роста [25] и инфекционных заболеваний [6, 8].

Многие патогенные микробы — *Salmonella typhimurium* [20], *Mycobacterium tuberculosis* [7], *Leishmania mexicana* [10] и *Schistosoma mansoni* [30], *Helicobacter pylori* [12] *Candida spp.* [11] используют механизм истощения аргинина с целью иммунной эвазии. Аргининдеиминаза (АДИ) — микробный аргинингидролизующий фермент, необходимый для выживания при низком pH в очаге инфекции или внутри фаголизосом, а также синтеза аденозинтрифосфата в условиях низкого содержания глюкозы [15]. Модификация конъюгированного с полиэтиленгликолем рекомбинантного белка активно исследуется как препарат для противоопухолевой терапии [14]. Относительно немного работ направлено на изучение влияния этого фермента на защитные иммунные реакции. Установлено, что *Streptococcus pyogenes* (*S. pyogenes*) используют АДИ для подавления выработки оксида азота макрофагами хозяина [1, 3]. *S. pyogenes* с инактивированным геном АДИ имеют сниженную вирулентность [28]. Также известно, что АДИ подавляет пролиферацию разных типов трансформированных клеток [13, 17], а также индуцированную митогенами пролиферацию лейкоцитов периферической крови человека [4, 16, 27]. Также было установлено, что

действие АДИ на опухолевые клетки связано с их голоданием, в ходе которого происходит mTOR/S6 — опосредованная индукция аутофагии [18]. Механизмы регуляции функциональной активности Т-лимфоцитов под действием АДИ остаются не изученными.

Целью данного исследования было изучение влияния стрептококковой АДИ на пролиферацию и аутофагию CD4- и CD8-популяции Т-лимфоцитов периферической крови человека.

Материалы и методы

Получение супернатантов разрушенных стрептококков

В работе использовали супернатанты разрушенных стрептококков (СРС) *Streptococcus pyogenes* штамм М49-16 и его изогенного мутанта М49-16delArcA с инактивированным геном аргининдеиминазы (штаммы любезно предоставлены зав. отд. молекулярной микробиологии, д.м.н. проф. Суворовым А.Н., ФБГНУ «ИЭМ»). Методики получения мутантного штамма *S. pyogenes* М49-16delArcA и приготовления СРС описаны ранее [28].

Выделение фракции мононуклеарных лейкоцитов периферической крови человека

Кровь здоровых доноров в возрасте от 20 до 50 лет была собрана в пробирки, содержащие антикоагулянт К₃EDTA. Исследование с участием людей было рассмотрено и одобрено Этическим комитетом ФБГНУ «Институт экспериментальной медицины», разрешение № 2/19 от 25 марта 2019 года. Выделение мононуклеарных лейкоцитов осуществляли методом осаждения клеток в градиенте фикола (ООО «БиолоТ», Россия) плотностью 1,077 г/мл. Жизнеспособность клеток определяли с помощью окраски 0,2%-ным раствором трипанового синего и последующим подсчетом живых и мертвых клеток в камере Горяева. Жизнеспособность клеток составляла не менее 98%. Клетки ресуспендировали и культивировали в среде RPMI-1640 (НПП «ПанЭко», Россия), содержащей 10% инактивированной эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС) (Invitrogen, США), 2 mM глутамин (ООО «БиолоТ», Россия), 50 мкг/мл гентамицина (ООО «БиолоТ», Россия) и 50 мкМ β-меркаптоэтанола (Sigma-Aldrich, США). Кон-

центрацию клеток доводили до 1 млн/1 мл. Клетки культивировали при 37 °С во влажной атмосфере с 5% содержанием CO₂. В дальнейшем клеточную суспензию использовали для оценки влияния СРС на активацию, дифференцировку клеток и активность процессов аутофагии.

Изучение пролиферативной активности Т-клеток

Для оценки пролиферации использовали метод, основанный на окрашивании внутриклеточных белков прижизненным флуоресцентным красителем CFSE (carboxyfluorescein succinimidyl ester) (Sigma-Aldrich, США). Выделенные, как описано ранее, мононуклеарные лейкоциты периферической крови человека доводили до концентрации 1×10^6 клеток на мл физиологического раствора (ООО «БиолоТ», Россия) содержащего CFSE (Sigma-Aldrich, США) в конечной концентрации 0,5 мкг/мл и оставляли на 10 мин на водяной бане при 37 °С. После этого клетки дважды отмывали от красителя центрифугированием при 300g, 4 °С в течение 15 мин в холодном растворе Хенкса, содержащем 1% ЭТС (Sigma-Aldrich, США). Окрашенные CFSE клетки ресуспендировали в полной культуральной среде RPMI 1640 (ООО «БиолоТ», Россия), содержащий 10% ЭТС (Invitrogen, США), 50 мкг/мл гентамицина (ООО «БиолоТ», Россия), 2 мМ glutamina (ООО «БиолоТ», Россия) и 50 мМ β-меркаптоэтанола (Sigma-Aldrich, США). Клетки вносили в лунки 24-луночного планшета в концентрации 2 млн/мл. Для индукции пролиферации использовали T Cell Activation/Expansion Kit (Miltenyi Biotec Inc., GmbH, США), содержащий бусы, нагруженные anti-CD2/CD3/CD28 антителами, в соответствии с рекомендациями производителя. СРС исходного и мутантного штаммов вносили в разведении 1/200, в некоторые лунки добавляли L-аргинин в концентрации 2 мМ (Sigma-Aldrich, США). Клетки инкубировали в течение 96 часов, на 3-й день проводили частичную замену культуральной среды на свежую среду с добавками. После инкубации клетки переносили в пробирки для проточной цитометрии (Beckman Coulter, США). Далее, для анализа пролиферации Т-хелперов (CD3⁺CD4⁺) и цитотоксических Т-лимфоцитов (CD3⁺CD4⁻), полученные клеточные суспензии, окрашивали антителами против: CD4, меченными APC (кат. № IM2468); CD45RA, меченными PC7 (кат. № B10821) CD3, меченными APC-Alexa 750 (кат. № A66329) (все — Beckman Coulter, США) в соответствии с рекомендациями производителя. Для анализа доли клеток в состоянии некроза проводили окрашивание образцов ДНК-связывающим красителем DAPI (Invitrogen, США) в концен-

трации 300 нМ. Здесь и далее, пробы анализировали на проточном цитометре Navios (Beckman Coulter, США). Для анализа данных проточной цитометрии использовали FCS Express (De Novo Software, США) демоверсию. Результаты выражали как Индекс деления — параметр, отражающий среднее число делений, которым подверглась клетка исходной популяции.

Изучение аутофагии Т-клеток

Для исследования процессов аутофагии клетки активировали с использованием T Cell Activation/Expansion Kit (Miltenyi Biotec Inc., GmbH, США) и инкубировали с исследуемыми веществами, как описано выше, 48 либо 96 ч при 37 °С во влажной атмосфере с 5% содержанием CO₂. В последнем случае на третий день производили частичную замену культуральной среды с добавкой всех исследуемых компонентов. Для оценки интенсивности аутофагии Т-хелперов и цитотоксических Т-лимфоцитов (CD3⁺CD4⁻) производили окрашивание клеточной суспензии коктейлем анти-тел, как это было описано выше. Далее в пробы вносили краситель Lysotracker Green DND-26 (Invitrogen, США) в концентрации 50 нМ. Через 15 мин клетки отмывали центрифугированием в 1 мл фосфатно-солевого буфера 5 мин при 300 g и вносили 300 нМ красителя DAPI. Для анализа данных проточной цитометрии использовали Kaluza (Beckman Coulter Software, США). Позитивные по DAPI клетки в состоянии некроза исключали из анализа. Результаты измерения уровня аутофагии выражали в средних значениях интенсивности флуоресценции — MFI.

Статистическая обработка данных

Статистический анализ и графическое представление были выполнены с использованием программного обеспечения Prism 6.0 (GraphPad Software, Inc., США), Microsoft Excel 2010 и Statistica 7.0, Kaluza Analysis и программное обеспечение Navios (Beckman Coulter, США). Для проверки нормальности распределения использовали критерий Шапиро—Уилка и Колмогорова—Смирнова. Данные были проанализированы с использованием критерия Краскела—Уоллиса с последующим применением критерия Манна—Уитни для попарных сравнений и выражены в виде медианы и межквартильных диапазонов (Q_{0,25}–Q_{0,75}), по меньшей мере, из 8 измерений. Нулевая гипотеза была отвергнута при $p < 0,05$.

Результаты

Сравнение влияния СРС исходного и мутантного штаммов на пролиферацию CD4⁺ и CD8⁺ популяций Т-клеток

В контроле без стимуляции Индекс деления составил 3,1 (2,29–3,96) для CD4⁺, и 3,2 (2,11–

4.02) для CD8⁺Т-клеток. СРС исходного и мутантного штаммов, также как добавка аргинина не оказывали достоверного влияния на пролиферацию CD4⁺ и CD8⁺Т-клеток (рис. 1). При активации клеток под действием бус, нагруженных anti-CD2/CD3/CD28 антителами, происходило достоверное повышение Индекса деления до 9,1 (6,88-14,53) для CD4⁺ и 13,6 (8,75-14,80) для CD8⁺Т-клеток в контроле. Индексы деления Т-клеток в присутствии СРС мутантного штамма не отличались от таковых в контроле и составляли 10,7 (8,24-15,40) для CD4⁺ и 11,1 (7,28-14,14) для CD8⁺Т-клеток. СРС исходного штамма полностью подавлял индуцированную антителами пролиферацию Т-клеток. В этих условиях Индекс пролиферации лимфоцитов фактически оставался на уровне нестимулированных клеток (2,2 (2,11-3,49) для CD4⁺ и 2,2 (2,11-3,45) для CD8⁺), а введение добавки аргинина достоверно повышало их пролиферативную активность. При этом добавка аргинина подавляла стимулированную нагруженными anti-CD2/CD3/CD28 антителами бусами пролиферацию CD8⁺ (9,5 (6,51-11,48)) Т-клеток в контроле. Во всех остальных случаях влияние добавки аргинина не было достоверным. Статистически значимых отличий интенсивности пролиферации CD4⁺ и CD8⁺Т-клеток в разных условиях культивирования выявлено не было.

Сравнение влияния СРС исходного и мутантного штаммов на аутофагию CD4⁺ и CD8⁺ популяций Т-клеток

Усиление процессов аутофагии является необходимым условием активации и пролиферации Т-клеток [2]. В следующей серии экспериментов изучали влияние АДИ на процессы аутофагии. Уровень аутофагии в контроле без стимуляции для CD4⁺Т-лимфоцитов составил 3,0 (2,60-3,66) MFI через 48 часов и 3,1 (2,69-3,86) MFI через 96 часов. В этих условиях уровень аутофагии CD8⁺Т-лимфоцитов значительно не отличался и составлял 3,5 (3,04-3,95) MFI через 48 часов и 3,6 (2,94-4,22) MFI через 96 часов (рис. 2). Было установлено, что ни один из исследуемых факторов (ни СРС исходного, ни СРС мутантного штаммов, ни добавка аргинина) не изменяли уровень аутофагии Т-клеток (рис. 2). При активации под действием бус, нагруженных anti-CD2/CD3/CD28 антителами, в течение 48 часов происходило достоверное повышение уровня аутофагии как CD4⁺ (5,9 (4,53-7,67) MFI), так и CD8⁺ (5,6 (4,64-6,84) MFI) Т-клеток, которое сохранялось на протяжении всего срока наблюдения (96 часов). Значения аутофагии у клеток, которые культивировали в присутствии СРС исходного штамма, были ниже по сравнению с этим параметром в контроле и в присутствии СРС мутантного штамма. Однако достоверная разница наблюдалась только для CD8⁺Т-клеток на сроке 96 часов. Введение добавки аргинина приводило к достовер-

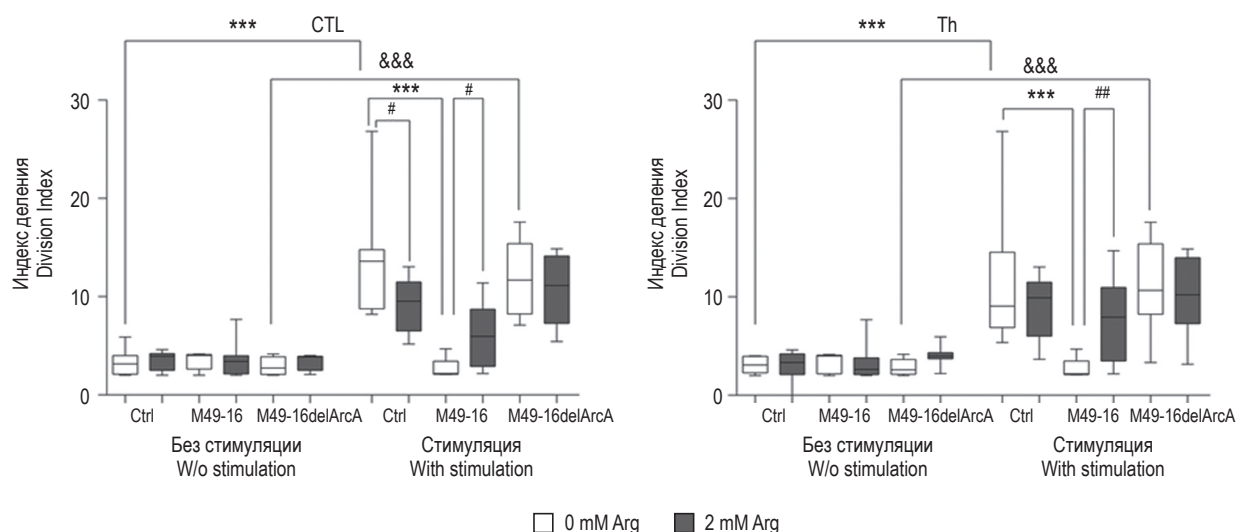


Рисунок 1. Сравнение влияния супернатантов разрушенных *Streptococcus pyogenes* исходного и мутантного штаммов на пролиферацию CD4⁺ и CD8⁺ популяций Т-клеток

Примечание. Данные представлены как Ме ($Q_{0.25}$ - $Q_{0.75}$), n = 8. Отличия статистически значимы: 3 символа – p < 0,001; 2 символа – p < 0,005; 1 символ – p < 0,05. CTL – CD8⁺Т-лимфоциты; Th – CD4⁺Т-лимфоциты; Arg – аргинин; ctrl – контроль.

Figure 1. Comparison of the effect of destroyed *Streptococcus pyogenes* supernatants of the parental and mutant strains on the CD4⁺ and CD8⁺ T cell subsets proliferation

Note. The data is presented as Me ($Q_{0.25}$ - $Q_{0.75}$), n = 8. The differences are statistically significant: 3 characters, p < 0.001; 2 character, p < 0.005; 1 character, p < 0.05. CTL, CD8⁺ T lymphocytes; Th, CD4⁺ T lymphocytes; Arg, arginine; ctrl, control.

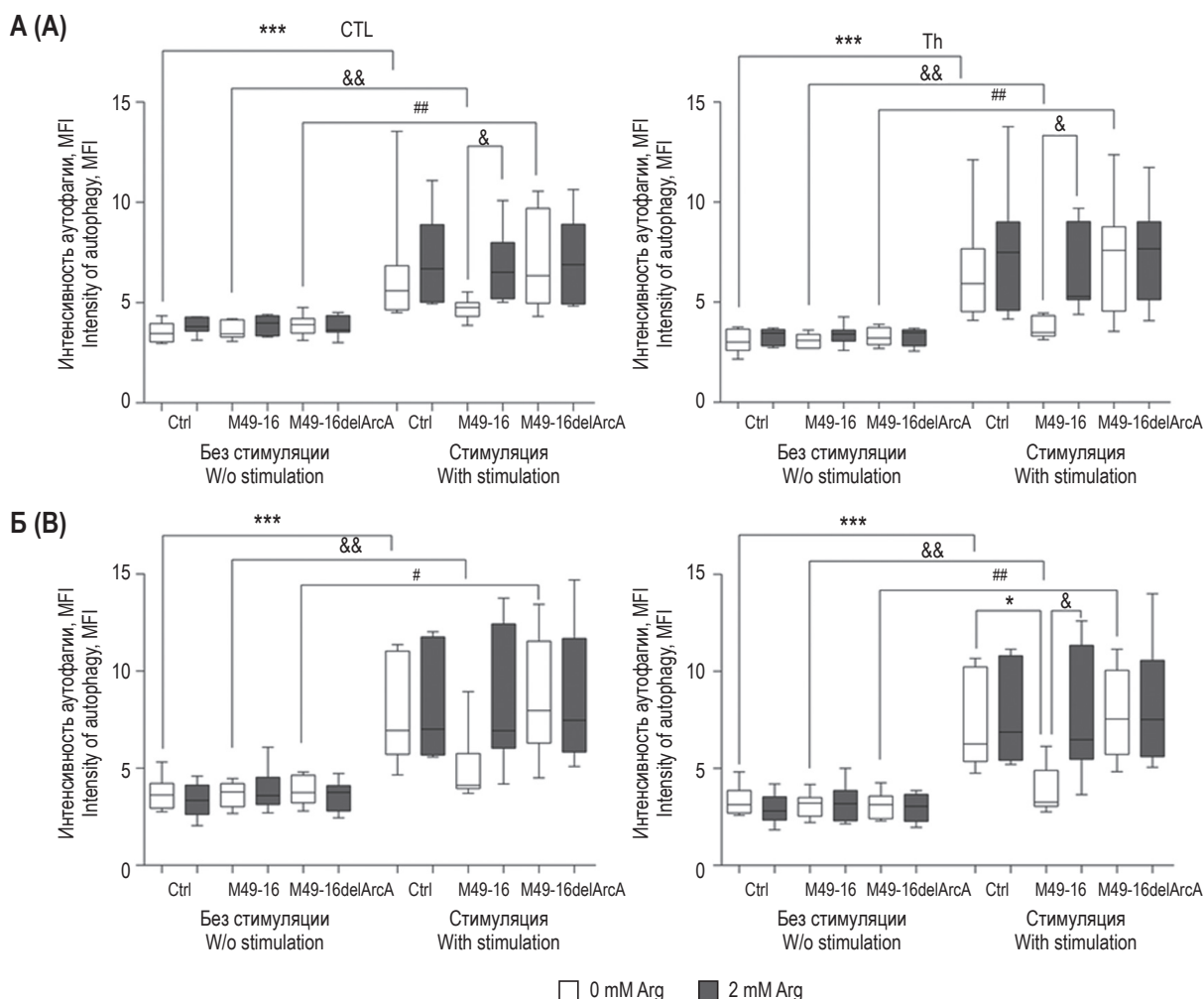


Рисунок 2. Сравнение влияния супернатантов разрушенных *Streptococcus pyogenes* исходного и мутантного штаммов на аутофагию CD4⁺ и CD8⁺ популяций Т-клеток (А) 48 часов инкубации; (Б) 96 часов инкубации

Примечание. См примечание к рисунку 1.

Figure 2. Comparison of the effect of destroyed *Streptococcus pyogenes* supernatants of the parental and mutant strains on the CD4⁺ and CD8⁺ T cell subsets autophagy. (A) 48 hours of incubation; (B) 96 hours of incubation

Note. As for Figure 1.

ному повышению аутофагии CD4⁺Т-клеток, подавленной под влиянием СРС исходного штамма на сроке 48 часов до 5,29 (5,13-9,03) MFI. Для CD8⁺Т-клеток достоверное повышение уровня аутофагии под действием добавки аргинина наблюдалось и на сроке 48 (6,52 (5,19-7,99) MFI) и сроке 96 часов (6,93 (6,04-12,4) MFI). Уровень аутофагии CD4⁺, так и CD8⁺Т-клеток в разных условиях культивирования значительно не отличался.

Сравнение влияния СРС исходного и мутантного штаммов на жизнеспособность Т-клеток

Принимая во внимание, обнаруженные ингибиторные эффекты АДИ в отношении лимфоцитов, в последующих экспериментах проверяли, не связано ли действие фермента с его токсическим действием на клетки. Для этого проводили оценку доли Т-клеток в состоянии некроза (DAPI-

позитивных) в разных условиях культивирования. Анализ данных показал, что после 48 часов культивирования доля клеток в состоянии некроза в стандартных условиях (контроль) составила (83,72 (80,32-87,97) %) (рис. 3). Культивирование клеток в присутствии СРС исходного и мутантного штаммов в течение 48 часов не оказывало влияния на их жизнеспособность. Более того, на сроке 96 часов в условиях без стимуляции в присутствии СРС исходного и мутантного штаммов происходило достоверное повышение жизнеспособности Т-клеток по сравнению с этим показателем в контроле. СРС не оказывали влияния на исследуемый показатель в отношении клеток стимулированных под действием бус, нагруженных anti-CD2/CD3/CD28 антителами. Стимуляция клеток с использованием бус, нагруженных

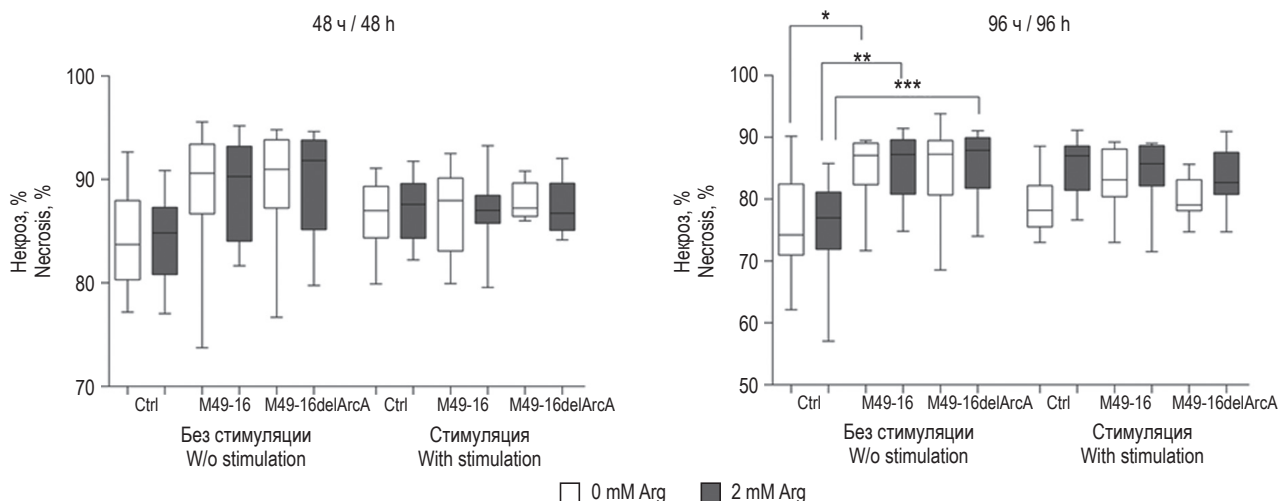


Рисунок 3. Сравнение влияния супернатантов разрушенных *Streptococcus pyogenes* исходного и мутантного штаммов на жизнеспособность Т-лимфоцитов

Примечание. Данные представлены как Me ($Q_{0.25}$ - $Q_{0.75}$), $n = 13$. Отличия статистически значимы: 3 символа – $p < 0,001$; 2 символа – $p < 0,005$; 1 символ – $p < 0,05$. Arg – аргинин; ctrl – контроль.

Figure 3. Comparison of the effect of destroyed *Streptococcus pyogenes* supernatants of the parental and mutant strains on the viability of T lymphocytes

Note. The data is presented as Me ($Q_{0.25}$ - $Q_{0.75}$), $n = 13$. The differences are statistically significant: 3 characters, $p < 0.001$; 2 characters, $p < 0.005$; 1 character, $p < 0.05$. Arg, arginine; ctrl, control.

anti-CD2/CD3/CD28 антителами, клеток также не оказывала влияния на их жизнеспособность.

Обсуждение

Сравнение эффектов СРС исходного и мутантного штаммов, которые отличаются по экспрессии гена *arcA*, позволяет заключить, что стрептококковая АДИ оказывает одинаковое антипролиферативное действие в отношении CD8⁺ и CD4⁺Т-клеток периферической крови человека, сопровождающееся снижением уровня аутофагии.

Полученные при изучении пролиферации результаты согласуются с ранее проведенными исследованиями, в которых было установлено, что экстракты клеток *S. pyogenes* типа M5 (штамм Manfredo) обладали мощным и дозозависимым ингибирующим действием на антиген, суперантиген или митоген-стимулированную пролиферацию мононуклеарных клеток периферической крови человека *in vitro*, которое было обусловлено активностью АДИ [4]. В нашем предыдущем исследовании также было доказано ингибирующее влияние АДИ *S. pyogenes* M49-16 на пролиферативную активность мононуклеарных лейкоцитов периферической крови, индуцированную конканавалином А. Снижение пролиферации сопровождалось подавлением уровня экспрессии тирозинфосфатазы CD45, которая модулирует сигнал от Т клеточного рецептора [27]. При изучении

патогенной роли *Granulicatella elegans* в развитии эндокардита, было исследовано влияние внеклеточных продуктов этой бактерии на мононуклеарные клетки периферической крови человека. Культуральные супернатанты, полученные из пероральных изолятов *G. elegans* и содержащие АДИ значительно подавляли пролиферацию мононуклеарных лейкоцитов периферической крови человека, индуцированную под действием фитогемагглютинаина-Р, форбол-12-миристат-13-ацетата, конканавалина А и стафилококкового энтеротоксина В [16].

Недавние исследования показали, что активация и поддержание высокого уровня макроавтофагии необходимо для устойчивой пролиферации, выживания, а также дифференцировки CD4⁺Т-клеток [5]. А подавление лизосомальной активности в CD4⁺Т-клетках снижает необходимый для их активации уровень гликолиза и окислительного фосфорилирования [22]. Во время дифференцировки Т-клеток аутофагия также служит для удаления накопленных нефункциональных митохондрий, что снижает уровень окислительного стресса в клетках, подвергшихся множественным делениям [22, 24, 31]. Полученные в этом исследовании данные показывают, что снижение интенсивности аутофагии под действием стрептококковой АДИ может быть причиной снижения пролиферативной активности Т-клеток. Эти данные противоречат результатам

другого исследования, в котором изучали изменение функциональной активности Т-клеток в условиях абсолютного дефицита аргинина [9]. В частности, было показано, что при активации Т-клеток митогеном в дефицитной по аргинину среде происходила индукция аутофагии и остановка клеточного цикла в G₀/G₁. Авторы показали, что в отсутствие аргинина аутофагия была необходима для выживания Т-лимфоцитов и делала остановку клеточного цикла обратимой. Нельзя исключать, что Т-клетки усиливают аутофагию в условиях голодания абсолютного дефицита аргинина, а частичное снижение концентрации аминокислоты под действием АДИ [23] приводит к подавлению аутофагии.

Заключение

В данном исследовании получены дополнительные данные, раскрывающие некоторые механизмы, с помощью которых стрептококковая АДИ, может подавлять иммунные реакции организма-хозяина. Принимая во внимание, что конкуренция между хозяином и патогеном за аргинин может определять исход инфекционных заболеваний, терапевтические стратегии, направленные на регулирование аргинин-метабо-

лизирующих ферментов, могут оказаться полезным инструментом для терапии инфекционных заболеваний.

Вклад авторов

Концепция и дизайн исследования — Старикова Э.А., сбор данных — Маммедова Д.Т., Старикова Э.А., Ожиганова А., Лебедева А.М., Левешко Т.А., Бурова Л.А., обработка данных — Старикова Э.А., Маммедова Д.Т., Лебедева А.М., Ожиганова А., написание и редактирование рукописи — Старикова Э.А., Бурова Л.А., Кудрявцев И.В.

Благодарности

Авторы выражают благодарность руководителю отдела молекулярной микробиологии Института экспериментальной медицины, профессору А.Н. Суворову за предоставленные штаммы *S. pyogenes*.

Финансирование

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 22-24-20013, <https://rscf.ru/project/22-24-20013/>, и Региона (грант Санкт-Петербургского научного фонда в соответствии с соглашением от «14» апреля 2022 г. № 45/2022).

Список литературы / References

1. Головин А.С., Старикова Э.А., Фрейдлин И.С. Влияние аргининдеиминазы *Streptococcus pyogenes* на бактерицидную активность макрофагов // Медицинский академический журнал, 2016. Т. 16, № 4. С. 152-152. [Golovin A.S., Starikova E.A., Freidlin I.S. Effect of *Streptococcus pyogenes* arginine deiminase on bacterial activity of macrophages. *Meditsinskiy akademicheskiy zhurnal = Medical Academic Journal*, 2016, Vol. 16, no. 4, pp. 152-152. (In Russ.)]
2. Arbogast F., Gros F. Lymphocyte autophagy in homeostasis, activation, and inflammatory diseases. *Front. Immunol.*, 2018, Vol. 9, 1801. doi: 10.3389/fimmu.2018.01801.
3. Cusumano Z.T., Watson M.E., Caparon M.G. *Streptococcus pyogenes* arginine and citrulline catabolism promotes infection and modulates innate immunity. *Infect. Immun.*, 2014, Vol. 82, no. 1, pp. 233-242.
4. Degnan B.A., Palmer J.M., Robson T., Jones C.E.D., Fischer M., Glanville M., Mellor G.D., Diamond A.G., Kehoe M.A., Goodacre J. Inhibition of human peripheral blood mononuclear cell proliferation by *streptococcus pyogenes* cell extract is associated with arginine deiminase activity. *Infect. Immun.*, 1998, Vol. 66, no. 7, pp. 3050-3058.
5. Dowling J.K., Afzal R., Gearing L.J., Cervantes-Silva M.P., Annett S., Davis G.M., de Santi C., Assmann N., Dettmer K., Gough D.J., Bantug G.R., Hamid F.I., Nally F.K., Duffy C.P., Gorman A.L., Liddicoat A.M., Lavelle E.C., Hess C., Oefner P.J., Finlay D.K., Davey G.P., Robson T., Curtis A.M., Hertzog P.J., Williams B.R.G., McCoy C.E. Mitochondrial arginase-2 is essential for IL-10 metabolic reprogramming of inflammatory macrophages. *Nat. Commun.*, 2021, Vol. 12, no. 1, 1460. doi: 10.1038/s41467-021-21617-2.
6. Dross S.E., Munson P.V., Kim S.E., Bratt D.L., Tunggal H.C., Gervassi A.L., Fuller D.H., Horton H. Kinetics of myeloid-derived suppressor cell frequency and function during simian immunodeficiency virus infection, combination antiretroviral therapy, and treatment interruption. *J. Immunol.*, 2017, Vol. 198, no. 2, pp. 757-766.
7. El Kasmi K.C., Qualls J.E., Pesce J.T., Smith A.M., Thompson R.W., Henao-Tamayo M., Basaraba R.J., König T., Schleicher U., Koo M.-S., Kaplan G., Fitzgerald K.A., Tuomanen E.I., Orme I.M., Kanneganti T.-D., Bogdan C., Wynn T.A., Murray P.J. Toll-like receptor-induced arginase 1 in macrophages thwarts effective immunity against intracellular pathogens. *Nat. Immunol.*, 2008, Vol. 9, no. 12, pp. 1399-1406.

8. Gabrilovich D.I. The dawn of myeloid-derived suppressor cells: identification of arginase I as the mechanism of immune suppression. *Cancer Res.*, 2021, Vol. 81, no. 15, pp. 3953-3955.
9. García-Navas R., Munder M., Mollinedo F. Depletion of L-arginine induces autophagy as a cytoprotective response to endoplasmic reticulum stress in human T lymphocytes. *Autophagy*, 2012, Vol. 8, no. 11, pp. 1557-1576.
10. Gaur U., Roberts S.C., Dalvi R.P., Corraliza I., Ullman B., Wilson M.E. An effect of parasite-encoded arginase on the outcome of murine cutaneous leishmaniasis. *J. Immunol.*, 2007, Vol. 179, no. 12, pp. 8446-8453.
11. Ghosh S.; Navarathna D.H.M.L.P.; Roberts D.D.; Cooper J.T.; Atkin A.L.; Petro T.M.; Nickerson K.W. Arginine-induced germ tube formation in *Candida albicans* is essential for escape from murine macrophage line RAW 264.7. *Infect. Immun.*, 2009, Vol. 77, no. 4, pp. 1596-1605.
12. Gobert A.P., McGee D.J., Akhtar M., Mendz G.L., Newton J.C., Cheng Y., Mobley H.L., Wilson K.T. *Helicobacter pylori* arginase inhibits nitric oxide production by eukaryotic cells: a strategy for bacterial survival. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 2001, Vol. 98, no. 24, pp. 13844-13849.
13. Gong H., Zölzer F., von Recklinghausen G., Rössler J., Breit S., Havers W., Fotsis T., Schweigerer L. Arginine deiminase inhibits proliferation of human leukemia cells more potently than asparaginase by inducing cell cycle arrest and apoptosis. *Leukemia*, 2000, Vol. 14, no. 5, pp. 826-829.
14. Han R.Z., Xu G.C., Dong J.J., Ni Y. Arginine deiminase: recent advances in discovery, crystal structure, and protein engineering for improved properties as an anti-tumor drug. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2016, Vol. 100, no. 11, pp. 4747-4760.
15. Hirose Y., Yamaguchi M., Sumitomo T., Nakata M., Hanada T., Okuzaki D., Motooka D., Mori Y., Kawasaki H., Coady A., Uchiyama S., Hiraoka M., Zurich R.H., Amagai M., Nizet V., Kawabata S. *Streptococcus pyogenes* upregulates arginine catabolism to exert its pathogenesis on the skin surface. *Cell Rep.*, 2021, Vol. 34, no. 13, 108924. doi: 10.1016/j.celrep.2021.108924.
16. Kanamoto T., Sato S., Nakashima H., Inoue M. Proliferation of mitogen-stimulated human peripheral blood mononuclear cells is inhibited by extracellular arginine deiminase of *Granulicatella elegans* isolated from the human mouth. *J. Infect. Chemother.*, 2007, Vol. 13, no. 5, pp. 353-355.
17. Kim R.H., Coates J.M., Bowles T.L., McNerney G.P., Sutcliffe J., Jung J.U., Gandour-Edwards R., Chuang F.Y.S., Bold R.J., Kung H.-J. Arginine deiminase as a novel therapy for prostate cancer induces autophagy and caspase-independent apoptosis. *Cancer Res.*, 2009, Vol. 69, no. 2, pp. 700-708.
18. Kim J.-E., Kim S.Y., Lee K.W., Lee H.J. Arginine deiminase originating from *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* American Type Culture Collection (ATCC) 7962 induces G1-phase cell-cycle arrest and apoptosis in SNU-1 stomach adenocarcinoma cells. *Br. J. Nutr.*, 2009, Vol. 102, no. 10, pp. 1469-1476.
19. Köstlin-Gille N., Gille C. Myeloid-Derived Suppressor Cells in Pregnancy and the Neonatal Period. *Front. Immunol.*, 2020, Vol. 11, 584712. doi: 10.3389/fimmu.2020.584712.
20. Lahiri A., Das P., Chakravorty D. Arginase modulates *Salmonella* induced nitric oxide production in RAW264.7 macrophages and is required for *Salmonella* pathogenesis in mice model of infection. *Microbes Infect.*, 2008, Vol. 10, no. 10-11, pp. 1166-1174.
21. Lahmar Q., Schoupe E., Morias Y., van Overmeire E., de Baetselier P., Movahedi K., Laoui D., Sarukhan A., van Ginderachter J.A. Monocytic myeloid-derived suppressor cells home to tumor-draining lymph nodes via CCR2 and locally modulate the immune response. *Cell. Immunol.*, 2021, Vol. 362, 104296. doi: 10.1016/j.cellimm.2021.104296.
22. Macian F. Autophagy in T Cell Function and Aging. *Front. Cell Dev. Biol.*, 2019, Vol. 7, 213. doi: 10.3389/fcell.2019.00213.
23. Mammedova J.T., Sokolov A.V., Burova L.A., Karaseva A.B., Grudinina N.A., Gorbunov N.P., Malashicheva A.B., Semenova D.S., Kiseleva E.P., Starikova E.A. Streptococcal arginine deiminase regulates endothelial inflammation, mTOR pathway and autophagy. *Immunobiology*, 2023, Vol. 228, no. 2, 152344. doi: 10.1016/j.imbio.2023.152344.
24. Murera D., Arbogast F., Arnold J., Bouis D., Muller S., Gros F. CD4 T cell autophagy is integral to memory maintenance. *Sci. Rep.*, 2018, Vol. 8, no. 1, 5951. doi: 10.1038/s41598-018-23993-0.
25. Peyraud F., Guégan J.-P., Bodet D., Nafia I., Fontan L., Auzanneau C., Cousin S., Roubaud G., Cabart M., Chomy F., Le Loarer F., Chaput N., Danlos F.-X., Planchard D., Even C., Khettab M., Tselikas L., Besse B., Barlesi F., Soria J.-C., Marabelle A., Bessede A., Italiano A. Circulating L-arginine predicts the survival of cancer patients treated with immune checkpoint inhibitors. *Ann. Oncol.*, 2022, Vol. 33, no. 10, pp. 1041-1051.
26. Rath M., Müller I., Kropf P., Closs E.I., Munder M. Metabolism via arginase or nitric oxide synthase: two competing arginine pathways in macrophages. *Front. Immunol.*, 2014, Vol. 5, 532. doi: 10.3389/fimmu.2014.00532.
27. Starickova E.A., Leveshko T.A., Churakina D.V., Kudryavtsev I.V., Burova L.A., Freidlin I.S. *S. pyogenes* M49-16 arginine deiminase inhibits proliferative activity of human peripheral blood lymphocytes. *Russian Journal of Infection and Immunity*, 2021, Vol. 11, no. 2, 2. doi: 10.15789/2220-7619-ADF-1363.

28. Starikova E.A., Golovin A.S., Vasilyev K.A., Karaseva A.B., Serebriakova M.K., Sokolov A.V., Kudryavtsev I.V., Burova L.A., Voynova I.V., Suvorov A.N., Vasilyev V.B., Freidlin I.S. Role of arginine deiminase in thymic atrophy during experimental *Streptococcus pyogenes* infection. *Scand. J. Immunol.*, 2019, Vol. 89, no. 2, e12734. doi: 10.1111/sji.12734.
29. Starikova E.A., Rubinstein A.A., Mammedova J.T., Isakov D.V., Kudryavtsev I.V. Regulated arginine metabolism in immunopathogenesis of a wide range of diseases: is there a way to pass between scylla and charybdis? *Curr. Issues Mol. Biol.*, 2023, Vol. 45, no. 4, pp. 3525-3551.
30. Thompson R.W., Pesce J.T., Ramalingam T., Wilson M.S., White S., Cheever A.W., Ricklefs S.M., Porcella S.F., Li L., Ellies L.G., Wynn T.A. Cationic amino acid transporter-2 regulates immunity by modulating arginase activity. *PLoS Pathog.*, 2008, Vol. 4, no. 3, e1000023. doi: 10.1371/journal.ppat.1000023.
31. Xu X., Araki K., Li S., Han J.-H., Ye L., Tan W.G., Konieczny B.T., Bruinsma M.W., Martinez J., Pearce E.L., Green D.R., Jones D.P., Virgin H.W., Ahmed R. Autophagy is essential for effector CD8(+) T cell survival and memory formation. *Nat. Immunol.*, 2014, Vol. 15, no. 12, pp. 1152-1161.

Авторы:

Старикова Э.А. — к.б.н., старший научный сотрудник отдела иммунологии ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины»; доцент кафедры иммунологии ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ; доцент кафедры клеточной биологии и гистологии, Институт медицинского образования ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр имени В.А. Алмазова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Маммедова Дж.Т. — научный сотрудник отдела иммунологии ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

Ожиганова А. — младший научный сотрудник отдела иммунологии ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

Лебедева А.М. — к.б.н., научный сотрудник отдела иммунологии ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

Левешко Т.А. — лаборант-исследователь отдела иммунологии ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

Бурова Л.А. — д.м.н., ведущий научный сотрудник отдела молекулярной микробиологии ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

Кудрявцев И.В. — к.б.н., заведующий лабораторией клеточной иммунологии отдела иммунологии ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины»; доцент кафедры иммунологии ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Authors:

Starikova E.A., PhD (Biology), Senior Research Associate, Department of Immunology, Institute of Experimental Medicine; Associate Professor, Department of Immunology, First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University; Associate Professor, Department of Cell Biology and Histology, Institute of Medical Education, V. Almazov National Medical Research Centre, St. Petersburg, Russian Federation

Mammedova J.T., Research Associate, Department of Immunology, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

Ozhiganova A., Junior Research Associate, Department of Immunology, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

Lebedeva A.M., PhD (Biology), Research Associate, Department of Immunology, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

Leveshko T.A., Laboratory Assistant-Researcher, Department of Molecular Microbiology, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

Burova L.A., PhD, MD (Medicine), Leading Research Associate, Department of Molecular Microbiology, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

Kudryavtsev I.V., PhD (Biology), Head, Laboratory of Cellular Immunology, Department of Immunology, Institute of Experimental Medicine; Associate Professor, Department of Immunology, First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

МИНОРНАЯ ПОПУЛЯЦИЯ НК-ЛИМФОЦИТОВ С КОЭКСПРЕССИЕЙ CD19

Калашникова А.А.¹, Бычкова Н.В.^{1,2}

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

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

Резюме. В последнее десятилетие в связи с широким распространением многоцветной проточной цитометрии для рутинных тестов в зарубежной литературе появились единичные сообщения о выявлении в крови и костном мозге пациентов минорной субпопуляции НК-клеток со слабой коэкспрессией В-клеточного антигена CD19. Практически отсутствует оценка частоты встречаемости и относительного количества CD56⁺CD19^{dim} клеток, нет данных о фенотипических особенностях, а также связи этой субпопуляции с какой-либо патологией. Цель исследования — оценить частоту встречаемости, относительное количество и фенотипические характеристики минорной субпопуляции лимфоцитов CD56⁺CD19^{dim} в образцах крови пациентов, направляемых на исследование субпопуляционного состава лимфоцитов. Материалом являлась периферическая кровь иммунокомпрометированных лиц. Методом восьмицветной проточной цитометрии определяли субпопуляционный состав лимфоцитов с использованием маркеров CD3, CD4, CD8, CD19, CD25, CD45, CD56, HLA-DR. Для оценки частоты встречаемости субпопуляции CD56⁺CD19^{dim} осуществляли ретроспективный анализ LMD-файлов 1210 исследований для 935 пациентов. Средний возраст обследованных лиц 39,8±14,7 года, среди них 84 ребенка до 18 лет. Ряду пациентов исследование выполнялось неоднократно. Дополнительное фенотипирование CD56⁺CD19^{dim} клеток проводили с использованием широкой панели антител к В-клеточным и Т/НК-клеточным антигенам.

Частота встречаемости образцов крови, содержащих CD56⁺CD19^{dim} клетки, составила 1,2%, при относительном количестве субпопуляции 2,1±1,9% от лимфоцитов и 0,8±0,6% от лейкоцитов. Максимальный размер субпопуляции составил 8,8% от лимфоцитов (2,8% от лейкоцитов). Отмечено длительное сохранение субпопуляции на протяжении всего периода наблюдения за пациентами — от двух месяцев до 6 лет. Сопоставление экспрессии дополнительных маркеров субпопуляциями НК-лимфоцитов CD56⁺CD19^{dim} и CD56⁺CD19⁻ выявило особенности первой, а именно высокую экспрессию CD2 и CD57, сниженную плотность экспрессии CD7, CD16, CD38. Определен фенотип изученной субпопуляции: CD56⁺CD19^{dim}CD2^{bright}CD7^{dim}CD11c⁺CD16^{dim}CD38^{dim}CD45RA⁺CD57⁺CD94^{dim}NKG2D⁺CD3⁻CD4⁻CD5⁻CD20⁻CD21⁻CD25⁻CD45R0⁻CD62L⁻CD79b⁻CD117⁻ с вариабельной экспрессией CD8 и HLA-DR. Фенотип соответствует активированным терминально дифференцированным адаптивным НК-лимфоцитам, связанным с цитомегаловирусной инфекцией. В нашей работе у лиц с субпопуляцией CD56⁺CD19^{dim} лимфоцитов в крови отмечена цитомегаловирусная инфекция в анамнезе и реактивация хронической ВЭБ-инфекции на момент исследования. Вероятной при-

Адрес для переписки:

Калашникова Анастасия Андреевна
ФГБУ «Всероссийский центр экстренной
и радиационной медицины имени А.М. Никифорова»
МЧС России
197345, Россия, Санкт-Петербург,
ул. Лебедева, 4/2.
Тел.: 8 (812) 339-39-39.
E-mail: petkova_nas@mail.ru

Address for correspondence:

Anastasia A. Kalashnikova
A. Nikiforov Russian Centre of Emergency
and Radiation Medicine
4/2 Lebedev St
St. Petersburg
197345 Russian Federation
Phone: +7 (812) 339-39-39.
E-mail: petkova_nas@mail.ru

Образец цитирования:

А.А. Калашникова, Н.В. Бычкова «Минорная популяция НК-лимфоцитов с коэкспрессией CD19» // Медицинская иммунология, 2024. Т. 26, № 3. С. 513-522. doi: 10.15789/1563-0625-MPO-2920

© Калашникова А.А., Бычкова Н.В., 2024
Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

A.A. Kalashnikova, N.V. Bychkova "Minor population of NK lymphocytes with CD19 coexpression", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2024, Vol. 26, no. 3, pp. 513-522.
doi: 10.15789/1563-0625-MPO-2920

© Kalashnikova A.A., Bychkova N.V., 2024
The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License
DOI: 10.15789/1563-0625-MPO-2920

чиной коэкспрессии CD19 может быть трогоцитоз НК-клеткой фрагмента мембраны В-лимфоцита при активной ВЭБ-инфекции. Субпопуляция CD56⁺CD19^{dim} лимфоцитов может достигать заметных величин и искажать результаты иммунологических исследований, выполняемых методом проточной цитометрии. Особенно вероятны ошибки при оценке минимальной определяемой болезни при острых В-клеточных лейкозах. Минорная популяция НК-лимфоцитов CD56⁺CD19^{dim} может быть идентифицирована в рутинных иммунологических исследованиях, а ее функциональные особенности и связь с патологией нуждаются в дальнейшем изучении.

Ключевые слова: CD19⁺НК-клетки, CD56⁺CD19^{dim}, адаптивные НК, трогоцитоз, ВЭБ-инфекция

MINOR POPULATION OF NK LYMPHOCYTES WITH CD19 COEXPRESSION

Kalashnikova A.A.^a, Bychkova N.V.^{a, b}

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

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

Abstract. Single reports were published concerning a minor subpopulation of NK cells with weak coexpression of the B cell antigen CD19 in the patients' blood and bone marrow. The frequency and relative number of CD56⁺CD19^{dim} cells is virtually not assessed, and there is no data on their phenotypic characteristics, as well as the connection of this subpopulation with any disease state. The purpose of the present study was to assess the frequency, relative quantity and phenotypic characteristics of CD56⁺CD19^{dim} lymphocytes in blood of patients referred for assessment of the lymphocyte subpopulation profile.

Peripheral blood of immunocompromised individuals was taken, and subpopulation composition of lymphocytes was determined using eight-color flow cytometry (markers: CD3, CD4, CD8, CD19, CD25, CD45, CD56, HLA-DR). To estimate incidence of the CD56⁺CD19^{dim} subpopulation, we have carried out a retrospective analysis of LMD files on 1210 studies for 935 patients (average age, 39.8±14.7 years old) including 84 children under 18 years old. The study was performed repeatedly for some patients. Phenotyping of CD56⁺CD19^{dim} cells was performed using a panel of antibodies to B cell, T/NK cell antigens.

The occurrence of blood samples containing CD56⁺CD19^{dim} was 1.2%, with a relative content of 2.1±1.9% among total lymphocyte population (0.8±0.6% of leukocytes). Long-term persistence of the subpopulation was noted in the patients throughout the entire observation period. The comparison of specific marker expression by NK CD56⁺CD19^{dim}, and CD56⁺CD19⁻ cells revealed high expression of CD2, CD57, reduced expression density of CD7, CD16, CD38. The phenotype of the studied NK cell subpopulation was as follows: CD56⁺CD19^{dim}CD2^{bright}CD7^{dim}CD11c⁺CD16^{dim}CD38^{dim}CD45RA⁺CD57⁺CD94^{dim}NKG2D⁺CD3⁻CD4⁻CD5⁻CD20⁻CD21⁻CD25⁻CD45R0⁻CD62L⁻CD79b⁻CD117⁻, with variable expression of CD8 and HLA-DR. The phenotype is consistent with activated terminally differentiated adaptive NK associated with cytomegalovirus infection. The individuals with CD56⁺CD19^{dim} had a history of CMV-infection and reactivation of chronic EBV-infection at the time of the study. A probable cause of CD19 coexpression may be trogocytosis of B cell membrane fragments by natural killer cells during active EBV-infection. CD56⁺CD19^{dim} lymphocytes can reach noticeable values thus altering the results of studies performed by flow cytometry. The errors are most likely to occur upon assessing the minimal residual disease levels in acute B cell leukemias. The minor CD56⁺CD19^{dim}NK subpopulation may be detected in routine immunological analysis. Its functional features and association with certain disorders require further studies.

Keywords: CD19⁺NK cells, CD56⁺CD19^{dim}, adaptive NK, trogocytosis, EBV infection

Введение

На протяжении последних десятилетий многоцветная проточная цитометрия получила широкое внедрение в практику иммунологических лабораторий. При выполнении рутинного исследования субпопуляционного состава лимфоцитов многоцветная проточная цитометрия позволяет выявить редкие и малоклеточные субпопуляции.

Начиная со второй декады XXI века в зарубежной литературе встречаются публикации с описа-

нием минорной субпопуляции НК-лимфоцитов, с низкой плотностью экспрессирующих на своей мембране CD19 [10, 21], в норме присутствующих только на лимфоцитах В-клеточного роста. Это крайне редкая и плохо изученная субпопуляция НК-клеток. Точное определение частоты встречаемости популяции CD56⁺CD19^{dim} в образцах крови затруднено не только из-за редкости этого события, но и вследствие малочисленности популяции и ограничения в количестве анализируемых клеток при выполнении рутинных имму-

нологических исследований методом проточной цитометрии. В большинстве лабораторий для оценки субпопуляционного состава лимфоцитов проводят анализ 5000 событий в лимфоцитарном регионе, в результате чего популяции, составляющие менее 20 событий (0,4% от лимфоцитов), могут быть расценены исследователем как результат неспецифического связывания или дебрис. Однако в некоторых случаях субпопуляция CD56⁺CD19^{dim} клеток может достигать значимых величин и искажать результаты исследования субпопуляционного состава лимфоцитов, субпопуляций В-лимфоцитов, минимальной определяемой болезни при В-клеточном остром лимфобластном лейкозе (В-ОЛЛ) [3, 10, 21].

Субпопуляция CD56⁺CD19^{dim} лимфоцитов встречается в 4,4% образцов крови детей с подозрением на иммунодефицитное состояние [10]. Эти клетки определяются в крови и в костном мозге детей и взрослых с В-ОЛЛ [3, 12, 21]. Максимальная частота встречаемости — около 15% — отмечается среди образцов костного мозга педиатрических пациентов с В-ОЛЛ после проведения этапов индукционной и консолидационной терапии. При дальнейшем наблюдении в этой группе пациентов частота встречаемости CD56⁺CD19^{dim} позитивных образцов костного мозга снижается и составляет 4,3% [3].

В крови детей, по тем или иным причинам направляемых на иммунологическое обследование, относительное количество CD56⁺CD19^{dim} лимфоцитов невелико — от 0,04% до 2,56% от лейкоцитов [10]. У детей с В-ОЛЛ до начала специфической терапии субпопуляция CD56⁺CD19^{dim} клеток составляет 0,04-0,69% от лейкоцитов крови и 0,02-0,05% от жизнеспособных клеток костного мозга [12].

На протяжении последних десяти лет в лаборатории клинической иммунологии ВЦЭРМ им. А.М. Никитина МЧС России выполнено около 12000 исследований субпопуляционного состава лимфоцитов методом многоцветной проточной цитометрии. При этом отмечались единичные случаи определения в лимфоцитарном регионе субпопуляции CD56⁺CD19^{dim} клеток, что вызвало интерес к их изучению, особенно в контексте отсутствия в русскоязычной литературе упоминаний об этой необычной субпопуляции.

Цель исследования — оценить частоту встречаемости, относительное количество и фенотипические характеристики минорной субпопуляции лимфоцитов CD56⁺CD19^{dim} в образцах крови пациентов, направляемых на исследование субпопуляционного состава лимфоцитов.

Материалы и методы

Материалом являлась периферическая кровь иммунокомпрометированных лиц, направляемая для определения субпопуляционного состава

лимфоцитов в лабораторию ФГБУ ВЦЭРМ им. А.М. Никитина МЧС России. Взятие крови проводили из локтевой вены с использованием вакутейнеров с ЭДТА.

Для оценки субпопуляционного состава лимфоцитов использовали восьмицветную панель моноклональных антител: HLA-DR-FITC, CD4-PE, CD3-ECD, CD56-PC5.5, CD25-PC7, CD8-APC, CD19-APC-AF700, CD45-APC-AF750. Для лизиса эритроцитов применяли VersaLyse. Анализ образцов проводили на проточном цитофлуориметре Navios в соответствии с инструкциями к реактивам (все реактивы и прибор Beckman Coulter, США). При рутинном исследовании субпопуляционного состава лимфоцитов накопление проводили до 5000 событий в лимфоцитарном регионе, определяемом как CD45^{bright}FS^{dim}SS^{dim}. Для оценки частоты встречаемости субпопуляции CD56⁺CD19^{dim} осуществляли ретроспективный анализ LMD-файлов исследований, выполненных с января 2022 года по август 2023 года. Анализировали частоту встречаемости образцов крови, содержащих CD56⁺CD19^{dim} лимфоциты, и определяли относительное количество клеток в этой субпопуляции. За это время проведено 1210 исследований для 935 пациентов, средний возраст которых составлял 39,8±14,7 года, среди них 84 ребенка до 18 лет. Ряду пациентов исследование выполнялось неоднократно.

У пяти пациентов CD56⁺CD19^{dim} лимфоциты определялись в значимом количестве (более 0,4%) в текущем исследовании, что позволило дополнительно оценить экспрессию В-клеточных и Т/НК-клеточных антигенов. Для углубленного изучения фенотипа субпопуляции CD56⁺CD19^{dim} использовали моноклональные антитела: CD7-FITC, CD16-FITC, CD38-FITC, CD45RA-FITC, CD57-FITC, CD11c-PE, CD21-PE, CD45R0-PE, CD79b-PE, CD94-PE, CD314-PE, CD3-ECD, CD5-PC5, CD20-PC5, CD62L-PC5, CD279-PC5, HLA-DR-PC5, CD2-PC7, CD56-PC7, CD117-PC7. Пробоподготовка проводилась аналогично с таковой при рутинной оценке субпопуляционного состава лимфоцитов, все реактивы и прибор Beckman Coulter (США). При фенотипировании субпопуляции CD56⁺CD19^{dim} клеток накапливали не менее 500 событий в целевом регионе. Экспрессию молекулы считали позитивной (+) в том случае, если она определялась более чем на 20% клеток субпопуляции. В тех случаях, когда относительное количество клеток, экспрессировавших изучавшийся антиген, находилось в пределах 20-30%, говорили о слабопозитивной экспрессии (+).

Результаты

Выявлено 13 образцов от 11 человек, в которых относительное количество CD56⁺CD19^{dim} клеток было 0,4% и более. Среди них 2 образца

крови принадлежали детям. Частота встречаемости образцов крови, содержащих субпопуляцию $CD56^+CD19^{+dim}$, составила 1,2% от всех проанализированных образцов. Причем среди детей эта субпопуляция клеток определялась в 2,4 раза чаще, чем у взрослых (2,4% против 1,0% соответственно). Средний возраст лиц, в крови которых определялись $CD56^+CD19^{+dim}$ лимфоциты, составил $29,5 \pm 10,5$ года. У двух пациенток субпопуляцию определили повторно через несколько месяцев после первого исследования.

В лимфоцитарном регионе относительное количество $CD56^+CD19^{+dim}$ клеток изменялось от 0,4% до 8,8% ($2,1 \pm 1,9\%$) и составляло от 0,08% до 2,8% от лейкоцитов $CD45^+$ ($0,8 \pm 0,6\%$) (табл. 1). Сведения о заболевании лиц на момент обследования, согласно данным медицинской электронной информационной системы, представлены в таблице 1.

Из семи человек с известными анамнестическими данными пятерым проводилась лабораторная диагностика герпесвирусных инфекций молекулярно-генетическим методом. У всех пациентов получено подтверждение обострения хронической ВЭБ-инфекции.

Во всех случаях субпопуляция $CD56^+CD19^{+dim}$ лимфоцитов имела слабую коэкспрессию CD19 (mean $1,56 \pm 0,2$ против $7,02 \pm 1,0$ на В-лимфоцитах) и умеренную экспрессию CD56, сопоставимую с субпопуляцией $CD56^+CD19^-$ зрелых NK-клеток. Во всех образцах субпопуляция $CD56^+CD19^{+dim}$ была негативна по CD3, CD4, CD25. Экспрессия CD8 и HLA-DR была вариабельна. В четырех образцах отмечалась коэкспрессия CD8 и HLA-DR: относительное количество $CD8^+$ клеток субпопуляции $CD56^+CD19^{+dim}$ было в пределах от 26% до 47%; относительное количество $HLA-DR^+$ клеток — от 22% до 61%. В одном образце четверть $CD56^+CD19^{+dim}$ лимфоцитов экспрессировала только HLA-DR.

В образцах крови пяти пациентов (№ 5, 8, 9, 10, 11 из таблицы 1) изучена экспрессия $CD56^+CD19^{+dim}$ клетками широкого спектра В-клеточных и Т/NK-клеточных антигенов, связанных с цитотоксической активностью, созреванием и активацией (табл. 2).

Гистограммы результатов фенотипирования образца крови пациента № 9 представлены на рисунке 1.

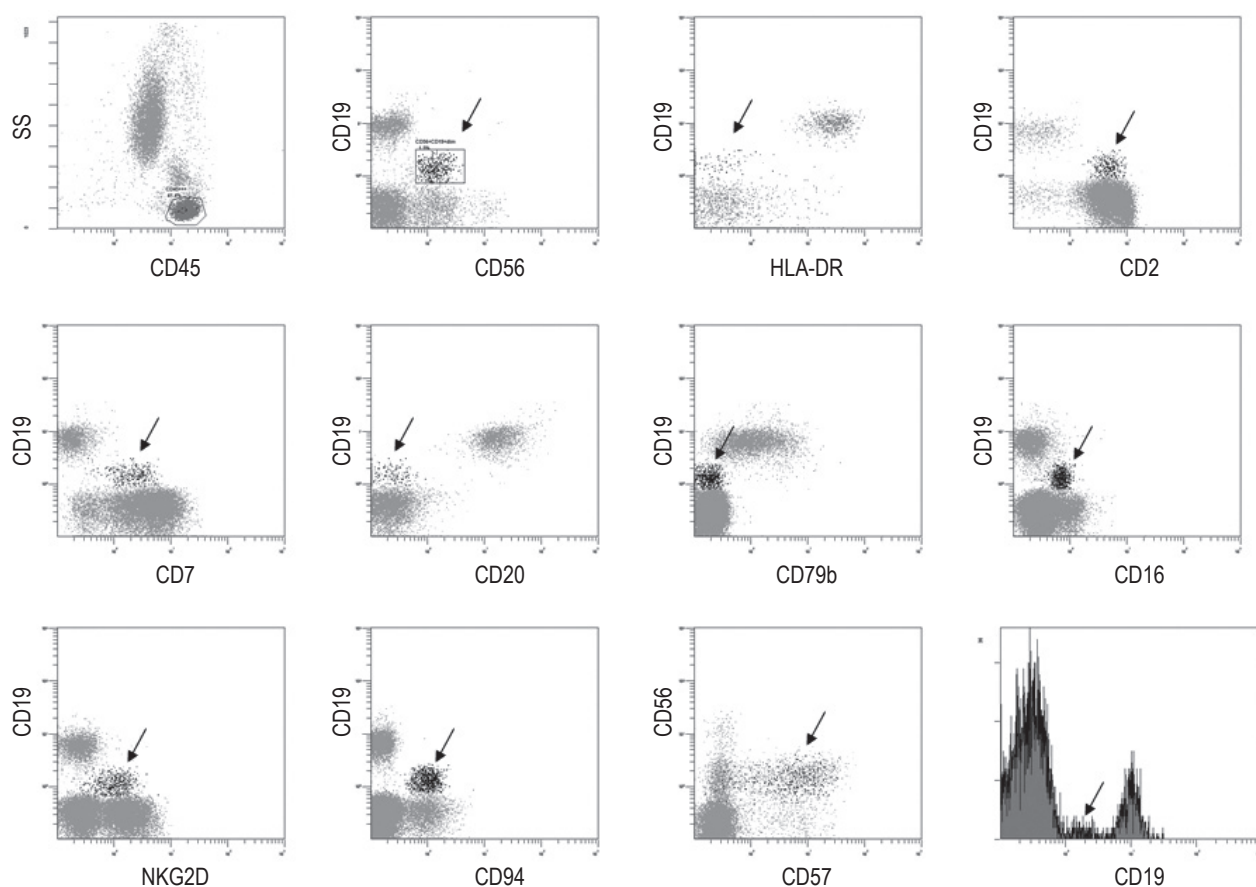


Рисунок 1. Гистограммы распределения маркеров на субпопуляциях лимфоцитов пациента № 9

Примечание. Субпопуляция $CD56^+CD19^{+dim}$ клеток выделена черным цветом и стрелкой.

Figure 1. Plotting the distribution of marker on subpopulations lymphocytes of patient 9

Note. Subpopulation of $CD56^+CD19^{+dim}$ cells is highlighted in black and an arrow.

ТАБЛИЦА 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ПАЦИЕНТОВ И СОДЕРЖАНИЕ СУБПОПУЛЯЦИИ CD56⁺CD19^{dim} ЛИМФОЦИТОВ

TABLE 1. CHARACTERISTICS OF PATIENTS AND LEVELS OF THE SUBPOPULATION CD56⁺CD19^{dim} LYMPHOCYTES

№ No.	Возраст, лет Age, years	Пол Sex	Анамнез Anamnesis	Доля CD56 ⁺ CD19 ^{dim} от лейкоцитов / лимфоцитов Proportion CD56 ⁺ CD19 ^{dim} from leukocytes / lymphocytes % / %
1	31	М	Наследственная оптическая нейропатия Лебера. Хроническая герпесвирусная инфекция (ВГVI, ВЭБ) Leber's optic neuropathy. Chronic herpesvirus infection (HHV-6, EBV)	0,15 / 0,6
2	35 35	Ж F	Нет данных No data	0,24 / 0,5 0,21 / 0,4
3	4	Ж F	Нет данных No data	1,38 / 3,4
4	12 14	Ж F	Хроническая герпесвирусная инфекция (ВГVI, ЦМВ, ВЭБ) Chronic herpesvirus infection (HHV-6, HCMV, EBV)	0,17 / 0,4 0,05 / 0,2
5	45	М	Хронический билиарнозависимый панкреатит. Хроническая герпесвирусная инфекция (ВГVI, ВЭБ) Chronic pancreatitis. Chronic herpesvirus infection (HHV-6, EBV)	2,8 / 8,8
6	39	Ж F	Аденовирусный кератит. Железодефицитная анемия. Хроническая герпесвирусная инфекция (ВГI/II, ВГVI, ЦМВ, ВЭБ) Adenoviral keratitis. Iron deficiency anemia. Chronic herpesvirus infection (HHV-1/2, HHV-6, HCMV, EBV)	0,24 / 0,5
7	41	Ж F	Внебольничная пневмония. Бронхоэктатическая болезнь. Железодефицитная анемия Community-acquired pneumonia. Bronchiectasis. Iron deficiency anemia	0,31 / 0,5
8	35	М	Невропатия половых нервов. Нейрогенный мочевой пузырь. Болезнь Бехтерева Pudendal neuralgia. Neurogenic bladder. Ankylosing spondylitis	2,15 / 6,6
9	20	Ж F	Железодефицитная анемия. В12-дефицитная анемия. Рецидивирующая крапивница. Рецидивирующие ангиоотеки. Субфебрилитет неясной этиологии. Хроническая герпесвирусная инфекция (ВГVI, ВЭБ) Iron deficiency anemia. B12 deficiency. Chronic inducible urticaria. Recurrent angioedema. Low-grade fever. Chronic herpesvirus infection (HHV-6, EBV)	0,89 / 1,6
10	28	М	Нет данных No data	0,60 / 1,7
11	45	М	Нет данных No data	0,82 / 1,5

Примечание. ВЭБ – вирус Эпштейна–Барр, ВГI/II – вирус простого герпеса I/II типа, ВГVI – вирус герпеса VI типа, ЦМВ – цитомегаловирус.

Note. EBV, Epstein–Barr virus; HHV-1/2, Herpes Simplex virus type 1 and type 2; HHV-6, Human Herpesvirus type 6; HCMV, Human Cytomegalovirus.

ТАБЛИЦА 2. ЭКСПРЕССИЯ МАРКЕРОВ НА CD56⁺CD19^{dim} ЛИМФОЦИТАХ

TABLE 2. MARKER EXPRESSION ON CD56⁺CD19^{dim} LYMPHOCYTES

	№ 5 No. 5	№ 8 No. 8	№ 9 No. 9	№ 10 No. 10	№ 11 No. 11
CD2	+	+	+	+	+
CD3	-	-	-	-	-
CD4	-	-	-	-	-
CD5	-	-	-	-	-
CD7	+	+	+	+	+
CD8	+	+	-	-	-
CD11c	-	-	-	+	+
CD16	+	+	+	+	+
CD19	+	+	+	+	+
CD20	-	-	-	-	-
CD21	-	-	-	-	-
CD25	-	-	-	-	-
CD38	+	-	+	+	+
CD45RA	-	-	+	+	+
CD45R0	-	-	-	-	-
CD57	-	+	+	+	+
CD62L	-	-	-	+	-
CD79b	-	-	-	-	-
CD94	-	-	+	+	+
CD117	-	-	-	-	-
CD279	-	-	-	-	-
CD314	-	-	+	-	+
HLA-DR	+	+	-	-	-

На основании экспрессии субпопуляцией CD56⁺CD19^{dim} лимфоцитов Т/НК-клеточных антигенов CD2, CD7, НК-ассоциированных антигенов CD16 и CD56, а также отсутствии экспрессии CD3 можно сделать заключением о том, что фенотип субпопуляции CD56⁺CD19^{dim} лимфоцитов соответствовал НК-клеткам.

Для выявления особенностей фенотипа CD56⁺CD19^{dim} лимфоцитов по сравнению с преобладающей в периферической крови субпопуляцией НК-лимфоцитов CD56⁺CD19⁻, проведено сопоставление их фенотипических характеристик: относительного количества позитивных по изучаемым антигенам клеток, плотности экспрессии антигенов. Поскольку согласно классической линейной модели развития НК-клеток, лимфоциты субпопуляции CD56⁺bright находятся на более раннем этапе дифференцировки и отличаются спектром экспрессируемых молекул от основной субпопуляции НК с умеренной экс-

прессией CD56 [18], клетки CD56⁺bright были исключены из сопоставления.

Все клетки CD56⁺CD19^{dim} и значительная часть клеток CD56⁺CD19⁻ экспрессировали CD2, но плотность экспрессии этой молекулы была в два раза выше у первой субпопуляции (mean 6,5±1,2 vs 3,5±1,0 соответственно). Относительное количество клеток, экспрессирующих CD7 и CD16, было сопоставимо в обеих субпопуляциях, но плотность экспрессии этих антигенов была ниже у CD56⁺CD19^{dim} клеток (CD7: mean 4,2±0,9 vs 8,3±2,3; CD16: mean 1,0±0,2 vs 1,9±0,1 соответственно). НК-клетки обеих субпопуляций не экспрессировали CD5. Не выявлено отличий в относительном количестве CD38⁺ клеток между субпопуляциями, однако плотность экспрессии этого антигена CD56⁺CD19^{dim} лимфоцитами была в три раза ниже (mean 1,7±0,7 vs 4,9±2,5). Клетки обеих субпопуляций экспрессировали изоформу CD45RA и не экспрессировали CD45R0. Экспрессия CD57 была позитивна более чем на половине клеток субпопуляции CD56⁺CD19^{dim}, что было выше, чем в субпопуляции CD56⁺CD19⁻НК-лимфоцитов (65,3±14,5% vs 33,9±6,1%). Экспрессия CD94 была сопоставима в обеих субпопуляциях. Клетки, экспрессирующие CD279 (PD1) в субпопуляции CD56⁺CD19^{dim} составляли менее 1% (0,5±0,3%), что было ниже, чем в субпопуляции CD56⁺dimCD19⁻НК-лимфоцитов (4,5±2,6%). Экспрессия CD11c и NKG2D была позитивна и сопоставима в обеих субпопуляциях НК-клеток. Экспрессия CD62L была различна: лимфоциты CD56⁺CD19^{dim} слабее экспрессировали эту молекулу по сравнению с НК-клетками CD56⁺CD19⁻ (15,3±6,3% vs 30,2±5,6%). Клетки обеих субпопуляций CD56⁺НК не экспрессировали CD117.

Коэкспрессия В-клеточных антигенов CD20, CD21 и CD79b на CD56⁺CD19^{dim} лимфоцитах не выявлялась.

Таким образом, фенотип CD56⁺CD19^{dim} клеток соответствовал зрелым терминально дифференцированным цитотоксическим НК-лимфоцитам. Ограниченное число исследованных образцов позволяет сделать только предварительное заключение о наличии у этой субпопуляции ряда особенностей фенотипа по сравнению с преобладающей в крови субпопуляцией НК-клеток CD56⁺CD19⁻.

Особенностями фенотипа субпопуляции CD56⁺CD19^{dim} являются:

- экспрессия В-клеточного антигена CD19 с низкой плотностью;
- тотальная экспрессия CD2 с высокой плотностью;
- сниженная плотность экспрессии CD7;
- сниженная плотность экспрессии CD16;

- высокое относительное количество CD57⁺ лимфоцитов;
- сниженная плотность экспрессии CD38;
- низкое относительное количество CD62L⁺ лимфоцитов.

Итоговый фенотип можно представить как CD56⁺dimCD19⁺dimCD2⁺brightCD7⁺dimCD11c⁺CD16⁺dimCD38⁺CD45RA⁺CD57⁺CD94⁺dimNKG2D⁺CD3⁻CD4⁻CD5⁻CD20⁻CD21⁻CD25⁻CD45R0⁻CD62L⁻CD79b⁻CD117⁻ с вариабельной экспрессией CD8 и HLA-DR.

Пациентка № 4 (табл. 1) проходила иммунологическое обследование в лаборатории иммунологии ВЦЭРМ в среднем каждые полгода в течение нескольких лет. Ретроспективно провели оценку изменения субпопуляции CD56⁺CD19⁺dim лимфоцитов с 2017 по 2023 год (рис. 2).

При первом исследовании субпопуляционного состава лимфоцитов (январь 2017 г.) субпопуляция CD56⁺CD19⁺dim в образце крови отсутствовала, затем выявлено ее появление (май 2017 г.) и сохранение на протяжении 6 лет наблюдений. При первом определении субпопуляции CD56⁺CD19⁺dim на 30% клеток была отмечена экспрессия HLA-DR, затем трижды определялась коэкспрессия HLA-DR и CD8 в диапазоне от 28% до 47% для CD8 и от 26% до 33% для HLA-DR. Отсутствие клинических и ограниченный спектр дополнительных лабораторных данных не позволяют связать манифестацию интересующей субпопуляции клеток с каким-либо заболеванием. Однако можно отметить многолетнюю персистенцию и периодическую активацию субпопуляции CD56⁺CD19⁺dim NK-лимфоцитов в периферической крови.

Обсуждение

Фенотипирование CD56⁺CD19⁺dim клеток ранее выполнялось коллективом сотрудников отделения Иммунологии и Ревматологии Педиатрической больницы Гаррахан (Буэнос-Айрес, Аргентина), оценивавших субпопуляционный состав лимфоцитов в образцах крови детей с подозрением на иммунодефицитное состояние [10]. Авторы детально описали фенотип интересующей субпопуляции в 11 образцах крови, отметили длительную персистенцию CD56⁺CD19⁺dim у 6 пациентов. Основное внимание было уделено изучению В-клеточных антигенов CD10, CD20, CD21, CD22, CD24, CD79a, IgD, IgG, мембранного и цитоплазматического IgM, легких цепей иммуноглобулинов, CD138, цитоплазматического TdT. Как и в нашем исследовании, экспрессия клетками субпопуляции CD56⁺CD19⁺dim других В-клеточных антигенов помимо CD19 отсутствовала. В одном из образцов была определена частичная экспрессия CD5, что в редких случаях может

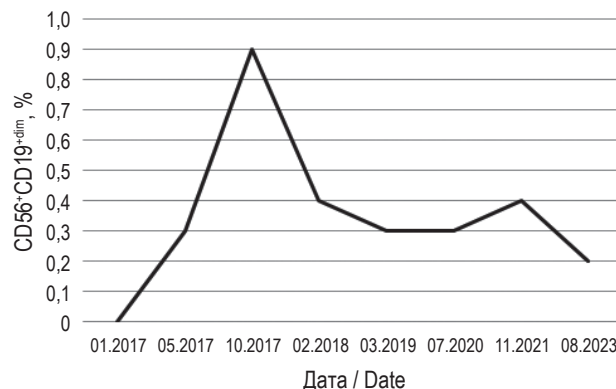


Рисунок 2. Изменение относительного количества CD56⁺CD19⁺dim клеток в крови пациентки № 4 (% от лимфоцитов)

Figure 2. Change in the relative amount of the CD56⁺CD19⁺dim cells in the blood of patient 4 (% of lymphocytes)

иметь место на реактивных НК-лимфоцитах [17]. Исследователи определили позитивную экспрессию CD16, перфорины, гранзимов А и В на уровнях, сопоставимых с преобладающей в периферии субпопуляции НК-лимфоцитов CD56⁺, позитивную экспрессию CD57, CD94, CD158b, отрицательную CD159. В результате изучения субпопуляции CD56⁺CD19⁺dim лимфоцитов исследователи пришли к выводу о соответствии фенотипа активированным НК-лимфоцитам со слабой коэкспрессией CD19, что совпадает с результатами нашей работы.

Длительное сохранение в периферии и сходный высокодифференцированный иммунотип характерен для недавно выделенных адаптивных НК, которые отмечаются у клинически здоровых лиц с предшествующей цитомегаловирусной инфекцией [6, 15, 18]. Их описывают как клетки, обладающие признаками клональной экспансии, с усиленной эффекторной функцией, увеличенной продолжительностью жизни и фенотипом NKG2C⁺/CD57⁺brightCD2⁺brightCD7⁺dimCD16⁺dimCD38⁺dimFcεR1γ [6]. Это популяция терминально дифференцированных НК-лимфоцитов, имеющих стабильные эпигенетические модификации, которые определяют клеточный метаболизм, а также экспрессию поверхностных рецепторов и сигнальных белков [18]. Ряд фенотипических особенностей адаптивных НК, а именно высокая экспрессия коактиваторной молекулы CD2, проведение сигнала от CD16 с вовлечением сигнальной молекулы CD3ζ вместо FcεR1γ, приводят к эффективному уничтожению клеток-мишеней, опсонизированных антителами, в реакциях антителозависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности [5], а также к выраженному синтезу IFNγ и TNF в ответ на стимулы через CD16 [6]. После активации CD16 поверхностная экспрессия этой

молекулы снижается в результате интернализации или расщепления металлопротеазой-17 [4]. По сравнению с преобладающими в периферии CD56⁺CD19⁻ NK-лимфоцитами, адаптивные NK-клетки имеют пониженную примерно на 50% плотность экспрессии CD16 [13], что также было выявлено в нашем исследовании у субпопуляции CD56⁺CD19^{dim} клеток. Слабая экспрессия CD7 ограничивает пролиферативный и синтетический ответ после связывания этой молекулы со своим лигандом SECTM1 [23] и может играть роль в ограничении участия в HLA-I рестриктивных реакциях клеточной цитотоксичности, как это показано для мышей с дефицитом экспрессии CD7 [22]. Последнее свойство описано для адаптивных NK, которые, помимо низкой экспрессии костимуляторной молекулы CD7, также слабо экспрессируют рецепторы натуральных киллеров NKp46, NK30 [13]. Отсутствие на мембране CD62L, который способствует миграции от вторичных лимфоидных органов к периферическим тканям [9], а также низкая экспрессия CD7 сближает фенотип адаптивных NK с эффекторными Т-клетками памяти. Между CD8⁺Т-клетками памяти и адаптивными NK описаны сходные эпигенетические модификации [20], которые, по-видимому, и приводят к общим для этих субпопуляций фенотипическим особенностям. В изучаемой нами субпопуляции CD56⁺CD19^{dim} лимфоцитов отмечалось двукратное снижение плотности экспрессии CD7 и практически отсутствие экспрессии CD62L, что характерно для адаптивных NK.

По нашему мнению, отмеченные нами фенотипические особенности субпопуляции CD56⁺CD19^{dim} клеток, выявляемой в периферической крови некоторых пациентов, позволяют оценить ее как субпопуляцию адаптивных NK-лимфоцитов с коэкспрессией CD19.

На сегодняшний день только для цитомегаловирусной инфекции убедительно показана связь с формированием клона адаптивных NK-лимфоцитов [6]. Популяция адаптивных NK-клеток отмечается у 30% клинически здоровых лиц [8] и может увеличиваться при обострении различных хронических вирусных инфекций, в том числе герпетических, играя заметную роль в антителозависимых защитных реакциях [7, 16]. В нашем исследовании из 11 лиц, в крови которых определена субпопуляция CD56⁺CD19^{dim} лимфоцитов, только у семи присутствовала информация об анамнезе и результатах дополнительных лабораторных исследований. Пятерым из них выполнялась серодиагностика антител к цитомегаловирусу или ПЦР-исследование содержания копий ДНК вируса в слюне с положительным результатом во всех случаях. Помимо этого, у этих пациентов имело место обострение хронической герпетической инфекции, связан-

ной с персистенцией вируса Эпштейна–Барр и герпеса VI типа. Таким образом, у большинства пациентов с известным анамнезом подтверждена предшествующая цитомегаловирусная инфекция и наличие обострения хронической ВЭБ-инфекции, способствующего увеличению клона адаптивных NK.

Экспрессия NK-лимфоцитами поверхностных антигенов других клеточных линий описана при ряде состояний и связана с трогоцитозом — переносом и встраиванием фрагментов клеточной мембраны клеток-мишеней в мембрану клеток-эффекторов [19, 24]. Описаны минорные (не более 15% от NK-лимфоцитов) популяции противоопухолевых NK-лимфоцитов с коэкспрессией CD19 у пациентов с хроническим лимфолейкозом, с фолликулярной и диффузной В-крупноклеточной лимфомой, с коэкспрессией CD19 и CD10 при остром В-лимфобластном лейкозе, с коэкспрессией CD14 и CD33 у пациентов с острыми миелоидными лейкозами [11]. При солидных опухолях также возможно обнаружение минорных популяций противоопухолевых адаптивных NK с коэкспрессией тканеспецифичных антигенов [2]. Как при гемобластозах, так и при солидных опухолях NK-клетки с коэкспрессией опухолевых антигенов являются крайне малочисленной популяцией, недоступной для визуализации при выполнении рутинных исследований.

Недавно группой авторов [1, 14] в экспериментальных исследованиях была показана способность NK-лимфоцитов взаимодействовать с неинфицированными В-лимфоцитами, опсонизированными гликопротеином gp350 вируса Эпштейна–Барр в присутствии сыворотки пациентов, содержащей высокоаффинные антитела к этому белку. Авторами *in vitro* была показана возможность трогоцитоза фрагментов В-клеточной мембраны с последующей экспрессией на поверхности NK-клетки антигенов CD21, CD20 и CD19. Как в нашем исследовании, так и в работе Korol С. и соавт. (2015), не выявлена коэкспрессия клетками субпопуляции CD56⁺CD19^{dim} других В-клеточных антигенов, в частности CD21 — рецептора для вируса Эпштейна–Барр, составляющего комплекс с CD19 на мембране В-клетки. Несмотря на это, рассмотренный выше механизм может быть возможной причиной появления в периферии субпопуляции CD19⁺NK-лимфоцитов у пациентов с обострением хронической ВЭБ-инфекции.

Так или иначе, причины длительной персистенции в периферии субпопуляции CD56⁺CD19^{dim} клеток у пациентов без гемобластозов и солидных опухолей, ее клиническая значимость нуждаются в дополнительном изучении.

Эта субпопуляция, чаще встречающаяся у лиц детского и молодого возраста и достигающая в

некоторых случаях заметных величин (в практике нашей лаборатории — до 9% от лимфоцитов), может искажать результаты иммунологических исследований, выполняемых методом проточной цитометрии. При высоком количестве этих клеток сумма Т-, В- и НК-лимфоцитов может быть выше 100% ввиду одновременной идентификации CD56⁺CD19^{dim} клеток в качестве В- и НК-лимфоцитов. Особенно вероятны ошибки при оценке минимальной остаточной болезни при острых В-клеточных лейкозах, когда даже небольшое количество опухолевой популяции критично для оценки состояния пациента.

Заключение

Следует заключить, что минорная популяция НК-лимфоцитов CD56⁺CD19^{dim} может быть идентифицирована в рутинных иммунологических исследованиях — в нашей работе частота выявления этой популяции составила 1,2%. Определенный в нашем исследовании фенотип этих клеток соответствовал зрелым терминально дифференцированным цитотоксическим НК-лимфоцитам — CD56⁺CD19^{dim}CD2^{bright}CD7^{dim}CD11c⁺CD16^{dim}CD38⁺CD45RA⁺CD57⁺CD94^{dim}NKG2D⁺CD3⁻CD4⁻CD5⁻CD20⁻CD21⁻CD25⁻CD45R0⁻CD62L⁻CD79b⁻CD117⁻ с вариабельной

экспрессией CD8 и HLA-DR. На наш взгляд, эти клетки представляют собой одну из субпопуляций адаптивных НК-лимфоцитов, коэкспрессирующих CD19. Наиболее вероятной причиной появления на мембране НК-лимфоцитов В-клеточного рецептора у иммунокомпрометированных лиц представляется трогоцитоз клетками-эффекторами части мембраны В-лимфоцита у пациентов с обострением хронической герпес-вирусной инфекции, ассоциированной с вирусом Эпштейна—Барр. Распространение цитомегаловирусной инфекции, приводящей к образованию высокоспециализированных для выполнения антителозависимой клеточной цитотоксичности клонов адаптивных НК-лимфоцитов, наличие хронической ВЭБ-инфекции, часто встречающееся у иммунокомпрометированных лиц, может способствовать появлению в периферической крови субпопуляции CD56⁺CD19^{dim}. У пациентов с известным анамнезом в нашем исследовании подтверждена предшествующая цитомегаловирусная инфекция и обострение хронической ВЭБ-инфекции. Популяция НК-лимфоцитов со слабой коэкспрессией В-клеточного антигена CD19 может сохраняться годами, а ее функциональные особенности и связь с патологией нуждаются в дальнейшем изучении.

Список литературы / References

1. Alari-Pahissa E., Ataya M., Moraitis I., Campos-Ruiz M., Altadill M., Muntasell A., Moles A., López-Botet M. NK cells eliminate Epstein-Barr virus bound to B cells through a specific antibody-mediated uptake. *PLoS Pathog.*, 2021, Vol. 17, no. 8, e1009868. doi: 10.1371/journal.ppat.1009868.
2. Campos-Mora M., Jacot W., Garcin G., Depondt M.-L., Constantinides M., Alexia C., Villalba M. NK cells in peripheral blood carry trogocytosed tumor antigens from solid cancer cells. *Front. Immunol.*, 2023, Vol. 14, 1199594. doi: 10.3389/fimmu.2023.1199594.
3. Chatterjee G., Sriram H., Ghogale S., Deshpande N., Khanka T., Girase K., Verma S., Arolkar G., Dasgupta N., Narula G., Shetty D., Dhamne C., Moulik N.R., Rajpal S., Patkar N.V., Banavali S., Gujral S., Subramanian P.G., Tembhare P.R. Mimics and artefacts of measurable residual disease in a highly sensitive multicolour flow cytometry assay for B-lymphoblastic leukaemia/lymphoma: critical consideration for analysis of measurable residual disease. *Br. J. Haematol.*, 2022, Vol. 196, no. 2, pp. 374-379.
4. Coënon L., Villalba M. From CD16a biology to antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity improvement. *Front. Immunol.*, 2022, Vol. 13, 913215. doi: 10.3389/fimmu.2022.913215.
5. Della Chiesa M., Pesce S., Muccio L., Carlomagno S., Sivori S., Moretta A., Marcenaro E. Features of memory-like and PD-1⁺ human NK cell subsets. *Front. Immunol.*, 2016, Vol. 7, 351. doi: 10.3389/fimmu.2016.00351.
6. Gao F., Zhou Z., Lin Y., Shu G., Yin G., Zhang T. Biology and clinical relevance of HCMV-associated adaptive NK cells. *Front. Immunol.*, 2022, Vol. 13, 830396. doi: 10.3389/fimmu.2022.830396.
7. Gill U.S., Golden-Mason L. HCMV jogs the 'memory' of NK cells in HBV. *J. Hepatol.*, 2019, Vol. 70, no. 3, pp. 343-345.
8. Hwang I., Zhang T., Scott J.M. Identification of human NK cells that are deficient for signaling adaptor FcRγ and specialized for antibody-dependent immune function. *Int. Immunol.*, 2012, Vol. 24, no. 12, pp. 793-802.
9. Ivetic A., Green H.L.H., Hart S.J. L-selectin: A major regulator of leukocyte adhesion, migration and signaling. *Front. Immunol.*, 2019, Vol. 10, 1068. doi: 10.3389/fimmu.2019.01068.
10. Korol C., Rossi J., Sanz M., Bernasconi A. NK cells expressing the B cell antigen CD19: Expanding the phenotypical characterization and the potential consequences from misinterpretation of this subset population. *Cytometry B Clin. Cytom.*, 2015, Vol. 88, no. 2, pp. 358-360.
11. Krzywinska E., Allende-Vega N., Cornillon A., Vo D.N., Cayrefourcq L., Panabieres C., Vilches C., Déchanet-Merville J., Hicheri Y., Rossi J.F., Cartron G., Villalba M. Identification of anti-tumor cells carrying natural killer (NK) cell antigens in patients with hematological cancers. *EBioMedicine*, 2015, Vol. 2, no. 10, pp. 1364-1376.

12. Li W., Morgan R., Nieder R., Truong S., Habeebu S.S.M., Ahmed A.A. Normal or reactive minor cell populations in bone marrow and peripheral blood mimic minimal residual leukemia by flow cytometry. *Cytometry B Clin. Cytom.*, 2021, Vol. 100, no. 5, pp. 531-608.
13. Liu W., Scott J.M., Langguth E., Chang H., Park P.H., Kim S. FcR γ Gene editing reprograms conventional NK cells to display key features of adaptive human NK cells. *iScience*, 2020, Vol. 23, no. 11, 101709. doi: 10.1016/j.isci.2020.101709.
14. López-Montañés M., Alari-Pahissa E., Sintés J., Martínez-Rodríguez J.E., Muntasell A., López-Botet M. Antibody-dependent NK Cell activation differentially targets EBV-infected cells in lytic cycle and bystander B lymphocytes bound to viral antigen-containing particles. *J. Immunol.*, 2017, Vol. 199, no. 2, pp. 656-665.
15. Pahl J.H.W., Cerwenca A., Ni J. Memory-Like NK-cells: Remembering a previous activation by cytokines and NK cell receptors. *Front. Immunol.*, 2018, Vol. 9, 2796. doi: 10.3389/fimmu.2018.02796.
16. Peppas D. Natural killer cells in human immunodeficiency virus-1 infection: spotlight on the impact of human cytomegalovirus. *Front. Immunol.*, 2017, Vol. 8, 1322. doi: 10.3389/fimmu.2017.01322.
17. Pu Q., Cao X., Liu Y., Yan D., Tan R., Li J., Yue B. Comprehensive analysis and summary of the value of immunophenotypes of mature NK cell tumors for differential diagnosis, treatment, and prognosis. *Front. Immunol.*, 2022, Vol. 13, 918487. doi: 10.3389/fimmu.2022.918487.
18. 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.
19. Reed J., Reichelt M., Wetzel S.A. Lymphocytes and trogocytosis-mediated signaling. *Cells*, 2021, Vol. 10, no. 6, 1478. doi: 10.3390/cells10061478.
20. Schlums H., Cichocki F., Tesi B., Theorell J., Beziat V., Holmes T.D., Han H., Chiang S.C., Foley B., Mattsson K., Larsson S., Schaffer M., Malmberg K.-J., Ljunggren H.-G., Miller J.S., Bryceson Y.T. Cytomegalovirus infection drives adaptive epigenetic diversification of NK cells with altered signaling and effector function. *Immunity*, 2015, Vol. 42, no. 3, pp. 443-456.
21. Soma L., Wu D., Chen X., Edlefsen K., Fromm J.R., Wood B. Apparent CD19 expression by natural killers cells: a potential confounder for minimal residual disease detection by flow cytometry in B lymphoblastic leukemia. *Cytometry B Clin. Cytom.*, 2015, Vol. 88, no. 2, pp. 145-147.
22. Stillwell R., Bierer B.E. T cell signal transduction and role of CD7 in costimulation. *Immunol. Res.*, 2001, Vol. 24, no. 1, pp. 31-52.
23. Wang T., Huang C., Lopez-Coral A., Slentz-Kesler K.A., Xiao M., Wherry E.J., Kaufman R.E. K12/SECTM1, an interferon- γ regulated molecule, synergizes with CD28 to costimulate human T cell proliferation. *J. Leukoc. Biol.*, 2012, Vol. 91, no. 3, pp. 449-459.
24. Zhao S., Zhang L., Xiang S., Hu Y., Wu Z., Shen J. Gnawing between cells and cells in the immune system: friend or foe? A review of trogocytosis. *Front. Immunol.*, 2022, Vol. 13, 791006. doi: 10.3389/fimmu.2022.791006.

Авторы:

Калашикова А.А. — к.б.н., старший научный сотрудник научно-исследовательского отдела лабораторной диагностики научно-исследовательского центра ФГБУ «Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины имени А.М. Никифорова» МЧС России, Санкт-Петербург, Россия

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

Authors:

Kalashnikova A.A., PhD (Biology), Senior Research Associate, Research Department of Laboratory Diagnostics, A. Nikiforov Russian Centre of Emergency and Radiation Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

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

Поступила 23.10.2023
Отправлена на доработку 10.11.2023
Принята к печати 29.11.2023

Received 23.10.2023
Revision received 10.11.2023
Accepted 29.11.2023

АССОЦИАЦИЯ ПОЛИМОРФИЗМА *Bcl1* ГЕНА *NR3C1* С НАРУШЕНИЕМ ПРОГРАММИРУЕМОЙ КЛЕТОЧНОЙ ГИБЕЛИ ЛИМФОЦИТОВ БОЛЬНЫХ АТОПИЧЕСКОЙ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМОЙ

Богомазова А.А.¹, Решетникова И.Д.^{1,2}, Скибо Ю.В.¹, Абрамова З.И.¹

¹ ФГАОУ ВО «Казанский федеральный университет», г. Казань, Республика Татарстан, Россия

² ФБУН «Казанский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии», г. Казань, Республика Татарстан, Россия

Резюме. Атопическая бронхиальная астма — это хроническое заболевание, характеризующееся обструкцией дыхательных путей, бронхиальной гиперреактивностью и воспалением. У пациентов наблюдается повышенная активация иммунных клеток в дыхательных путях, в особенности Т-лимфоцитов, что приводит к хроническому воспалению. Известно, что лимфоциты больных астмой имеют нарушенный ответ на программируемую клеточную гибель 1-го и 2-го типа — апоптоз и аутофагию, что способствует пролонгации и усилению воспалительного процесса. В сравнении с апоптозом, аутофагия также может способствовать выживанию клетки в условиях стресса, а ее нарушение и гиперактивация — приводить к отягощению аллергических реакций. Основными препаратами для лечения атопической бронхиальной астмы являются глюкокортикоиды, которые активируют глюкокортикоидный рецептор, запуская в клетке противовоспалительный ответ и, в частности, апоптоз. Однако у некоторых пациентов наблюдается устойчивость к терапии из-за различных факторов, включающих однонуклеотидные полиморфизмы гена глюкокортикоидного рецептора *NR3C1*. Наибольшая связь тяжести астмы с устойчивостью к терапии была выявлена у GG-варианта полиморфизма *Bcl1*. Общие молекулярные пути активации глюкокортикоидного рецептора и программируемой клеточной гибели и опосредующие молекулярные компоненты позволяют предположить значимость роли полиморфного рецептора в уходе клеток от гибели. Целью нашего исследования являлась оценка влияния G-аллели в однонуклеотидном полиморфизме *Bcl1* гена *NR3C1* глюкокортикоидного рецептора на экспрессию генов-регуляторов апоптоза (*BCL2*, *CASP3*) и аутофагии (*BECN1*, *LC3*) в лимфоцитах больных средней и тяжелой формой атопической бронхиальной астмы. Материалом исследования служили образцы периферической крови 24 пациентов в возрасте от 20 до 45 лет с установленным диагнозом «атопическая бронхиальная астма» средней и тяжелой степени. Методом

Адрес для переписки:

Богомазова Арина Алексеевна
Институт фундаментальной медицины и биологии
ФГАОУ ВО «Казанский федеральный университет»
420008, Россия, Республика Татарстан, г. Казань,
ул. Кремлевская, 18, ком. 104В.
Тел.: 8 (939) 396-00-98.
E-mail: arnbgmz@yandex.ru

Address for correspondence:

Arina A. Bogomazova
Institute of Fundamental Medicine and Biology,
Kazan Federal University
18 Kremlevskaya St, Room 104V
Kazan, Republic of Tatarstan
420008 Russian Federation
Phone: +7 (939) 396-00-98.
E-mail: arnbgmz@yandex.ru

Образец цитирования:

А.А. Богомазова, И.Д. Решетникова, Ю.В. Скибо, З.И. Абрамова «Ассоциация полиморфизма *Bcl1* гена *NR3C1* с нарушением программируемой клеточной гибели лимфоцитов больных атопической бронхиальной астмой» // Медицинская иммунология, 2024. Т. 26, № 3. С. 523–532. doi: 10.15789/1563-0625-AON-2908

© Богомазова А.А. и соавт., 2024

Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

A.A. Bogomazova, I.D. Reshetnikova, Yu.V. Skibo, Z.I. Abramova "Association of *NR3C1 Bcl1* gene polymorphism with impaired programmed cell death of lymphocytes in patients with atopic bronchial asthma", *Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2024, Vol. 26, no. 3, pp. 523–532.

doi: 10.15789/1563-0625-AON-2908

© Bogomazova A.A. et al., 2024

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

DOI: 10.15789/1563-0625-AON-2908

полиморфизма длин рестрикционных фрагментов пациенты были распределены по генотипам полиморфизма *Bcl1* гена *NR3C1*: 12 человек — CC-генотип, 8 человек — GC, 4 человека — GG-генотип. Лимфоцитарную фракцию выделяли на градиенте плотности фиколла и культивировали с дексаметазоном в условиях истощения питательных веществ. Уровень экспрессии генов определяли методом ПЦР в реальном времени. При исследовании влияния различных генотипов *Bcl1* полиморфизма на экспрессию генов-маркеров клеточной гибели, в лимфоцитах пациентов с GG-полиморфизмом под воздействием дексаметазона были выявлены антиапоптотические реакции, что может являться одним из механизмов развития резистентности к терапии глюкокортикостероидами при астме. Нарушение активации экспрессии гена *BECN1* у больных с GG-генотипом может предполагать дерегуляцию процесса аутофагии у этой группы пациентов, как способа программируемой клеточной гибели. Несмотря на это, у больных с GC-генотипом при длительном культивировании воздействие дексаметазона повышает экспрессию гена *LC3*, указывающую на более выраженную активацию аутофагии. Таким образом, данная работа демонстрирует различия в ответе лимфоцитов на терапию синтетическими глюкокортикоидами, а также раскрывает влияние G-аллели в генотипе *Bcl1* полиморфизма на нарушение регуляции программируемой клеточной гибели под воздействием дексаметазона.

Ключевые слова: астма, лимфоциты, глюкокортикоидный рецептор, резистентность, полиморфизм, апоптоз, аутофагия

ASSOCIATION OF *NR3C1 Bcl1* GENE POLYMORPHISM WITH IMPAIRED PROGRAMMED CELL DEATH OF LYMPHOCYTES IN PATIENTS WITH ATOPIC BRONCHIAL ASTHMA

Bogomazova A.A.^a, Reshetnikova I.D.^{a, b}, Skibo Yu.V.^a, Abramova Z.I.^a

^a Kazan Federal University, Kazan, Republic of Tatarstan, Russian Federation

^b Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Kazan, Republic of Tatarstan, Russian Federation

Abstract. Atopic asthma is a chronic disease characterized by airway obstruction, bronchial hyperresponsiveness, and inflammation. Patients show increased activation of immune cells in the airways, especially T-lymphocytes, leading to chronic inflammation. The lymphocytes of asthma patients are known to have an impairment of the type 1 and 2 programmed cell death, i.e., apoptosis and autophagy, thus contributing to prolongation and intensification of inflammatory process. As compared to apoptosis, autophagy may also contribute to cell survival under stress conditions. Its disruption and hyperactivation leads to exacerbation of allergic responses. Glucocorticoids are the main drugs for the treatment of atopic bronchial asthma by activating the glucocorticoid receptor, thus triggering anti-inflammatory response and apoptosis of the cells. However, some patients exhibit resistance to therapy due to various factors, including single nucleotide polymorphisms of *NR3C1* glucocorticoid receptor gene. The highest association between asthma severity and resistance to therapy was found for the GG variant of the *NR3C1 Bcl1* polymorphism. Common molecular pathways for glucocorticoid receptor activation and programmed cell death and mediating molecules suggest a significant role for the polymorphic receptor variant in cell death. The aim of our study was to evaluate the effect of a single nucleotide polymorphism (G allele, i.e., *Bcl1* polymorphism of *NR3C1* gene) of glucocorticoid receptor on expression levels of genes that regulate apoptosis (*BCL2*, *CASP3*) and autophagy (*BECN1*, *LC3*) in lymphocytes of patients with moderate and severe atopic bronchial asthma. The study was performed with peripheral blood samples of 24 patients aged 20 to 45 years with an established diagnosis of moderate to severe atopic bronchial asthma. Using PCR technique with restriction fragment length polymorphism (RFLP) assay, the patients were distributed according to the genotypes of the *Bcl1* polymorphism of the *NR3C1* gene: 12 patients with CC genotype, 8 persons with GC genotype, and 4 cases with GG genotype. The lymphocytes were isolated in Ficoll density gradient and cultivated with dexamethasone under the conditions of nutrient depletion. The level of gene expression was determined by real-time PCR. When studying associations between various genotypes of *Bcl1* polymorphism and expression of cell death marker genes, the anti-apoptotic reactions were detected in lymphocytes of patients with GG polymorphism under the influence of dexamethasone thus being a potential mechanism for development of resistance to glucocorticosteroid therapy in asthma. Impaired activation of *BECN1* gene expression in patients with the GG genotype may suggest deregulation of the autophagy in this

group of patients, as a mode of programmed cell death. Moreover, in patients with GC genotype during long-term cultivation, exposure to dexamethasone increases the expression of the *LC3* gene, indicating a more pronounced activation of autophagy. Hence, this work demonstrates differences in response of lymphocytes to synthetic glucocorticoid therapy, and probable effect of G allele (*Bcl1* polymorphism) on dysregulation of programmed cell death under the influence of dexamethasone.

Keywords: bronchial asthma, lymphocytes, glucocorticoid receptor, resistance, polymorphism, apoptosis, autophagy

Работа выполнена за счет средств субсидии, выделенной в рамках государственной поддержки Казанского (Приволжского) федерального университета в целях повышения его конкурентоспособности среди ведущих мировых научно-образовательных центров.

Введение

Астма является серьезным неинфекционным заболеванием, от которого страдают более 300 млн человек по всему миру и которое является наиболее распространенным хроническим заболеванием среди детей [4]. Это заболевание связано с активацией иммунной системы, гиперреактивностью и ремоделированием дыхательных путей, гиперпродукцией слизи и развитием хронического воспаления. При этом наиболее распространенным типом астмы является аллергическая (атопическая) астма (АБА), которая обычно индуцируется сенсibilизацией к аллергенам окружающей среды [5]. Аллергическая астма возникает в результате сложного взаимодействия стромальных клеток легкого с клетками врожденного и адаптивного иммунитета. Врожденный иммунитет преимущественно способствует возникновению аллергической реакции, в то время как лимфоидные клетки адаптивного иммунного ответа, в частности Т-лимфоциты, связаны с пролонгацией хронического воспаления [7]. Помимо стимуляции синтеза IgE В-клетками и вовлечения в воспалительный процесс различных групп лейкоцитов через секрецию цитокинов, Т-лимфоциты могут усиливать рост, активацию и выживание клеток, участвующих в воспалительной реакции, т. е. оказывают провоспалительный эффект [17].

Ранние исследования показали, что лимфоциты больных бронхиальной астмой имеют нарушенный ответ на индукцию программируемой клеточной гибели (ПКГ), что является одной из причин более стойкого и пролонгированного течения воспалительного процесса [5]. В основном это заболевание связывают с нарушениями ПКГ 1-го и 2-го типа, такими как апоптоз и аутофагия. В сравнении с апоптозом смысл аутофагии не столь однозначен, так как она также может способствовать выживанию клеток в условиях стресса [19]. Ингибирование апоптоза и активация ау-

тофагии коррелирует с развитием бронхиальной астмы, более тяжелым ее течением и резистентностью к терапии. Среди маркеров ранних этапов аутофагии, ПКГ 2-го типа, выделяют белок Beclin-1, продукт гена *BECN1*. Взаимодействие Bcl-2 с Beclin-1 снижается при голодании, высвобождая последний для активации аутофагии. Поэтому было высказано предположение, что Bcl-2 является не только антиапоптотическим, но и антиаутофагическим белком. Beclin-1 направляет ключевые аутофагические белки в преаутофагосомную структуру, тем самым формируя коровый комплекс аутофагосомы [14]. Основным маркером заключительных этапов аутофагии является белок LC3. Его липидированная форма, LC3-II, локализуется как на внешней, так и на внутренней стороне мембраны аутофагосомы [3].

Наибольшую ассоциацию с патогенезом АБА имеет Bcl-2/Вак-опосредованный путь апоптоза, связанный с семейством генов Bcl2. Белок Bcl-2, кодируемый геном *BCL2*, подавляет апоптоз посредством предотвращения активации каспаз, осуществляющих этот процесс. Внешние факторы и внутреннее повреждение клетки подавляет Bcl-2, что вследствие каскада сигнального пути приводит к активации каспазы-3, продукт гена *CASP3*, являющийся одним из основных маркеров апоптоза [11]. Многие исследования показывают, что Bcl-2 также обнаруживается в большем количестве в лимфоцитах больных астмой, по сравнению со здоровыми субъектами, при этом процент лимфоцитов с повышенной экспрессией Bcl-2 зависит от тяжести астмы [5, 9].

Хроническое воспаление является сопровождающим процессом при многих заболеваниях, в том числе при бронхиальной астме, и почти всегда требует включения терапии синтетическими глюкокортикоидами (ГК). Их эффект проявляется в связывании с глюкокортикоидным рецептором (ГР), который в норме регулирует экспрессию генов и подавляет воспалительный процесс [10]. Однако важным фактором, определяющим низкую эффективность системной терапии бронхиальной астмы, является резистентность глюкокортикоидного рецептора. К ведущим причинам нечувствительности относят генетические полиморфизмы гена *NR3C1*, которые могут приводить к экспрессии его неактивной изоформы, изменению структуры до-

менов рецептора, его способности связываться с лигандом и молекулярными компонентами сигнальных путей [13]. Наибольшая ассоциация с тяжестью течения бронхиальной астмы и более частым возникновением устойчивости к терапии была выявлена у GG-варианта полиморфизма *BclI* [16, 18, 20]. Среди эффектов, вызываемых активированным глюкокортикоидным рецептором в лимфоцитах, наиболее значимым является регуляция ПКГ, что определяет важность ее изучения у пациентов с полиморфизмом, ассоциированным с резистентностью.

Более четкое понимание роли полиморфизмов ГР в запускаемых им молекулярных процессах и влияние измененного рецептора на программируемую клеточную гибель может помочь оптимизировать схемы лечения пациентов с АБА, устойчивых к терапии ГК, а также стать ближе к раскрытию механизмов резистентности при многих заболеваниях, ассоциированных с хроническим воспалением. В связи с этим целью данного исследования являлась оценка влияния G-аллели в однонуклеотидном полиморфизме *BclI* гена *NR3C1* глюкокортикоидного рецептора на экспрессию генов-регуляторов апоптоза (*BCL2*, *CASP3*) и аутофагии (*BECN1*, *LC3*) в лимфоцитах больных средней и тяжелой формой атропической бронхиальной астмы.

Материалы и методы

Исследование проводили в соответствии с Хельсинкской декларацией ВМА 2000 года и протоколом Конвенции Совета Европы о правах человека и биомедицине 1999 года. Образцы периферической крови были получены у пациентов, состоящих на учете в специализированной консультативно-диагностической поликлинике инфекционно-аллергических заболеваний ФБУН Казанского научно-исследовательского института эпидемиологии и микробиологии Роспотребнадзора, г. Казань (договор о научно-исследовательской работе № 5299091012).

Объекты исследования

У 24 пациентов в возрасте от 20 до 45 лет установлен диагноз «АБА» средней и тяжелой степени. Диагноз и степень тяжести АБА верифицировали согласно критериям «Глобальной стратегии диагностики, профилактики и лечения астмы» (GINA, 2023) и Федеральным клиническим рекомендациям по диагностике и лечению бронхиальной астмы (Российское респираторное общество, 2021). Критериями включения в исследование являлись отсутствие базисной терапии АБА в течение последних 2 недель, информированное согласие на обследование. К критериям исключения относили наличие сопутствующей патологии со стороны других органов и систем, курение.

Всем больным проводилось общеклиническое обследование, включавшее общий анализ крови с подсчетом лейкоцитарной формулы, общий анализ мокроты, рентгенографию органов грудной клетки, электрокардиографию, исследование функции внешнего дыхания методом спирометрии (аппарат АД ОЗ-М, г. Казань). Программа аллергологического обследования включала анализ аллергологического анамнеза, кожное тестирование с набором стандартных диагностических аллергенов, определение уровня общего и специфических IgE в сыворотке крови методом твердофазного ИФА. Забор крови осуществлялся путем венопункции кубитальной вены в объеме 9 мл в утренние часы до приема пищи. Периферическую кровь из локтевой вены отбирали в вакуумную пробирку, содержащую ЭДТА, и использовали для исследований в течение 3 часов.

Полиморфизм длин рестрикционных фрагментов

Проводили выделение ДНК из цельной крови с помощью набора ExtractDNA Blood & Cells (Евроген, Россия). Методом ПЦР проводили амплификацию rs41423247 (*BclI*) фрагмента гена *NR3C1* человека. Для проведения реакции использовали праймеры со следующей нуклеотидной последовательностью:

Forward primer 5'-GAGAAATTCACCCCTACCAAC-3'

Reverse primer 5'-AGAGCCCTATTCTTCAAAGTG-3'

Смесь на 1 реакцию содержала 0,8 мкл MgCl₂, 2,5 мкл 10× буфера, 0,1 мкл термостабильной Taq ДНК-полимеразы, 1 мкл смеси нуклеотидов, 0,625 мкл прямого и 0,625 мкл обратного олигонуклеотидного праймера, конечная концентрация ДНК в смеси составляла 10 нг/мкл. Реакция амплификации состояла из начальной стадии денатурации при 94 °C (3 минуты); 30 циклов денатурации при 94 °C (45 секунд), отжига праймеров при 60 °C (45 секунд), полимеризации при 72 °C (1 минута); заключительного этапа элонгации при 72 °C (10 минут). Рестрикцию ПЦР-продуктов проводили рестриктазой Ksp22 I (SibEnzyme, Россия), стоковая концентрация 20 000 ед/мл. Реакционная смесь содержала 9,8 мкл H₂O, 2 мкл SE буфера, 0,2 мкл бычьего сывороточного альбумина, 0,5 мкл рестриктазы, 7,5 мкл ПЦР-продукта. Рестрикцию проводили в термоциклере в течение 1 часа при +37 °C. Визуализацию продуктов рестрикции проводили с помощью горизонтального геля-электрофореза в 2%-ном агарозном геле, сигнал окрашивания бромистым этидием регистрировали с помощью УФ-транслюминатора геледокументирующей системы ChemiDoc™ (Bio-Rad, Сингапур).

Культивирование клеток

РВМС выделяли по стандартной методике на градиенте плотности фиколла ($\rho = 1,077$,

НПП «ПанЭко», Россия). Для отделения моноцитов проводили культивирование на адгезивном пластике в течение 2 часов, после чего отбирали суспензионную культуру с фракцией лимфоцитов. Культивировали в течение 0 суток (2 часа) и 6 суток в среде RPMI-1640 (НПП «ПанЭко», Россия), содержащей эмбриональную телячью сыворотку (10%, НПП «ПанЭко», Россия), пенициллин/стрептомицин (5000 ед/мл / 5000 мкг/мл, НПП «ПанЭко», Россия) и L-глутамин (1%, НПП «ПанЭко», Россия) в расчете 2×10^6 кл/мл в условиях истощения питательных веществ. В качестве исследуемого вещества использовали дексаметазон (10^{-2} М, Sigma-Aldrich, США; конечная концентрация 10^{-4} М).

Определение уровня экспрессии генов-регуляторов ПКГ

После культивирования отбирали клеточную суспензию, гомогенизировали клеточный осадок в ExtractRNA (ЗАО «Евроген», Россия) (1 мл / 10 млн клеток), выделение РНК проводили по стандартному протоколу. Концентрацию и степень чистоты РНК определяли с помощью NanoDropLite (Thermo Fisher, США), образцы использовали при соотношении 260/280 нм $\sim 2,0$, 260/230 в диапазоне 2,0-2,2. Проводили синтез кДНК на матрице РНК с помощью набора РЕВЕРТА-L (ООО «ИнтерЛабСервис», Россия). С помощью метода ПЦР в реальном времени определяли уровень экспрессии генов-регуляторов апоптоза (*BCL2*, *CASP3*) и генов-регуляторов аутофагии (*LC3*, *BECN1*), визуализировали с помощью красителя FAM. В качестве гена домашнего хозяйства для референсного значения использовали ген *ACTB* (краситель VIC). Праймеры для гена *ACTB*: Прямой – 5'-CACCATTGGCAATGAGCGGTTC-3'; Обратный – 5'-AGGTCTTTGCGGATGTCCACGT-3'. *BCL2*: Прямой – 5'-GTGGCCTTCTTTGAGTTCGGT-3'; Обратный – 5'-CACCTACCCAGCCTCCGTTA-3'. *BECN1*: Прямой – 5'-CAGGAACACAGCTCCATTAC-3'; Обратный – 5'-CCATCCTGGCGAGTTTCAATA-3'. *CASP3*: Прямой – 5'-TGGCCCTGAAATACGAAGTC-3'; Обратный – 5'-GGCAGTAGTCGACTCTGAAG-3'. *LC3*: Прямой – 5'-CTGGACTTCTTAGAGTTCGTT-3'; Обратный – 5'-CACCTAATCGCCTCCGTAA-3'.

Для основы реакции использовали TaqManTM Universal PCR Master Mix (Thermo Fisher, США), содержащий Taq-полимеразу AmpliTaq GoldTM DNA Polymerase, урацил-ДНК-гликозилазу, dNTP с dUTP, эталонный краситель ROX, буферные компоненты. На 1 пробу 5 мкл 2× Master Mix, Праймеры FaM-20× 0,5 мкл, Праймеры ViC-20× 0,5 мкл, dH₂O 2,0 мкл. Амплифицировали с помощью CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, США) при: 1 цикл при 95 °C (5 минут); 40 циклов при 95 °C (30 секунд), при 60 °C (30 секунд), при 72 °C (15 секунд). Для оцен-

ки уровня экспрессии генов и нормализации использовали дельта-дельта Ct ($\Delta\Delta Ct$) метод.

Статистическая обработка результатов

Для математического анализа и визуализации полученных результатов использовали пакет программ GraphPad Prism 8.4.3.686 и PAST v. 3.17. Для проверки нормальности распределения данных использовали W-критерий Шапиро–Уилка. Для анализа выборки, не поддающейся закону нормального распределения, использовали структурные характеристики (медиану, перцентили 2,5 и 97,5). Для оценки различий между отдельными выборками применяли непараметрические критерии Краскела–Уоллиса (для общей характеристики выборки), а после проводили множественные апостериорные сравнения с помощью теста Данна (Dunn's post hoc test). Статистически значимыми считали различия при значениях двустороннего $p < 0,05$.

Результаты

Определение вариантов Bcl1 полиморфизма в группе пациентов с АБА

В ходе метода полиморфизма длин рестрикционных фрагментов и гель-электрофореза определили варианты полиморфизма *Bcl1* у пациентов из исследуемой группы. Репрезентативная визуализация генотипов GG, CC и GC представлена на рисунке 1.

Сравнение экспрессии генов программируемой клеточной гибели

Мы оценили изменения экспрессии генов в лимфоцитах больных atopической бронхиальной астмы при различной длительности культивирования с добавлением и без добавления дексаметазона в зависимости от генотипа полиморфизма *Bcl1*. На рисунке 2 представлены относительные уровни экспрессии генов-регуляторов ПКГ.

По результатам исследования у больных АБА с CC и GC-вариантами *Bcl1* полиморфизма уровень экспрессии гена *BECN1*, кодирующего белок-индуктор аутофагии, статистически значимо повышается под воздействием дексаметазона как при кратковременном, так и при длительном культивировании. Также было отмечено, что в группе с GG-вариантом полиморфизма экспрессия *BECN1* не изменялась. В ходе исследования было отмечено значительное повышение уровня экспрессии гена *LC3*, маркера заключительного этапа аутофагии, через 2 часа культивирования с дексаметазоном по сравнению с контролем в группах с CC и GC-вариантами полиморфизма. При длительном культивировании воздействие дексаметазона статистически значимо повышало экспрессию *LC3* во всех группах больных АБА. При этом уровень экспрессии *LC3* был значительно выше в группе с GC-генотипом.

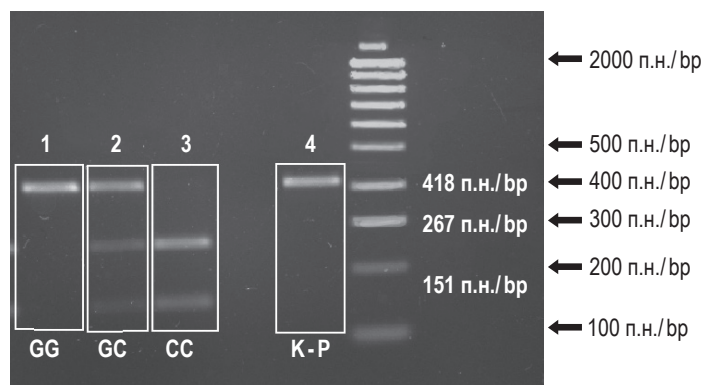


Рисунок 1. Электрофоретическое разделение фрагментов ДНК после рестрикции ПЦР-продуктов образцов больных астмой с различными генотипами полиморфизма *Bcl1* гена *NR3C1*

Примечание. 1 – GG-генотип, 1 фрагмент длиной 418 п. н.; 2 – GC-генотип из 3 фрагментов длиной 418 п. н., 267 п. н. и 151 п. н.; 3 – CC-полиморфизм из 2 фрагментов длиной 267 п. н. и 151 п. н.; 4 – ПЦР-продукт, не подвергавшийся воздействию рестриктазы (K -P); M – DNA HyLadder; п. н. – пар нуклеотидов.

Figure 1. Electrophoresis separation of *BclI* polymorphism digestion products of *NR3C1* gene from samples of atopic bronchial asthma patients with different genotypes

Note. 1, 418-bp band for GG; 2, three bands, 418-, 267- and 151-bp for GC; 3, two bands, 267- and 151-bp, for CC are shown; 4, PCR-product without restriction (K -P); M, DNA HyLadder; bp, base pair.

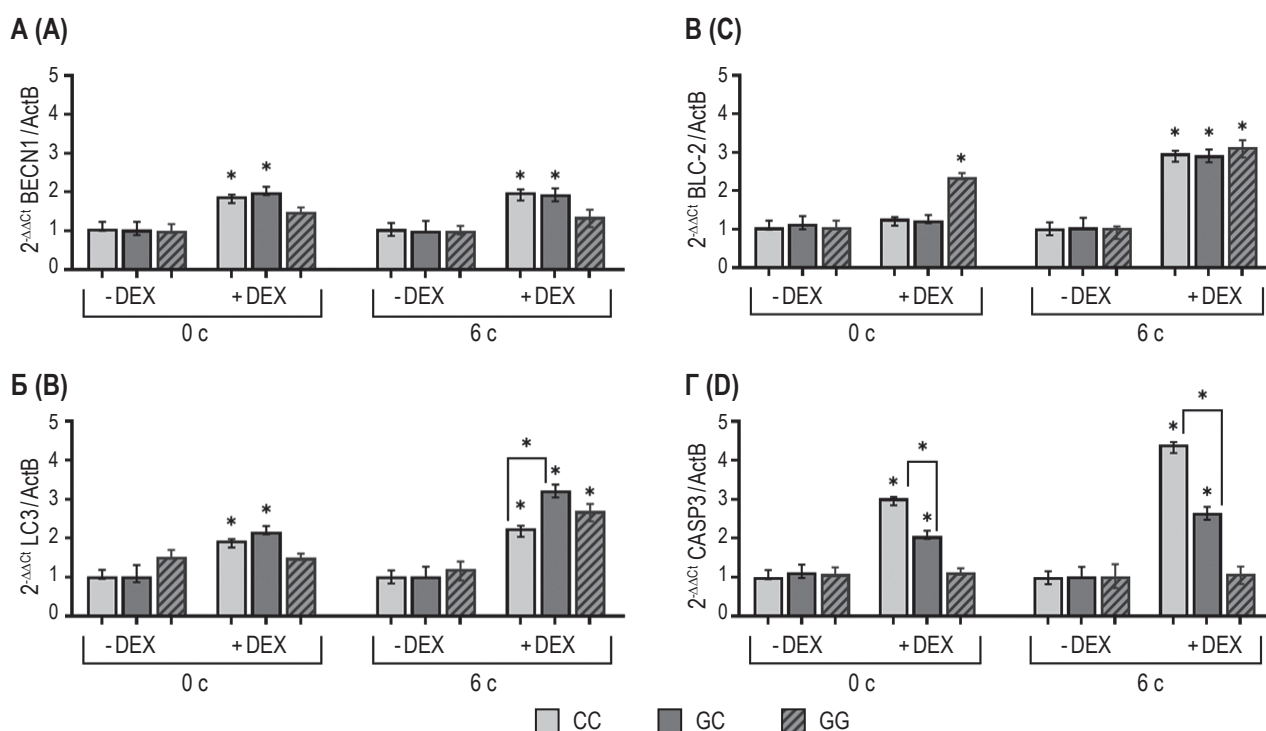


Рисунок 2. Уровни относительной экспрессии генов-маркеров программируемой клеточной гибели в лимфоцитах больных atopической бронхиальной астмой с CC, GC и GG-генотипами *Bcl1* полиморфизма гена *NR3C1*

Примечание. Уровни относительной экспрессии генов *BECN1* (A), *LC3* (Б), *BCL2* (В), *CASP3* (Г) ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) в лимфоцитах в присутствии и отсутствии в питательной среде дексаметазона (+DEX/-DEX) (10^{-4} M) на 0-е сутки (0 c) и на 6-е сутки (6 c) культивирования. Статистически значимые различия при $p < 0,05$ внутри одной группы между образцами +DEX и -DEX обозначены *, дополнительные статистически значимые различия обозначены * с рамкой.

Figure 2. Relative expression of genes-markers of programmed cell death in lymphocytes of patients with atopic bronchial asthma with CC, GC and GG *BclI* polymorphisms of *NR3C1* gene

Note. Relative expression of *BECN1* (A), *LC3* (B), *BCL2* (C), *CASP3* (D) ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) genes in lymphocytes in the presence and absence of dexamethasone (+DEX/-DEX) in nutrient medium (10^{-4} M) on day 0 (0 c) and on day 6 (6 c) of cultivation. Statistically significant differences at $p < 0.05$ within the same group between +DEX and -DEX samples are indicated by *, additional statistically significant differences are indicated by * with a box.

При 2-часовом воздействии дексаметазона статистически значимое повышение уровня экспрессии гена *BCL2* наблюдалось только в группе больных АБА с GG-вариантом *Bcl1* полиморфизма. При длительном культивировании с воздействием дексаметазона в лимфоцитах всех групп пациентов наблюдалось повышение уровня экспрессии гена *BCL2*. Как при кратковременном, так и 6-дневном культивировании с дексаметазоном, в лимфоцитах группы больных с СС и GC-вариантами полиморфизма происходит статистически значимое повышение уровня экспрессии гена *CASP3*, по сравнению с необработанным лекарством клетками. Активация апоптоза в клетках является нормальным эффектом глюкокортикоидного рецептора, однако в группе с GC-полиморфизмом (содержащем G-аллель, ассоциированный с более тяжелым течением АБА), уровень экспрессии *CASP3* меньше, чем в группе с СС-вариантом, ассоциированным с нормальным ответом на ГК. Что примечательно, в лимфоцитах группы с GG-вариантом полиморфизма, уровень экспрессии *CASP3* остается на прежнем уровне вне зависимости от времени воздействия дексаметазона на клетки.

Обсуждение

Ранее мы упоминали значение нарушения регуляции ПКГ в патогенезе и повышенной стойкости течения АБА, а также изменения ответа на глюкокортикоиды у пациентов с различными вариантами *Bcl1*-полиморфизма гена *NR3C1*. Развитие хронического воспаления при atopической бронхиальной астме в первую очередь зависит от продолжительности рекрутирования клеток из кровеносного русла в слизистую оболочку бронхов и их поверхностной активации, поэтому пролонгация аллергического воспаления при АБА может быть связана с усилением выживаемости Т-лимфоцитов и утратой их способности к ПКГ. Ранними исследованиями было показано, что лимфоциты пациентов с АБА имеют нарушенный ответ на индукцию апоптоза и это является одной из причин длительного воспаления дыхательных путей [5]. Исследования последних лет продемонстрировали, что одним из ключевых механизмов ухода клеток от апоптоза является аутофагия, представляющая собой важную терапевтическую мишень для устранения основных астматических симптомов и обхода проблемы резистентности [23]. При этом нарушение или чрезмерная активация аутофагии во время хронической фазы аллергической реакции может усиливать накопление аутофагосом и активировать проникающие в легкие клетки врожденного иммунитета, а также эпителиальные клетки

дыхательных путей, что приводит к снижению функции легких.

Продукт гена *BECN1* участвует в реакциях, определяющих баланс между апоптозом и аутофагией. После диссоциации белка Bcl-2, Beclin-1 переходит в активную форму и образует комплекс с VPS34 и другими белками-регуляторами аутофагии, в результате чего стимулируется наращивание липидной мембраны аутофагосомы, изолирование груза и завершается процесс нуклеации. Недостаток питательных веществ в культуральной среде индуцирует аутофагию и позволяет выявить нарушение этого процесса в клетках. Неизменный уровень экспрессии *BECN1* при подобных условиях в группе с GG вариантом полиморфизма может предполагать наличие у этой группы больных нарушения активации аутофагии, как способа программируемой клеточной гибели. Увеличение экспрессии гена LC3 может указывать на повышенную активацию аутофагии и образование аутофагосом. Аллель G ассоциирована с более тяжелым течением бронхиальной астмы, однако GC-вариант полиморфизма характеризуется резистентностью к терапии реже, чем GG-вариант [20]. Повышение уровня аутофагии демонстрирует нормальный физиологический ответ на недостаток питательных веществ, однако, учитывая нарушение последних этапов аутофагии у всей группы больных atopической бронхиальной астмой, процесс может усиливать аллергическое воспаление и отягощать симптоматическую картину [7, 23].

По-видимому, аутофагия играет уравнивающую роль, призванную избежать чрезмерного повреждения легочной ткани, обеспечивая при этом защитный ответ против патогенов, что делает ее неоднозначной, но неоспоримо важной мишенью при терапии.

Было показано, что кортикостероиды уменьшают воспаление множеством способов, включая снижение продукции медиаторов воспаления и подавление иммунной системы за счет снижения активности и объема лимфоцитов [1]. Полиморфные варианты гена *NR3C1*, а также альтернативные молекулярные механизмы могут приводить к снижению экспрессии ГР- α , функциональной изоформы рецептора и, наоборот, повышению экспрессии нефункциональной изоформы ГР- β , неспособной связываться с гормонами и синтетическими ГКС. Помимо изменения уровня экспрессии активной и неактивной изоформы, генетические полиморфизмы и, как следствие, альтернативный сплайсинг могут приводить к дефектному связыванию ГКС с ГР- α [14, 22]. Помимо генетических полиморфизмов рецептора, одной из причин возникновения устойчивости, связанных с нарушением связывания ГК с ГР- α ,

можно считать фосфорилирование такими киназами, как MAPK и JNK, что препятствует его транслокации в ядро и активации транскрипции противовоспалительных генов [24]. Перечисленные механизмы имеют прочную связь с регуляцией программируемой гибели в клетке, и изменение структуры ГР может оказывать прямое влияние на апоптоз и аутофагию. Хорошо известно, что высокие дозы глюкокортикоидов вызывают апоптоз в Т-клетках, В-клетках, макрофагах, незрелых дендритных клетках, эозинофилах и в натуральных киллерах. При этом существует много типов клеток, которые устойчивы или антиапоптотически реагируют на глюкокортикоиды, а различные трансляционные изоформы GR α индуцируют апоптоз с разной скоростью [12].

Белок Bcl-2 участвует в регуляции как аутофагии, так и апоптоза, и поддерживает аутофагию в клетке на физиологическом уровне. В нормальных условиях белок Bcl-2 связан с белком Beclin-1, но в условиях недостатка питательных веществ (и влияния других стимулов индукции аутофагии, как механизма выживания), Bcl-2 диссоциирует от Beclin-1, освобождая его для дальнейшего каскада взаимодействий с белками аутофагии [15]. Повышение уровня экспрессии Bcl-2 может быть связано как с ингибированием аутофагии с целью удержания ее в физиологических пределах, так и с ингибированием апоптоза в ответ на сильную индуктивный проапоптотический эффект дексаметазона. Ассоциация GG-варианта полиморфизма с резистентностью к терапии ГК может объясняться данной активацией антиапоптотических механизмов даже в ответ на кратковременное воздействие лекарства. Однако сильная индукция аутофагии под воздействием недостатка питательных веществ в культуральной среде может активировать физиологические регуляторы, такие как Bcl-2, для стабилизации ПКГ в лимфоцитах пациентов со всеми вариантами по-

лиморфизма. Несмотря на это, анализы клеток, экспрессирующих различные уровни Bcl-2 и Bax, показали, что степень подавления апоптоза коррелирует с количеством Bcl-2, свободного от Bax, а не с общим количеством Bcl-2, что также может влиять на интерпретацию полученных результатов [21]. Наиболее значимые результаты исследования маркеров апоптоза были получены при оценке относительной экспрессии гена *CASP3*. Каспазы являются важнейшими медиаторами апоптоза, среди которых продукт гена *CASP3* является наиболее часто активируемой протеазой, катализирующей специфическое расщепление многих ключевых клеточных белков [8]. Отсутствие изменений уровня экспрессии *CASP3* в лимфоцитах группы с GG-вариантом полиморфизма демонстрирует толерантность таких иммунных клеток к воздействию дексаметазона. Подобная блокировка апоптотического ответа на глюкокортикоиды может служить одним из механизмов резистентности клеток к терапии и объяснять структурные и функциональные изменения, происходящие с полиморфным глюкокортикоидным рецептором.

Заключение

Таким образом, мы установили, что, несмотря на упомянутую роль аутофагии, связанную с выживанием клеток, пониженная экспрессия ее генов-регуляторов у больных с GG-вариантом полиморфизма *Bcl1* под воздействием дексаметазона может служить одним из механизмов ухода от клеточной гибели и развития резистентности. Выявленная нами устойчивость к индукции апоптоза в таких клетках лишь подтверждает, что изменения в строении полиморфного глюкокортикоидного рецептора могут запускать альтернативные сигнальные каскады, возможно, блокирующие клеточную гибель и требующие дальнейшего подробного изучения.

Список литературы / References

1. Abaya R., Jones L., Zorc J.J. Dexamethasone compared to prednisone for the treatment of children with acute asthma exacerbations. *Pediatr. Emerg. Care*, 2018, Vol. 34, no. 1, pp. 53-58.
2. Abdulmir A.S., Hafidh R.R., Abubakar F., Abbas K.A. Changing survival, memory cell compartment, and T-helper balance of lymphocytes between severe and mild asthma. *BMC Immunol.*, 2008, Vol. 9, 73. doi: 10.1186/1471-2172-9-73.
3. Abramov S.N., Skibo Y.V., Evtugyn V.G., Vodounon C.A., Abramova Z.I. The role of T-lymphocytes autophagy in severe atopic asthma pathogenesis. *BioNanoScience*, 2017, Vol. 7, pp. 269-271.
4. Ali F.R. Does this patient have atopic asthma? *Clin. Med.*, 2011, Vol. 11, no. 4, pp. 376-380.
5. Boonpiyathad T., Sözen Z.C., Satitsuksano P., Akdis C.A. Immunologic mechanisms in asthma. *Semin. Immunol.*, 2019, Vol. 46, 101333. doi: 10.1016/j.smim.2019.101333.
6. Goleva E., Li L.-B., Eves P.T., Strand M.J., Martin R.J., Leung D.Y.M. Increased glucocorticoid receptor beta alters steroid response in glucocorticoid-insensitive asthma. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 2006, Vol. 173, no. 6, pp. 607-616.
7. Gorska M.M. Natural killer cells in asthma. *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.*, 2017, Vol. 17, no. 1, pp. 50-54.

8. Gruver-Yates A.L., Cidlowski J.A. Tissue-specific actions of glucocorticoids on apoptosis: a double-edged sword. *Cells*, 2013, Vol. 2, no. 2, pp. 202-223.
9. Hamzaoui A., Hamzaoui K., Salah H., Chabbou A. Lymphocytes apoptosis in patients with acute exacerbation of asthma. *Mediators Inflamm.*, 1999, Vol. 8, no. 4-5, pp. 237-243.
10. Henderson I., Caiazzo E., McSharry C., Guzik T.J., Maffia P. Why do some asthma patients respond poorly to glucocorticoid therapy? *Pharmacol. Res.*, 2020, Vol. 160, 105189. doi: 10.1016/j.phrs.2020.105189.
11. Holtzman M.J., Green J.M., Jayaraman S., Arch R.H. Regulation of T cell apoptosis. *Apoptosis*, 2000, Vol. 5, no. 5, pp. 459-471.
12. Lu N.Z., Collins J.B., Grissom S.F., Cidlowski J.A. Selective regulation of bone cell apoptosis by translational isoforms of the glucocorticoid receptor. *Mol. Cell. Biol.*, 2007, Vol. 27, no. 20, pp. 7143-7160.
13. Lu N.Z., Cidlowski J.A. The origin and functions of multiple human glucocorticoid receptor isoforms. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 2004, Vol. 1024, pp. 102-123.
14. Marquez R.T., Xu L. Bcl-2: Beclin 1 complex: multiple, mechanisms regulating autophagy/apoptosis toggle switch. *Am. J. Cancer Res.*, 2012, Vol. 2, no. 2, pp. 214-221.
15. Mizushima N. Autophagy: process and function. *Genes Dev.*, 2007, Vol. 21, no. 22, pp. 2861-2873.
16. Mohsen H., Moustafa K., Riad N., Shaaban H., El Basha N. The effect of BclI polymorphism of NR3C1 gene on asthma phenotypes in Egyptian children. *Egypt. J. Pediatr. Allergy Immunol.*, 2020, Vol. 18, pp. 71-77.
17. Murdoch J.R., Lloyd C.M. Chronic inflammation and asthma. *Mutation Res.*, 2010, Vol. 690, no. 1-2, pp. 24-39.
18. Panek M., Pietras T., Fabijan A., Miłanowski M., Wieteska L., Górski P., Kuna P., Szemraj J. Effect of glucocorticoid receptor gene polymorphisms on asthma phenotypes. *Exp. Ther. Med.*, 2013, Vol. 5, no. 2, pp. 572-580.
19. Parzych K.R., Klionsky D.J. An overview of autophagy: morphology, mechanism, and regulation. *Antioxid. Redox Signal.*, 2014, Vol. 20, no. 3, pp. 460-473.
20. Pietras T., Panek M., Tworek D., Osajca K., Wujcik R., Górski P., Kuna P., Szemraj J. The Bcl I single nucleotide polymorphism of the human glucocorticoid receptor gene *h-GR/NR3C1* promoter in patients with bronchial asthma: pilot study. *Mol. Biol. Rep.*, 2011, Vol. 38, no. 6, pp. 3953-3958.
21. Potapinska O., Demkow U. T lymphocyte apoptosis in asthma. *Eur. J. Med. Res.*, 2009, Vol. 14, Suppl. 4, pp. 192-195.
22. Ramamoorthy S., Cidlowski J.A. Ligand-induced repression of the glucocorticoid receptor gene is mediated by an NCoR1 repression complex formed by long-range chromatin interactions with intragenic glucocorticoid response elements. *Mol. Cell. Biol.*, 2013, Vol. 33, no. 9, pp. 1711-1722.
23. Theofani E., Xanthou G. Autophagy: a friend or foe in allergic asthma? *Int. J. Mol. Sci.*, 2021, Vol. 22, no. 12, 6314. doi: 10.3390/ijms22126314.
24. Weigel N.L., Moore N.L. Steroid receptor phosphorylation: a key modulator of multiple receptor functions. *Mol. Endocrinol.*, 2007, Vol. 21, no. 10, pp. 2311-2319.

Авторы:

Богомазова А.А. — магистр кафедры биохимии, биотехнологии и фармакологии, лаборант-исследователь научно-исследовательской лаборатории «Иммунопатология», Институт фундаментальной медицины и биологии ФГАОУ ВО «Казанский федеральный университет», г. Казань, Республика Татарстан, Россия

Решетникова И.Д. — к.м.н., заместитель директора по научной работе ФБУН «Казанский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии»; доцент кафедры внутренних болезней ФГАОУ ВО «Казанский федеральный университет», г. Казань, Республика Татарстан, Россия

Authors:

Bogomazova A.A., Master Student, Research Laboratory of Immunopathology, Institute of Fundamental Medicine and Biology, Kazan Federal University, Kazan, Republic of Tatarstan, Russian Federation

Reshetnikova I.D., PhD (Medicine), Deputy Director for Research, Research Institute of Epidemiology and Microbiology; Associate Professor, Department of Internal Medicine, Kazan Federal University, Kazan, Republic of Tatarstan, Russian Federation

Скибо Ю.В. — к.б.н., старший научный сотрудник научно-исследовательской лаборатории «Иммунопатология», Институт фундаментальной медицины и биологии ФГАОУ ВО «Казанский федеральный университет», г. Казань, Республика Татарстан, Россия

Абрамова З.И. — д.б.н., профессор кафедры биохимии, биотехнологии и фармакологии, Институт фундаментальной медицины и биологии, главный научный сотрудник научно-исследовательской лаборатории «Иммунопатология» ФГАОУ ВО «Казанский федеральный университет», г. Казань, Республика Татарстан, Россия

Skibo Yu.V., PhD (Biology), Senior Research Associate, Research Laboratory of Immunopathology, Institute of Fundamental Medicine and Biology, Kazan Federal University, Kazan, Republic of Tatarstan, Russian Federation

Abramova Z.I., PhD, MD (Biology), Professor, Department of Biochemistry, Biotechnology and Pharmacology, Institute of Fundamental Medicine and Biology, Chief Research Associate, Laboratory of Immunopathology, Kazan Federal University, Kazan, Republic of Tatarstan, Russian Federation

Поступила 30.08.2023
Отправлена на доработку 11.09.2023
Принята к печати 04.10.2023

Received 30.08.2023
Revision received 11.09.2023
Accepted 04.10.2023

ЦИТОКИНОВЫЙ ПРОФИЛЬ ТКАНИ НОСОВЫХ ПОЛИПОВ И КЛИНИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ПАЦИЕНТОВ С РАЗНОЙ СТЕПЕНЬЮ МЕДИКАМЕНТОЗНОГО КОНТРОЛЯ И ТЯЖЕСТИ ТЕЧЕНИЯ ПОЛИПОЗНОГО РИНОСИНУСИТА

Савлевич Е.Л.^{1,2}, Любимова Е.В.³, Зурочка А.В.^{4,5},
Митрофанова Е.С.⁶, Шиловский И.П.⁷

¹ ФГБУ ДПО «Центральная государственная медицинская академия» Управления делами Президента Российской Федерации, Москва, Россия

² ГБУЗ МО «Московский областной научно-исследовательский клинический институт имени М.Ф. Владимирского», Москва, Россия

³ ООО «ЛОР клиника», г. Екатеринбург, Россия

⁴ ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения Российской академии наук, г. Екатеринбург, Россия

⁵ ФГАОУ ВО «Южно-Уральский государственный университет» (национальный исследовательский университет), г. Челябинск, Россия

⁶ Академия постдипломного образования ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр специализированных видов медицинской помощи и медицинских технологий Федерального медико-биологического агентства», Москва, Россия

⁷ ФГБУ «Государственный научный центр «Институт иммунологии»» Федерального медико-биологического агентства России, Москва, Россия

Резюме. На сегодняшний день рецидивы полипозного риносинусита (ПРС) остаются неразрешенной проблемой. Поэтому необходима идентификация пациентов с неконтролируемым течением ПРС.

Цель работы — изучить цитокиновый профиль носовых полипов и клинические характеристики у пациентов с разной степенью медикаментозного контроля полипозного риносинусита.

У 99 пациентов с ПРС выполнена эндоскопическая полипотомия полости носа. В ткани полипа методом мультиплексного анализа исследовался уровень белков интерферона IFN γ , интерлейкина IL-1 β , IL-4, IL-5, IL-13, фактора некроза опухоли TNF α , и трансформирующих факторов роста TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3. Пациенты проходили лечение, согласно алгоритму ступенчатой терапии

Адрес для переписки:

Савлевич Елена Леонидовна
ФГБУ ДПО «Центральная государственная медицинская академия» Управления делами Президента Российской Федерации
121359, Россия, Москва, ул. Маршала Тимошенко, 19, стр. 1А.
Тел.: 8 (985)-145-27-45.
E-mail: savllena@gmail.com

Address for correspondence:

Elena L. Savlevich
Central State Medical Academy of Department for Presidential Affairs of the Russian Federation
19/1A, Marshal Timoshenko St
Moscow
121359 Russian Federation
Phone: +7 (985)-145-27-45.
E-mail: savllena@gmail.com

Образец цитирования:

Е.Л. Савлевич, Е.В. Любимова, А.В. Зурочка, Е.С. Митрофанова, И.П. Шиловский «Цитокиновый профиль ткани носовых полипов и клиническая характеристика пациентов с разной степенью медикаментозного контроля и тяжести течения полипозного риносинусита» // Медицинская иммунология, 2024. Т. 26, № 3. С. 533-544.
doi: 10.15789/1563-0625-CPO-2914

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

For citation:

E.L. Savlevich, E.V. Lyubimova, A.V. Zurochka, E.S. Mitrofanova, I.P. Shilovskiy «Cytokine profile of nasal polyps and clinical characteristics of patients with polypous rhinosininitis at different degree of therapeutic control and disease severity», Medical Immunology (Russia)/ Meditsinskaya Immunologiya, 2024, Vol. 26, no. 3, pp. 533-544. doi: 10.15789/1563-0625-CPO-2914

© Savlevich E.L. et al., 2024
The article can be used under the Creative Commons Attribution 4.0 License
DOI: 10.15789/1563-0625-CPO-2914

ПРС [9], через 5 лет наблюдения на основании степени медикаментозного контроля ПРС были распределены группы. 1-я группа — больные с легким течением ПРС, получали лечение по I и II ступени алгоритма за весь период наблюдения. 2-я группа — ПРС средней степени тяжести, терапия ПРС соответствовала II или III ступени алгоритма. 3-я группа — пациенты с тяжелым течением ПРС, с одним или несколькими курсами лечения по IV ступени алгоритма. Повторно проведено анкетирование по опроснику SNOT-22, эндоскопический осмотр, оценка клинических симптомов. При наличии бронхиальной астмы (БА) ее контроль оценивали по опроснику ACQ-7. Проведен анализ первоначального цитокинового профиля в носовых полипах этих пациентов по группам.

Результаты:

1. Через 5 лет в 1-й группе с легким течением ПРС наблюдалась минимальная выраженность заложенности носа, нарушения обоняния, наименьшее снижение уровня качества жизни (SNOT-22). Продолжительность БА была меньше, чем в 3-й группе, отмечался хороший уровень ее медикаментозного контроля. В цитокиновом профиле полипов была высокая концентрация IL-4, средние значения IL-1 β , TNF α , IFN γ и минимальные значения TGF- β 1.

2. Во 2-й группе при ПРС средней степени тяжести были более выраженные нарушения обоняния, заложенность носа и ухудшение качества жизни. Уровень медикаментозного контроля БА был ниже, чем в 1-й группе. Выявлена максимальная концентрация белков IFN γ , IL-1 β , TNF α , IL-5, TGF- β 1 и TGF- β 2.

3. В 3-й группе с плохим медикаментозным контролем ПРС получены максимальные баллы SNOT-22, затруднения носового дыхания, снижение обоняния. Длительность БА выше, а уровень ее медикаментозного контроля ниже по сравнению с 1-й группой. В ткани полипов выявлен минимальный уровень IFN γ , IL-1 β , TNF α , IL-4 и IL-5, TGF- β 2 и TGF- β 3.

4. Лечение пациентов в зависимости от клинических фенотипов ПРС по наличию или отсутствию респираторной аллергии или БА позволяет улучшить медикаментозный контроль и снизить рецидив ПРС.

Ключевые слова: полипозный риносинусит, цитокины, бронхиальная астма, степень медикаментозного контроля, мультиплексный анализ, рецидив, TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, SNOT-22

CYTOKINE PROFILE OF NASAL POLYPS AND CLINICAL CHARACTERISTICS OF PATIENTS WITH POLYPOUS RHINOSINUSITIS AT DIFFERENT DEGREE OF THERAPEUTIC CONTROL AND DISEASE SEVERITY

Savlevich E.L.^{a, b}, Lyubimova E.V.^c, Zurochka A.V.^{d, e}, Mitrofanova E.S.^f, Shilovskiy I.P.^g

^a Central State Medical Academy of Department for Presidential Affairs of the Russian Federation, Moscow, Russian Federation

^b Moscow M. Vladimirsky Regional Research Clinical Institute, Moscow, Russian Federation

^c LLC "ORL Clinic", Yekaterinburg, Russian Federation

^d Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Yekaterinburg, Russian Federation

^e South Ural State University (National Research University), Chelyabinsk, Russian Federation

^f Academy of Postgraduate Education, Federal Research and Clinical Center of Specialized Medical Care and Medical Technologies, Federal Medical and Biological Agency, Russian Federation

^g State Research Center "Institute of Immunology", Federal Medical and Biological Agency, Moscow, Russian Federation

Abstract. The issues of recurrences in chronic rhinosinusitis with nasal polyps (CRSwNP) still remain unresolved. Therefore, detection patients with uncontrolled clinical course of CRSwNP is required. The aim of the present study was to assess cytokine profile in nasal polyps as well as clinical characteristics of patients with CRSwNP at varying levels of therapeutic control.

The study included 99 patients with chronic rhinosinusitis. The contents of interferon $IFN\gamma$, interleukin IL-1 β , IL-4, IL-5, IL-13, tumor necrosis factor $TNF\alpha$, transforming growth factors TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3 were measured in polyp tissue samples by means of multiplex analysis. The patients were treated according to a stepwise CRSwNP therapeutic algorithm [9]. Following observation for 5 years, all patients were divided into groups, as based on medical control degree. Group 1 included patients with mild CRSwNP, who mainly received stage I and II treatment for the entire observation period. Group 2 was presented by moderate- severity CRSwNP, with stage II or III therapy according to the referred algorithm. Group 3 included the patients with severe CRSwNP who received one or more stage IV courses. The patients underwent repeated SNOT-22 questionnaire, endoscopic examination, clinical assessment. In case of bronchial asthma (BA), ACQ-7 was repeated. Initial cytokine profile of nasal polyps was analyzed by the mentioned clinical groups.

Results:

1. After 5 years of observations in group 1 (mild CRSwNP), we found a minimal decrease in quality of life (SNOT-22), severity of nasal congestion, or smell impairment. Bronchial asthma duration in these patients was significantly lower compared to group 3, the patients had better asthma control level. Cytokine profile of nasal polyps was characterized by the highest IL-4 concentration, average values IL-1 β , $TNF\alpha$, $IFN\gamma$ and minimal TGF- β 1 values.
2. In group 2 (moderate CRSwNP), we noted more pronounced impairment of smell, nasal congestion and quality of life. Bronchial asthma was less controlled than in group 1. The maximal concentrations of $IFN\gamma$, IL-1 β , $TNF\alpha$, IL-5, TGF- β 1, TGF- β 2 were registered.
3. In group 3 with poor CRSwNP control, the highest SNOT-22 scores, severity of difficulty in nasal breathing, impaired sense of smell were revealed. Duration of bronchial asthma was longer, with lowest levels of medical control. In nasal polyps, minimal levels of $IFN\gamma$, IL-1 β , $TNF\alpha$, IL-4, IL-5, TGF- β 2, TGF- β 3 were noted.
4. Treatment of patients depending on the clinical phenotypes of CRSwNP in the presence/absence of allergic rhinitis or bronchial asthma may improve control and reduce incidence of relapses in CRSwNP.

Keywords: chronic rhinosinusitis, nasal polyps, cytokines, asthma, medical control level, multiplex analysis, recurrence, TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, SNOT-22

Исследование выполнено при поддержке гранта Российского научного фонда № 19-15-00272; URL: <https://rscf.ru/project/19-15-00272>.

Введение

ПРС представляет собой гетерогенное заболевание слизистой оболочки околоносовых пазух и характеризуется аккумуляцией воспалительных клеток, высвобождающих большое количество цитокинов в ткани, на основании чего выделяют различные эндотипы заболевания [17]. На сегодняшний день, несмотря на медикаментозное и хирургическое лечение, рецидивы полипозного риносинусита (ПРС) остаются неразрешенной проблемой, их частота при хирургическом лечении колеблется от 4% до 60%, независимо от используемой хирургической техники [20, 21]. Поэтому идентификация пациентов, склонных к неконтролируемому течению ПРС, облегчает выбор лечения и улучшает его эффективность.

Есть данные, что пациенты с редким рецидивом ПРС демонстрируют смешанный паттерн цитокинов с высоким уровнем интерферона $IFN\gamma$, тогда как при ПРС, требующим частых повторных операций, изначально определяется

преимущественное для Th2-типа воспаление с повышенными концентрациями интерлейкина IL-5. При средней концентрации IL-17 в ткани полипов пациенты имеют рецидив чаще по сравнению с низкими и высокими концентрациями этого цитокина. Выраженность клинических симптомов в виде заложенности носа и снижения обоняния, результаты КТ ОНП полностью сопоставимы у пациентов с разной частотой рецидивов. Респираторная аллергия (РА), как прогностический фактор рецидива, также не играет никакой роли, в отличие от бронхиальной астмы (БА) и непереносимости нестероидных противовоспалительных препаратов (НПВП), которые чаще сопровождают рецидивирующий ПРС [21].

Другие коллеги изучали мультиплексным анализом содержание 30 цитокинов в сыворотке крови. В группе с рецидивирующим ПРС определялся повышенный уровень эотоксинов 1-3, IL-17A, играющих критическую роль в агрегации эозинофилов, и хемокина RANTES (regulated upon activation normal T cell expressed and secreted) [22]. Повышенный в 3 раза уровень эотаксина-3 крови при частых рецидивах ПРС был отмечен и при другом исследовании [23]. Высокая экспрессия сосудистой молекулы клеточной адге-

зии (VCAM-1, vascular cell adhesion molecule) и фактора активации В-клеток семейства фактора некроза опухоли (BAFF, B cell activating factor of TNF family) в полипах также может быть индикатором высокой склонности к рецидивам [18, 24]. Определенную прогностическую информацию о тяжести заболевания и исходах ПРС дает подсчет числа эозинофилов в слизистой оболочке носовых полипов [23], назальной слизи [13], плотность клеточной инфильтрации ткани полипов и величина эозинофильно-нейтрофильного индекса [8], повышенная концентрация периостина сыворотки крови [14].

Помимо экспрессии эффекторных цитокинов существуют специфические паттерны ремоделирования слизистой оболочки, среди которых трансформирующий фактор роста (transforming growth factor) TGF- β играет центральную роль посредством привлечения, индукции пролиферации фибробластов и усиления синтеза внеклеточного матрикса. Относительно рецидивов ПРС есть мнение, что TGF- β , по-видимому, не оказывает на них большого влияния [24]. С другой стороны, по их количеству в ткани полипов выявлена разница в зависимости от клинического фенотипа заболевания [11].

Цель работы — изучить цитокиновый профиль ткани носовых полипов и клинические характеристики у пациентов с разной степенью медикаментозного контроля и тяжестью течения полипозного риносинусита.

Материалы и методы

На базе хирургического отделения с дневным стационаром МОНИКИ им. М.Ф. Владимирского были обследованы 99 пациентов с ПРС. Средний возраст $52,27 \pm 14,43$ года, 48 мужчин и 51 женщина. Диагноз «ПРС» подтвержден гистологическим исследованием и данными КТ ОНП, при первичном осмотре полипы в полости носа были не менее второй степени с каждой стороны [19]. В критерии невключения вошли пациенты с односторонним процессом, сопутствующими аутоиммунными, генетическими или онкологическими заболеваниями, при распространенности полипов полости носа по данным эндоскопии 1-й степени. На первом этапе всем пациентам проведена эндоскопическая полипотомия полости носа вне периода обострения ПРС. Гомогенизат ткани полипа замораживали при температуре -70°C . Исследование проводилось в иммунологической лаборатории ФБГУ науки «Институт иммунологии и физиологии» УрО РАН. Методом мультиплексного анализа по протоколу исследовался уровень тканевых белков провоспалительных цитокинов IFN γ ,

IL-1 β , фактора некроза опухоли (tumor necrosis factor, TNF α), маркеров Th-2 воспаления IL-4, IL-5, IL-13 и трансформирующих факторов роста (TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3) в надосадочной жидкости в перерасчете на концентрацию белка 1 мг/мл [10]. Далее все больные обследовались врачом иммунологом-аллергологом на базе ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России для выявления респираторной аллергии (РА) и бронхиальной астмы (БА). Аллергологическое обследование включало сбор анамнеза, выполнение кожных (skin prick test, SPT) и лабораторных проб (определение специфических IgE методами ИФА или хемилюминисценции). Для выявления обратимости бронхиальной обструкции выполнена спирометрия с беродуалом. Результаты этих обследований позволили разделить пациентов на 4 группы по фенотипу ПРС: I — изолированный ПРС; II — сочетание ПРС с РА в виде аллергического ринита (АР), но без аллергической бронхиальной астмы (аБА); III — ПРС, сочетавшийся с АР и аБА; IV — сочетание ПРС и неаллергической бронхиальной астмы (нБА).

После этого пациенты проходили лечение у оториноларинголога в дневном стационаре МОНИКИ, согласно алгоритму ступенчатой терапии ПРС с регулярным осмотром и коррекцией лечения 1 раз в 3 месяца [9]. При сопутствующей БА и РА одновременно контроль и лечение этих заболеваний проводились врачом — аллергологом-иммунологом в ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России.

Через 5 лет наблюдения все пациенты на основании степени медикаментозного контроля ПРС были распределены на три группы. 1-я группа — больные с легким течением ПРС, 34 человека (19 мужчин и 15 женщин), возраст $62,9 \pm 13,66$ года. Эти пациенты в основном получали лечение по I и II ступени лечебного алгоритма за весь период нашего наблюдения. 2-я группа — ПРС средней степени тяжести, 32 человека (17 мужчин и 15 женщин), возраст $55,6 \pm 15,71$ года. Терапия ПРС соответствовала II или III ступени алгоритма. 3-я группа — пациенты с тяжелым течением ПРС, 33 человека (12 мужчин, 21 женщин), возраст $56,3 \pm 13,6$ года, которым в течение 5 лет проводился один или несколько курсов лечения по IV ступени лечебного алгоритма. Дополнительно всем пациентам проведено повторное анкетирование по опроснику SNOT-22, эндоскопический осмотр полости носа. Выраженность клинических симптомов ПРС пациент определяли по 3-балльной визуально-аналоговой шкале (ВАШ). При наличии БА оценка состояния ее контроля дополнительно проводилась при помощи опросника контроля астмы (Asthma Control Questionnaire, ACQ-7). Также был сделан анализ

первоначального цитокинового профиля в ткани носовых полипов этих пациентов по группам медикаментозного контроля.

Статистические расчеты выполнены при помощи программы IBM SPSS Statistics 23.0. При определении средних единиц использовали методы непараметрической статистики, показатели указывали в виде медианы (Me) и границ межквартильных 25-го и 75-го интервалов в скобках. При сравнении 2 групп между собой использовался критерий Манна–Уитни, при множественном сравнении – Краскела–Уоллиса. Параметрические данные описаны в виде среднего значения и стандартного отклонения (в скобках) (\pm). Значения $p < 0,05$ рассматривались как статистически значимые.

Результаты

Согласно полученным данным, средняя продолжительность ПРС в 1-й группе была 18 (9-19)

лет, во 2-й группе – 11 (7-13,5) лет, в 3-й группе – 14,5 (7,5-27) лет (табл. 1). По длительности ПРС достоверных отличий между группами нет. По результатам оценки качества жизни по опроснику SNOT-22 выявлена достоверная разница между пациентами 1-й и 2-й, 1-й и 3-й групп. Максимальное количество баллов получено в 3-й группе – 51 (31-66) балл, минимальное значение выявлено в 1-й группе – 30 (25-38) баллов. У пациентов второй группы общий балл опросника SNOT-22 был 43 (36-50,5) балла. Выраженность затруднения носового дыхания также достоверно отличалась между всеми группами с наименьшими значениями в 1-й группе – 0 (0-0) баллов, максимальными значениями в 3-й группе – 2 (1-3) балла. При среднетяжелом течении ПРС отмечены средние значения этого показателя – 2 (1-2) балла. Такие же закономерности выявлены относительно симптома нарушения обоняния. В 1-й группе медиана была 0 (0-0) баллов, во 2-й груп-

ТАБЛИЦА 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ПАЦИЕНТОВ С РАЗЛИЧНОЙ СТЕПЕНЬЮ ТЯЖЕСТИ ТЕЧЕНИЯ ПРС

TABLE 1. PATIENTS CHARACTERISTICS WITH DIFFERENT SEVERITY DEGREES OF CRSwNP

	Распределение показателей по группам Indicators distribution by groups		
	1-я группа Group 1 n = 34	2-я группа Group 2 n = 32	3-я группа Group 3 n = 33
SNOT-22, баллы SNOT-22, scores	30 (25-38)	43 (36,0-50,5)*	51 (31-66)*
Обоняние, баллы Smell, scores	0 (0-0)	0 (0,0-1,5)*	3 (2-3)*#
Заложенность носа, баллы Nasal congestion, scores	0 (0-0)	2 (1-2)*	2 (1-3)*#
Степень тяжести БА asthma severity degree, scores	2 (1-2)	2 (1-2)	2 (2-3)*#
АСQ, баллы ACQ, scores	1,35 (0,4-1,8)	1,45 (0,75-1,85)*	2 (1,6-2,3)*#
Длительность БА, лет Duration of asthma, years	20,5 (13-24)	16 (9-17)*	20 (10,5-28,5)
Респираторная аллергия, % Respiratory allergies, %	41,17%	43,75%	18,18%*#
Непереносимость НПВП, % NSAID intolerance, %	32,35%	34,37%	57,58%*#
Длительность ПРС, лет Duration of CRSwNP, years	18 (9-19)	11 (7,0-13,5)*	14,5 (7,5-27,0)*#

Примечание. * – достоверная разница между группой 1 и группами 2 или 3; # – достоверная разница ($p < 0,05$) между 2-й или 3-й группами. Группа 1 – пациенты с легким течением полипозного риносинусита (ПРС). Группа 2 – пациенты со средней степени тяжести ПРС. Группа 3 – пациенты с тяжелым течением ПРС.

Note. *, statistically significant difference ($p < 0.05$) between group 1 and group 2 or 3; #, statistically significant difference ($p < 0.05$) between group 2 and group 3. Group 1, patients with mild chronic rhinosinusitis with nasal polyps (CRSwNP). Group 2, patients with moderate severity of CRSwNP. Group 3, patients with severe CRSwNP.

пе – 0 (0-1,5) баллов, в 3-й группе – 3 (2-3) балла. Все группы достоверно отличались между собой.

Количество пациентов с БА в 1-й группе составило 52,94% (18 человек), во 2-й группе – 53,13% (17 человек), в 3-й группе – 75,76% (25 человек). По степени БА и баллам опросника ACQ статистически достоверные отличия обнаружены во всех группах. Минимальная степень БА (2 (1-2)) и баллы ACQ (1,35 (0,4-1,8)) выявлены в 1-й группе. В 3-й группе степень БА (2 (2-3)) и уровень ACQ (2 (1,6-2,3)) были самыми высокими. Достоверных отличий по степени БА между 1-й и 2-й группой не выявлено, однако по баллам ACQ данные достоверно отличались (табл. 2). Различия в длительности БА достоверны между 1-й (20,5 (13-24) лет) и 3-й (20 (10,5-28,5) лет) группами. С явлениями РА меньше всего пациентов выявлено в 3-й группе, их доля составила 18,18% (6 чел.). Во 2-й группе доля пациентов с

РА максимальная и равна 43,75% (14 чел.), в 1-й группе – 41,17% (14 чел.). При этом в 3-й группе при наличии РА у всех пациентов была сопутствующая аБА, в отличие от 1-й, где у 11 человек (32,35%) был только АР без аБА, и 2-й группы, в которой изолированный АР встречался в 25% случаев (8 чел.). Доля пациентов с непереносимостью НПВП максимальна в 3-й группе и равна 57,58% vs 32,35% в 1-й группе. Во 2-й группе этот показатель составил 34,37% пациентов.

По уровню провоспалительных цитокинов выявлена достоверная разница между группами (табл. 2). Минимальный уровень IL-1 β (2,74 (0,57-5,72) пг/мг) и TNF α (1,38 (0,4-2,07) пг/мг) найден в 3-й группе с разницей между 1-й и 2-й группами, в которых показатели IL-1 β также различались между собой: максимальные его значения были во 2-й группе: 5,88 (2,87-9,13) пг/мг vs 5,79 (1,56-7,10) пг/мг в 1-й группе. По коли-

ТАБЛИЦА 2. УРОВЕНЬ ЦИТОКИНОВ В ТКАНИ НОСОВЫХ ПОЛИПОВ ПРИ РАЗНЫХ СТЕПЕНЯХ ТЯЖЕСТИ ТЕЧЕНИЯ ПРС

TABLE 2. LEVEL OF CYTOKINES IN THE NASAL POLYPS TISSUE IN DIFFERENT CRSwNP SEVERITY

пг/мг pg/mg	Группы пациентов ПРС Groups of patients with CRSwNP			
	1-я группа Group 1 n = 34	2-я группа Group 2 n = 32	3-я группа Group 3 n = 33	Группа контроля Control group n = 36
Провоспалительные цитокины Proinflammatory cytokines				
IL-1 β	5,79 (1,56-7,10)	5,88 (2,87-9,13)*	2,74 (0,57-5,72)*#	0,05 (0,02-0,11)
TNF α	1,75 (0,91-3,16)	1,97 (1,28-2,93)	1,38 (0,40-2,07)*#	0,02 (0,01-0,09)
IFN γ	2,38 (1,09-3,33)	2,78 (1,78-3,64)*	1,57 (0,25-3,14)#	0,2 (0,14-0,36)
Th2-цитокины Th2 cytokines				
IL-4	2,62 (1,22-2,89)	2,50 (1,19-3,00)*	1,45 (0,66-2,85)*#	0,1 (0,06-0,14)
IL-5	1,90 (1,17-2,81)	2,22 (1,64-3,41)*	1,68 (0,28-3,39)#	0,15 (0,08-0,18)
IL-13	2,69 (1,56-7,59)	3,04 (1,70-5,00)	3,5 (1,00-25,36)	0,12 (0,09-0,13)
Семейство трансформирующих факторов роста Transforming growth factor beta superfamily				
TGF- β 1	4,75 (2,39-4,84)	5,71 (3,04-8,34)*	4,71 (3,75-8,11)	0 (0,000-0,001)
TGF- β 2	21,90 (8,46-26,72)	23,75 (10,40-25,34)*	14,41 (9,96-23,98)*#	0 (0,000-0,001)
TGF- β 3	7,59 (2,33-9,00)	5,71 (2,32-10,15)*	4,79 (4,14-6,04)*#	0 (0,000-0,001)

Примечание. * – достоверная разница между группой 1 и группами 2 или 3; # – достоверная разница ($p < 0,05$) между 2-й или 3-й группами. Группа 1 – пациенты с легким течением полипозного риносинусита (ПРС). Группа 2 – пациенты со средней степени тяжести ПРС. Группа 3 – пациенты с тяжелым течением ПРС.

Note. *, statistically significant difference ($p < 0.05$) between group 1 and group 2 or 3; #, statistically significant difference ($p < 0.05$) between group 2 and group 3. Group 1, patients with mild chronic rhinosinusitis with nasal polyps (CRSwNP). Group 2, patients with moderate severity of CRSwNP. Group 3, patients with severe CRSwNP.

честву белка $\text{TNF}\alpha$ 1-я и 2-я группа были без статистических различий. Наиболее высокие значения $\text{IFN}\gamma$ также были во 2-й группе — 2,78 (1,78–3,64) пг/мг, разницы между 1-й (2,38 (1,09–3,33) пг/мг) и 3-й группой (1,57 (0,25–3,14) пг/мг) не обнаружено. Содержание цитокинов Th-2 типа IL-4 и IL-5 также различалось в зависимости от степени тяжести течения ПРС между всеми группами. Их минимальные значения были в 3-й группе — 1,45 (0,66–2,85) пг/мг для IL-4 и 1,68 (0,28–3,39) пг/мг для IL-5. Максимальное значение IL-4 выявлено при легкой степени тяжести ПРС 2,62 (1,22–2,89) пг/мг vs 2,50 (1,19–3,0) пг/мг во 2-й группе. Концентрация IL-5, напротив, было выше во 2-й группе — 2,22 (1,64–3,41) пг/мг vs 1,90 (1,17–2,81) пг/мг в 1-й группе. По IL-13 достоверных различий между группами не найдено. Статистически значимая разница в количестве белка $\text{TGF-}\beta$ выявлена только между 1-й (4,75 (2,39–4,84) пг/мг) и 2-й (5,71 (3,04–8,34) пг/мг) группами. Остальные два фактора роста достоверно различались по своему содержанию между всеми группами. Минимальные значения отмечались в 3-й группе — 14,41 (9,96–23,98) пг/мг по количеству $\text{TGF-}\beta$ и 4,79 (4,14–6,04) пг/мг по количеству $\text{TGF-}\beta$. Высокий уровень $\text{TGF-}\beta$ был во 2-й группе — 23,75 (10,40–25,34) пг/мг vs 21,90 (8,46–26,72) пг/мг в 1-й группе. Содержание $\text{TGF-}\beta$, напротив, было выше в 1-й группе — 7,59 (2,33–9,00) пг/мг по сравнению со второй группой — 5,71 (2,32–10,15) пг/мг.

Содержание белков всех цитокинов во всех группах было значительно выше по сравнению с группой контроля.

Обсуждение

Актуальность исследования патогенетических механизмов полипозного риносинусита определяется широкой распространенностью, социальной значимостью и невысокой эффективностью лечения этого заболевания [3, 7]. Биомаркеры, которые могут позволить прогнозировать рецидив ПРС после первой операции, независимо от клинической выраженности заболевания, смогут определять тех пациентов, кто будет являться кандидатом для назначения биологической терапии. Продолжительное время хирургическое лечение ПРС считалось основным стандартом для этих пациентов. Применялись различные методики, от минимально инвазивной хирургии до операции назализации и reboot подходов. Но при этом простое удаление патологически-измененной ткани не воздействует на звенья развития патологического процесса, соответственно — не предотвращает его рецидив [16]. Это послужило активному поиску принципиально новых мето-

дов лечения ПРС с перспективой подбора персонализированной таргетной терапии [1, 2, 12, 15], в связи с чем крайне необходимо находить объективные биомаркеры для прогнозирования послеоперационного рецидива этого заболевания.

При этом нужно разделять понятия обострения заболевания, которое определяется как временное ухудшение интенсивности симптомов с возвращением к исходному уровню после лечения воспалительного процесса. Рецидивом является повторный рост полипов за счет снижения медикаментозного контроля патологического процесса. Золотым стандартом противорецидивного лечения ПРС являются топические глюкокортикостероиды в терапевтической дозе мометазона фуората 400 мкг/сутки и максимальной дозе 800 мкг/сутки эндоназально. При наличии сопутствующей респираторной аллергии или БА лечение проводится совместно с аллергологом-иммунологом или пульмонологом, поскольку доказано взаимовлияние этих процессов друг на друга, что сопровождается разными характеристиками цитокинового профиля в ткани носовых полипов [10]. Нами был разработан и введен в практику лечебно-диагностический алгоритм ведения пациентов с разными клиническими фенотипами ПРС [9], на основании которого проводилось лечение, которое корректировалось в зависимости от медикаментозного контроля ПРС во время плановых повторных осмотров пациентов 1 раз в 3 месяца в течение 5 лет. На I степени находятся пациенты вне обострения ПРС, лечение заключается в промывании полости носа изотоническим раствором. Больным с сопутствующей РА параллельно аллергологом-иммунологом рассматривалась возможность проведения курсов аллергенспецифической иммунотерапии (АСИТ) с I степени лечения ПРС, а при обострении АР назначались антигистаминные препараты второго поколения. При II степени проводилась базовая терапия интраназальными глюкокортикостероидами мометазона фуората 400 мкг/сут. На III степени их доза увеличивалась до 800 мкг/сут, а пациентам с II–IV фенотипами ПРС назначался ингибитор лейкотриеновых рецепторов монтелукаст 10 мг/сут однократно. IV степень терапии показана больным с неконтролируемым ростом полипов. Таким пациентам проводился короткий курс системных глюкокортикостероидов, повторное хирургическое лечение или терапия биологическими препаратами [9].

Через 5 лет наблюдения по клиническим характеристикам в 1-й группе мы отметили, что легкое течение ПРС коррелирует с минимальной выраженностью основных симптомов ПРС в виде заложенности носа, нарушения обоняния.

Также наблюдалась наименьшее снижение уровня качества жизни пациентов согласно опроснику SNOT-22. Больные с БА, вошедшие в данную группу, имели лучший уровень медикаментозного контроля этого заболевания. Продолжительность астмы этих пациентов была достоверно ниже по сравнению с пациентами 3-й группы. Цитокиновый профиль полипозной ткани отличался самой высокой концентрацией IL-4, средними значениями провоспалительных белков IL-1 β , TNF α , IFN γ и минимальным значением TGF- β 1.

Во 2-й группе при течении ПРС средней степени тяжести мы отметили более выраженные по сравнению с 1-й группой нарушения обоняния, заложенность носа и ухудшение качества жизни больных по опроснику SNOT-22. Уровень медикаментозного контроля БА, оценивавшийся в баллах по опроснику ACQ-7, также был достоверно ниже, чем у пациентов 1-й группы. Выявлена максимальная концентрация белков всех трех провоспалительных цитокинов (IFN γ , IL-1 β , TNF α), IL-5 и факторов роста TGF- β 1 и TGF- β 2.

В 3-й группе с плохим медикаментозным контролем ПРС было выражено нарушение качества жизни согласно максимальным баллам SNOT-22, наибольшее затруднения носового дыхания и снижение обоняния. Длительность бронхиальной астмы оказалась достоверно выше, чем при течении ПРС в легкой форме. Была наибольшая степень БА среди всех групп, а уровень ее медикаментозного контроля по ACQ-7 был достоверно ниже по сравнению с 1-й группой. При иммунологическом анализе ткани носовых полипов в этой группе пациентов выявлен минимальный уровень всех противовоспалительных цитокинов, цитокинов Th-2 воспаления IL-4 и IL-5, факторов роста TGF- β 2 и TGF- β 3.

Таким образом, при разной степени медикаментозного контроля наблюдался разный цитокиновый профиль в ткани носовых полипов. Поскольку у большей части пациентов после операции наблюдается повторный рост полипов, чрезвычайно важен метод раннего прогнозирования рецидива ПРС, который имеет большое клиническое значение. При хорошем медикаментозном контроле у 1-й и 2-й групп пациентов была продемонстрирована эффективность длительного послеоперационного применения спреев топических стероидов, которые остаются основной терапевтической стратегией для этих пациентов. Еще один из аспектов состоит в том, что перед началом лечения следует провести фенотипирование пациента для подбора правильной схемы лечения [5]. При тяжелом течении ПРС-внедрение в практику применения моноклональных антител к ключевым молекулам, способствующим

прогрессированию патологического процесса, увеличит долю медикаментозного контроля при частых рецидивах этого заболевания [4, 5].

Выводы

1. Через 5 лет наблюдения по клиническим характеристикам в 1-й группе с легким течением ПРС наблюдалась минимальная выраженность основных симптомов ПРС в виде заложенности носа, нарушения обоняния, наименьшее снижение уровня качества жизни пациентов согласно опроснику SNOT-22. Больные с БА, вошедшие в данную группу, имели лучший уровень медикаментозного контроля этого заболевания, продолжительность астмы этих пациентов была достоверно ниже по сравнению с пациентами 3-й группы. Цитокиновый профиль полипозной ткани отличался самой высокой концентрацией IL-4, средними значениями провоспалительных белков IL-1 β , TNF α , IFN γ и минимальным значением TGF- β 1.

2. Во 2-й группе при ПРС средней степени тяжести мы отметили более выраженные по сравнению с 1-й группой нарушения обоняния, заложенность носа и ухудшение качества жизни больных по опроснику SNOT-22. Уровень медикаментозного контроля БА, оценивавшийся в баллах по опроснику ACQ-7, также был достоверно ниже, чем у пациентов 1-й группы. Выявлена максимальная концентрация белков всех трех провоспалительных цитокинов (IFN γ , IL-1 β , TNF α), IL-5 и факторов роста TGF- β 1 и TGF- β 2.

3. В 3-й группе с плохим медикаментозным контролем ПРС были получены максимальные баллы SNOT-22, наибольшая выраженность затруднения носового дыхания и снижения обоняния. Длительность бронхиальной астмы оказалась достоверно выше, чем при течении ПРС в легкой форме. Была наибольшая степень БА среди всех групп, с достоверно низким уровнем ее медикаментозного контроля по ACQ-7 по сравнению с 1-й группой. При иммунологическом анализе ткани носовых полипов в этой группе пациентов выявлен минимальный уровень всех провоспалительных цитокинов (IFN γ , IL-1 β , TNF α), цитокинов Th-2 воспаления IL-4 и IL-5, факторов роста TGF- β 2 и TGF- β 3.

4. Лечение пациентов в зависимости от клинических фенотипов ПРС по наличию или отсутствию коморбидной РА или БА позволяет улучшить медикаментозный контроль и снизить рецидив этого заболевания.

Список литературы / References

1. Ащина Л.А., Баранова Н.И., Молотиллов Б.А., Шкурова Н.А. Анализ функциональной активности нейтрофилов у больных хроническим полипозным риносинуситом после лечения препаратом интерферона гамма // Клиническая лабораторная диагностика, 2022. Т. 67, № 6. С. 339-344. [Aschina L.A., Baranova N.I., Molotilov B.A., Shkurova N.A. Analysis of neutrophil functional activity in patients with chronic polyposis rhinosinusitis after treatment with interferon gamma. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika = Russian Clinical Laboratory Diagnostics*, 2022, Vol. 67, no. 6, pp. 339-344. (In Russ.)]
2. Зурочка А.В., Семенов М.В., Зурочка В.А., Хайдуков С.В. Изучение параметров иммунной системы и уровней Т-регуляторных клеток у пациентов, страдающих полипозным риносинуситом // Российский иммунологический журнал, 2011. Т. 5, № 14. С. 280-285. [Zurochka A.V., Semenov M.V., Zurochka V.A., Hajdukov, S.V. Study of immune system parameters and T-regulatory cell levels in patients suffering from polypous rhinosinusitis. *Rossiyskiy immunologicheskii zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2011, Vol. 5, no. 14, pp. 280-285. (In Russ.)]
3. Коркмазов М.Ю., Казачков Е.Л., Ленгина М.А., Дубинец И.Д., Коркмазов А.М. Причинно-следственные факторы развития полипозного риносинусита // Российская ринология, 2023. Т. 31, № 2. С. 124-130. [Korkmazov M.Y., Kazachkov E.L., Lengina M.A., Dubinets I.D., Korkmazov A.M. Cause-effect factors of rhinosinusitis poliposa development. *Rossiyskaya rinologiya = Russian Rhinology*, 2023, Vol. 31, no. 2, pp. 124-130. (In Russ.)]
4. Коркмазов М.Ю., Ленгина М.А., Дубинец И.Д., Кравченко А.Ю., Клепиков С.В. Некоторые иммунологические аспекты таргетной терапии полипозного риносинусита // Российский иммунологический журнал, 2023. Т. 26, № 3. С. 301-306. [Korkmazov M.Yu., Lengina M.A., Dubinets I.D., Kravchenko A.Yu., Klepikov S.V. Some immunological aspects of targeted therapy in polypous rhinosinusitis. *Rossiyskiy immunologicheskii zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2023, Vol. 26, no. 3, pp. 301-306. (In Russ.)] doi: 10.46235/1028-7221-8955-SIA.
5. Коркмазов М.Ю., Ленгина М.А., Коркмазов А.М., Кравченко А.Ю. Влияние постковидного синдрома на качество жизни пациентов с аллергическим ринитом и эозинофильным фенотипом хронического полипозного риносинусита // Российский медицинский журнал, 2023. Т. 29, № 4. С. 277-290. [Korkmazov M.Yu., Lengina M.A., Korkmazov A.M., Kravchenko A.Yu. Effect of post-COVID syndrome on the quality of life of patients with allergic rhinitis and eosinophilic phenotype of chronic polyposis rhinosinusitis. *Rossiyskiy meditsinskiy zhurnal = Medical Journal of the Russian Federation*, 2023, Vol. 29, no. 4, pp. 277-290. (In Russ.)]
6. Крысанов И.С., Крысанова В.С., Ермакова В.Ю. Социально-экономическое бремя полипозного риносинусита в сочетании с бронхиальной астмой и влияние на него дупилумаба // Качественная клиническая практика, 2021. № 3. С. 16-30. [Krysanov I.S., Krysanova V.S., Ermakova V.Yu. A social-economic burden of rhinosinusitis with nasal polyps with comorbid asthma and influence of dupilumab. *Kachestvennaya klinicheskaya praktika = Good Clinical Practice*, 2021, no. 3, pp. 16-30. (In Russ.)]
7. Павлуш Д.Г., Гилицанов Е.А., Тютюнькова А.И., Оликий В.Н., Трофимова А.В., Севостьянова И.С., Горбач Н.А., Мизанова В.Ж. Активность нейрокининовой системы в слизистой оболочке полости носа при полипозном риносинусите // Российская оториноларингология, 2021. Т. 20, № 4. С. 33-42. [Pavlush D.G., Gilifanov E.A., Tyutyunkova A.I., Olikyan V.N., Trofimova A.V., Sevostyanova I.S., Gorbach N.A., Mizanova V.Zh. Neurokinin system activity of nasal cavity mucosa in rhinosinusitis with nasal polyps. *Rossiiskaya otorinolaringologiya = Russian Otorhinolaryngology*, 2021, Vol. 20, no. 4, pp. 33-42. (In Russ.)]
8. Савлевич Е.Л., Гаганов Л.В., Егоров В.И., Курбачева О.М., Митрофанова Е.С., Пелищенко Т.Г., Любимова Е.В. Применение эозинофильно-нейтрофильного индекса ЭНИ и показателя степени интенсивности воспалительной инфильтрации для оценки воспалительного процесса при полипозном риносинусите // Российская оториноларингология, 2022. Т. 21, № 5. С. 70-81. [Savlevich E.L., Gaganov L.V., Egorov V.I., Kurbacheva O.M., Mitrofanova E.S., Pelishenko T.G., Lyubimova E.V. Application of eosinophil-neutrophil index eni and degree of inflammatory infiltration to assess the inflammatory process in polypous rhinosinusitis. *Rossiiskaya otorinolaringologiya = Russian Otorhinolaryngology*, 2022, Vol. 21, no. 5, pp. 70-81. (In Russ.)]
9. Савлевич Е.Л., Дынева М.Е., Гаганов Л.Е., Егоров В.И., Герасимов А.Н., Курбачева О.М. Лечебно-диагностический алгоритм при разных фенотипах полипозного риносинусита // Российский аллергологический журнал, 2019. Т. 16, № 2. С. 50-60. [Savlevich E.L., Dyneva M.E., Gaganov L.E., Egorov V.I., Gerasimov A.N., Kurbacheva O.M. Diagnostic and treatment algorithm for different phenotypes of chronic rhinosinusitis with nasal polyps. *Rossiyskiy allergologicheskii zhurnal = Russian Allergology Journal*, 2019, Vol. 16, no. 2, pp. 50-60. (In Russ.)]
10. Савлевич Е.Л., Зурочка А.В., Курбачева О.М., Егоров В.И., Шиловский И.П., Митрофанова Е.С., Любимова Е.В. Плейоморфизм цитокинового профиля в ткани полипов в зависимости от фенотипа полипоз-

ного риносинусита // Вестник оториноларингологии, 2023. Т. 88, № 1. С. 50-56. [Savlevich E.L., Zurochka A.V., Kurbacheva O.M., Egorov V.I., Shilovskiy I.P., Mitrofanova E.S., Lyubimova E.V. Pleiomorphism of the cytokine profile in nasal polyp tissue depending on the phenotype of chronic rhinosinusitis with nasal polyps. *Vestnik otorinolaringologii = Bulletin of Otorhinolaryngology*, 2023, Vol. 88, no. 1, pp. 50-56. (In Russ.)]

11. Савлевич Е.Л., Зурочка А.В., Курбачева О.М., Егоров В.И., Гаганов Л.В., Любимова Е.В. Трансформирующие факторы роста TGF- β 1, TGF- β 2 и TGF- β 3 в ткани носовых полипов при разных фенотипах полипозного риносинусита // Медицинская иммунология, 2022. Т. 24, № 1. С. 147-156. [Savlevich E.L., Zurochka A.V., Kurbacheva O.M., Egorov V.I., Gaganov L.E., Lyubimova E.V. Transforming growth factors TGF- β 1, TGF- β 2 and TGF- β 3 in the tissue of nasal polyps in different phenotypes of chronic rhinosinusitis with nasal polyps. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2022, Vol. 24, no. 1, pp. 147-156. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-TGF-2365.

12. Савлевич Е.Л., Козлов В.С., Курбачева О.М. Современные тенденции диагностического поиска и терапии полипозного риносинусита // Российская ринология, 2018. Т. 26, № 2. С. 41-47. [Savlevich E.L., Kozlov V.S., Kurbacheva O.M. The modern trends in the diagnostic search for and the treatment of chronic rhinosinusitis with nasal polyps. *Rossiyskaya rinologiya = Russian Rhinology*, 2018, Vol. 26, no. 2, pp. 41-47. (In Russ.)]

13. Свистушкин В.М., Чичкова Н.В., Пшонкина Д.М. Эозинофилия как предиктор раннего рецидива полипозного риносинусита после хирургического лечения // Consilium Medicum, 2019. Т. 21, № 11. С. 34-37. [Svistushkin V.M., Chichkova N.V., Pshonkina D.M. Eosinophilia as a predictor of recurrent course polypoid rhinosinusitis after surgical treatment. *Consilium Medicum = Consilium Medicum*, 2019, Vol. 21, no. 11, pp. 34-37. (In Russ.)]

14. Свистушкин В.М., Чичкова Н.В., Пшонкина Д.М. Периостин как перспективный биологический маркер раннего рецидива полипозного риносинусита после хирургического лечения // Медицинский совет, 2021. № 6. С. 113-119. [Svistushkin V.M., Chichkova N.V., Pshonkina D.M. Periostin as a promising biological marker of early recurrence of polyposis rhinosinusitis after surgical treatment. *Meditsinskiy sovet = Medical Council*, 2021, no. 6, pp. 113-119. (In Russ.)]

15. Семенов М.В., Зурочка А.В., Зурочка В.А. Изменение количества Т-регуляторных клеток у пациентов, страдающих полипозным риносинуситом на фоне лечения назальными топическими глюкокортикостероидами // Медицинская иммунология, 2012. Т. 14, № 3. С. 233-238. [Semenov M.V., Zurochka A.V., Zurochka V.A. Naming the number of T-regulatory cells in patients suffering from polypous rhinosinusitis during treatment with nasal topical glucocorticosteroids. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2012, Vol. 14, no. 3, pp. 233-238. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2012-3-233-238.

16. Янов Ю.К., Егоров В.И., Савлевич Е.Л., Пелишенко Т.Г., Кириченко И.М. Целесообразность радикальных методов эндоскопических хирургических вмешательств на околоносовых пазухах при полипозном риносинусите // Российская оториноларингология, 2023. Т. 22, № 1. С. 63-73. [Yanov Yu.K., Egorov V.I., Savlevich E.L., Pelishenko T.G., Kirichenko I.M. Expediency of radical methods of endoscopic procedures on paranasal sinuses in chronic rhinosinusitis with nasal polyps. *Rossiiskaya otorinolaringologiya = Russian Otorhinolaryngology*, 2023, Vol. 22, no. 1, pp. 63-73. (In Russ.)]

17. Brescia G., Zanolini C., Parrino D., Barion U., Marioni G. Nasal polyposis pathophysiology: endotype and phenotype open issues. *Am. J. Otolaryngol.*, 2018, Vol. 39, no. 4, pp. 441-444.

18. Eweiss A., Dogheim Y., Hassab M., Tayel H., Hammad Z. VCAM-1 and eosinophilia in diffuse sino-nasal polyps. *Eur. Arch. Otorhinolaryngol.*, 2009, Vol. 266, no. 3, pp. 377-383.

19. 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 Gabor 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., Elfouk A., Eloy P.H., Farrokhi S., Felisati G., Ferrari M.D., Fishchuk R., Grayson W., Goncalves P.M., Grdnic 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., Thanaviratananich S., Tran T., Urbancic J., Valiulius 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., Zabolotniy D., Zsolt B., Zwetsloot C.P. European position paper on rhinosinusitis and nasal polyps. *Rhinology*, 2020, Vol. 58. 464 p.

20. van Zele T., Holtappels G., Gevaert P., Bachert C. Differences in initial immunoprofiles between recurrent and nonrecurrent chronic rhinosinusitis with nasal polyps. *Am. J. Rhinol. Allergy*, 2014, Vol. 28, no. 3, pp. 192-198.

21. Vlamincx S., Vauterin T., Hellings P.W., Jorissen M., Acke F., van Cauwenberge P., Bachert C., Gevaert P. The importance of local eosinophilia in the surgical outcome of chronic rhinosinusitis: a 3-year prospective observational study. *Am. J. Rhinol. Allergy*, 2014, Vol. 28, no. 3, pp. 260-264.

22. Wang G., Zheng H., Chen X., Zheng J., Zhan J., Li R., Qi Y., Ye Y., Zeng M., Wei X. Exploration of Predictive Biomarkers for Postoperative Recurrence in Chronic Rhinosinusitis with Nasal Polyps Based on Serum Multiple-Cytokine Profiling. *Mediators Inflamm.*, 2022, Vol. 2022, 1061658. doi: 10.1155/2022/1061658.

23. Yamada T., Miyabe Y., Ueki S., Fujieda S., Tokunaga T., Sakashita M., Kato Y., Ninomiya T., Kawasaki Y., Suzuki S., Saito H. Eotaxin-3 as a plasma biomarker for mucosal eosinophil infiltration in chronic rhinosinusitis. *Front. Immunol.*, 2019, Vol. 10, 74. doi: 10.3389/fimmu.2019.00074.

24. Zhang F., Xu Z., He X., Sun Y., Zhao C., Zhang J. Increased B cell-activating factor expression is associated with postoperative recurrence of chronic rhinosinusitis with nasal polyps. *Mediators Inflamm.*, 2022, Vol. 2022, 7338692. doi: 10.1155/2022/7338692.

Авторы:

Савлевич Е.Л. — д.м.н., доцент кафедры оториноларингологии ФГБУ ДПО «Центральная государственная медицинская академия» Управления делами Президента Российской Федерации; старший научный сотрудник ГБУЗ МО «Московский областной научно-исследовательский клинический институт имени М.Ф. Владимирского», Москва, Россия

Любимова Е.В. — врач-оториноларинголог ООО «ЛОП клиника», г. Екатеринбург, Россия

Зурочка А.В. — д.м.н., профессор, ведущий научный сотрудник лаборатории иммунологии воспаления ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения Российской академии наук, г. Екатеринбург; заведующий лабораторией иммунобиотехнологии Российско-Китайского Центра ФГАОУ ВО «Южно-Уральский государственный университет» (национальный исследовательский университет), г. Челябинск, Россия

Authors:

Savlevich E.L., PhD, MD (Medicine), Associate Professor, Department of Otorhinolaryngology, Central State Medical Academy of Department for Presidential Affairs of the Russian Federation; Senior Research Associate, Moscow M. Vladimirovsky Regional Research Clinical Institute, Moscow, Russian Federation

Lyubimova E.V., ORL Doctor, LLC "ORL Clinic", Yekaterinburg, Russian Federation

Zurochka A.V., PhD, MD (Medicine), Professor, Leading Research Associate, Laboratory of Inflammatory Immunology, Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Yekaterinburg; Head, Laboratory of Immunobiotechnology, South Ural State University (National Research University), Chelyabinsk, Russian Federation

Митрофанова Е.С. — аспирант, кафедра клинической иммунологии и аллергологии, Академия постдипломного образования ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр специализированных видов медицинской помощи и медицинских технологий Федерального медико-биологического агентства», Москва, Россия

Шиловский И.П. — д.б.н., заместитель директора по науке и инновациям, заведующий лабораторией противовирусного иммунитета ФГБУ «Государственный научный центр «Институт иммунологии»» Федерального медико-биологического агентства России, Москва, Россия

Mitrofanova E.S., Postgraduate Student, Department of Clinical Immunology and Allergology, Academy of Postgraduate Education, Federal Research and Clinical Center of Specialized Medical Care and Medical Technologies, Federal Medical and Biological Agency, Russian Federation

Shilovskiy I.P., PhD, MD (Biology), Deputy Director for Research and Innovations, Head, Antiviral Immunity Laboratory, State Research Center "Institute of Immunology", Federal Medical and Biological Agency, Moscow, Russian Federation

Поступила 25.09.2023
Отправлена на доработку 28.09.2023
Принята к печати 05.10.2023

Received 25.09.2023
Revision received 28.09.2023
Accepted 05.10.2023

ИНТЕГРАЦИОННЫЙ ДИАГНОСТИЧЕСКИЙ КРИТЕРИЙ, ОЦЕНИВАЮЩИЙ ТЯЖЕСТЬ ТЕЧЕНИЯ COVID-19 И РИСК ВОЗНИКНОВЕНИЯ ПОСТКОВИДНОГО СИНДРОМА

Нестерова И.В.^{1,2}, Атажахова М.Г.¹, Матушкина В.А.¹,
Тетерин Ю.В.¹, Городин В.Н.¹, Чудилова Г.А.¹

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

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

Резюме. Патофизиология тяжелой формы COVID-19 характеризуется изменением количества, фенотипа и функций нейтрофильных гранулоцитов (НГ). Среди эффекторных противовирусных механизмов НГ одними из наиболее важных являются нейтрофильные внеклеточные ловушки (NETs), но чрезмерное их образование усугубляет воспаление при остром респираторном дистресс-синдроме и способствует тромбозу микрососудов. Их обнаружение и количественная оценка могут иметь важное значение при различных формах течения COVID-19 для определения корреляции с исходом заболевания, оценки риска развития постковидного синдрома и, возможно, мониторинга будущей целевой терапии.

Цель исследования — разработать новый диагностический интеграционный критерий, позволяющий оценить тяжесть течения COVID-19 и риск развития осложнений в постковидном периоде, в том числе постковидного синдрома в периферической крови.

Исследованы образцы периферической крови (ПК) 31 пациента с острым течением COVID-19 (среднетяжелого течения (n = 15) и тяжелого течения (n = 16)), 52 пациентов, выписанных из стационара после лечения COVID-19 тяжелой степени тяжести, в сроки от 30 до 60 дней, имеющие постковидный синдром (ПКС) и 100 условно здоровых добровольцев. Оценивались показатели общеклинического анализа крови (MicroCC-20Plus), в мазках ПК проводился подсчет лейкоцитарной формулы с учетом количества образованных NET и НГ, ушедших в патологический апоптоз. На основе полученных результатов рассчитывался интеграционный диагностический критерий по формуле:

$$\text{ИДК} = \frac{\% \text{ неизменных НГ}}{\% \text{ NET} + \% \text{ НГ в апоптозе}}$$

Показано снижение ИДК при среднетяжелом течении заболевания в 8,5 раза ($p < 0,05$), а при тяжелом течении — в 30 раз ($p < 0,05$), по сравнению со значениями в группе условно здоровых лиц. Также установлено, что у 88,5% пациентов с ПКС, перенесших SARS-CoV-2, в ПК не выявлено морфологически патологических измененных НГ. В то же время у 11,5% пациентов с ПКС отмечено по-

Адрес для переписки:

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

Address for correspondence:

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

Образец цитирования:

И.В. Нестерова, М.Г. Атажахова, В.А. Матушкина,
Ю.В. Тетерин, В.Н. Городин, Г.А. Чудилова
«Интеграционный диагностический критерий,
оценивающий тяжесть течения COVID-19
и риск возникновения постковидного синдрома»
// Медицинская иммунология, 2024. Т. 26, № 3.
С. 545-554. doi: 10.15789/1563-0625-IDC-2594

© Нестерова И.В. и соавт., 2024

Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

I.V. Nesterova, M.G. Atazhakhova, V.A. Matushkina,
Yu.V. Teterin, V.N. Gorodina, G.A. Chudilova "Integrative
diagnostic criterion for evaluation of COVID-19 severity and
the risk of post-COVID syndrome", Medical Immunology
(Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2024, Vol. 26, no. 3,
pp. 545-554.
doi: 10.15789/1563-0625-IDC-2594

© Nesterova I.V. et al., 2024

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

DOI: 10.15789/1563-0625-IDC-2594

явление NETs и клеток с патологическим апоптозом, при этом ИДК НГ-ПКС был в 8 раз меньше ($p < 0,05$), чем в группе сравнения и не отличался от показателей пациентов со среднетяжелым течением COVID-19 ($p > 0,05$), что диктует необходимость дальнейшего диспансерного наблюдения таких пациентов.

Полученные в настоящем исследовании данные свидетельствуют о том, что разработанный интегративный диагностический критерий позволяет оценить как тяжесть течения COVID-19 в острый период, так и риск возникновения постковидного синдрома. Следует подчеркнуть, что выявленные при COVID-19 характерные изменения НГ можно легко идентифицировать в ПК и последовательно отслеживать по расчетному интегральному диагностическому критерию. Значительное снижение ИДК свидетельствует о сохраняющейся гиперактивации НГ и необходимости проведения таргетной иммунотерапии, направленной на модулирование дисфункций НГ.

Ключевые слова: COVID-19, постковидный синдром, интегральный диагностический критерий, нейтрофильные гранулоциты, NET, апоптоз

INTEGRATIVE DIAGNOSTIC CRITERION FOR EVALUATION OF COVID-19 SEVERITY AND THE RISK OF POST-COVID SYNDROME

Nesterova I.V.^{a,b}, Atazhakhova M.G.^a, Matushkina V.A.^a, Teterin Yu.V.^a, Gorodina V.N.^a, Chudilova G.A.^a

^a Kuban State Medical University, Krasnodar, Russian Federation

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

Abstract. Pathophysiology of severe COVID-19 is characterized by changes in the number, phenotype, and function of neutrophil granulocytes (NG). Among the effector antiviral mechanisms of NG, the neutrophil extracellular traps (NETs) are among the most important features. However, their excessive formation exacerbates inflammation in acute respiratory distress syndrome and contributes to microvascular thrombosis. Their detection and counting may be important in severity grading of COVID-19, for determining correlations with clinical outcome, assessing the risk of developing post-COVID syndrome, and, possibly, for monitoring future targeted therapy. Purpose of our study was to develop a new diagnostic integrative criterion to assess the severity of COVID-19 and the risk of complications in the post-COVID period, including post-COVID signs in peripheral blood.

Peripheral blood (PB) samples were studied from 31 patients with acute COVID-19 of moderate ($n = 15$) and severe degrees ($n = 16$). Moreover, we observed 52 patients discharged from the hospital after severe COVID-19, with diagnosed post-COVID syndrome (PCS) over the period of 30 to 60 days, and 100 healthy volunteers. The parameters of routine blood counts (MicroCC-20Plus) were evaluated, the leukocyte formula was calculated in PC smears, taking into account the number of formed NETs, and NGs entering pathological apoptosis. Based on the obtained results, an integral diagnostic criterion was calculated using the formula:

$$\text{IDK} = \frac{\% \text{ unchanged NG}}{\% \text{ NET} + \% \text{ NG in apoptosis}}$$

A 8.5-fold decrease in IDK index ($p < 0.05$) was shown in the cases of moderate-severity course of the disease, and a 30-fold drop was seen in severe cases ($p < 0.05$) compared with appropriate values in the group of healthy individuals. It was also found that, in 88.5% of patients with PCS after the SARS-CoV-2 infection, no morphologically altered NG were detectable in PB samples. At the same time, in 11.5% of patients with PCS, we found NETs and cells with pathological apoptosis, whereas IDC of NG-PCS was 8 times less than in the comparison group, and did not differ from the parameters of patients with moderate COVID-19 ($p > 0.05$) thus requiring further dispensary observation of such patients.

The data obtained in this study indicate that the developed integrative diagnostic criterion allows us to assess both the severity of COVID-19 over acute period, and the risk of post-COVID syndrome. It should be emphasized that the characteristic changes in NG detected in COVID-19 may be readily identified in PB and consistently monitored by the proposed integral diagnostic criterion. A significant decrease in IDC indicates the persisting hyper-activation of NG and a need for targeted immunotherapy aimed at modulating the NG dysfunction.

Keywords: COVID-19, post-COVID syndrome, integral diagnostic criterion, neutrophil granulocytes, NET, apoptosis

Введение

Иммунологический фенотип COVID-19 характеризуется истощением лимфоцитов и повышенным числом нейтрофильных гранулоцитов (НГ), что необычно для вирусной инфекции [19]. При этом установлено, что соотношение НГ к лимфоцитам в периферической крови (ПК) пациентов с COVID-19 коррелирует с тяжестью заболевания и высокой экспрессией связанных с НГ цитокинов IL-8 и IL-6 в сыворотке крови, а нейтрофилия была описана как показатель тяжести респираторных симптомов и предиктор неблагоприятного исхода [11]. Патофизиология тяжелой формы COVID-19 характеризуется изменением количества морфологического фенотипа и функциональности НГ [18].

Наиболее важным среди эффекторных механизмов НГ при вирусных заболеваниях являются нейтрофильные внеклеточные ловушки (NET) [4, 8]. NET представляют собой сети внеклеточных волокон, состоящих из деконденсированного хроматина ядер НГ, содержащих в себе гистоны, белки цитоскелета, ферменты гранулярного происхождения: эластазу, миелопероксидазу (МПО), кателицидины, кальпротектин и α -дефенсин [15, 29]. Процесс образования NET НГ, называемый NETosis, широко изучен. Первым этапом NETosis при вирусных инфекциях является клеточная активация через Toll-подобные рецепторы TLR4, TLR7 и TLR8 [22, 29]. Впоследствии образуются активные формы кислорода (ROS), что приводит к активации протеинаргиназы деиминазы-4 (PAD4), которая отвечает за деконденсацию хроматина [13]. Эластаза НГ (NE), белок гранул, вызывает разрушение ядерной мембраны НГ, в то время как белок гранулы гасдермин D способствует образованию пор в клеточной мембране и опосредует высвобождение NET во внеклеточное пространство [5].

NET действительно играют существенную роль в элиминации вируса, но чрезмерная продукция NET усугубляет воспаление при остром респираторном дистресс-синдроме (ОРДС) и способствует тромбозу микрососудов [10]. Это потенциально связано с чрезмерной активацией пути стимулятора генов интерферона (STING) через циклическую GMP-AMP-синтазу (сGAS) в фагосомах и с самой инфекцией SARS-CoV-2 через ангиотензинпревращающий фермент 2 (ACE2) [4, 6]. За период пандемии короновирусной инфекции было убедительно продемонстрировано, что усиленное образование NET коррелирует с тяжестью протекания воспалительного процесса [6, 37].

Широкое распространение ACE2 рецепторов и прежде всего на альвеолоцитах II типа, эндотелиоцитах сосудов и клетках проксимальных канальцев почек [37] объясняет системность поражения организма вирусом SARS-CoV-2 [4]. Цитопатическое действие SARS-CoV-2 на данные клетки приводит к их повреждению с высвобождением паракринных факторов с последующим привлечением в места деструкции тканей макрофагов и НГ. Образующиеся в этих местах NET, благодаря своему богатому арсеналу катионных белков и ферментов, вызывают повреждение соседних клеток [25] с еще большим привлечением в очаг воспаления НГ. Действуя на эндотелиоциты, SARS-CoV-2 приводит к развитию эндотелиальной дисфункции и провоцирует активацию коагуляционного гемостаза с развитием имунотромбозов и ДВС синдрома [1, 2, 17, 21]. Дисфункцию эндотелия и развитие имунотромбозов усиливает SARS-CoV-2-индуцированный цитокиновый шторм [24, 28]. Подобная цепь событий приводит к развитию острого респираторного дистресс-синдрома [7].

Избыточное образование NET подтверждается данными аутопсии, которая демонстрирует усиленную инфильтрацию легочной ткани НГ и конгломератами, состоящими из NET и фибрина [3, 9, 32]. Было также отмечено, по данным компьютерной томографии, что нейтрофильный лейкоцитоз и усиленное образование NET коррелируют с высоким процентом поражения ткани легкого [33]. Важно отметить, что SARS-CoV-2 может напрямую индуцировать высвобождение NET «здоровыми» НГ и, что зависит от оси ACE2-сериновая протеаза, репликации вируса и передачи сигналов PAD-4. Наконец NET высвобождаемые активированными SARS-CoV-2 НГ, способствуют апоптозу эпителия легких. Эти результаты описывают новые клеточные и молекулярные механизмы, участвующие в образовании сетей при инфекции SARS-CoV-2, и их пагубную роль в патофизиологии COVID-19 [30].

В условиях тяжелого течения COVID-19, когда считается, что активность тканевых НГ чрезвычайно высока, вполне вероятно, что активированные НГ постоянно циркулируют в ПК [11]. Их обнаружение и количественная оценка могут иметь важное значение при COVID-19 для определения корреляции с исходом заболевания, улучшения нашего понимания патофизиологии заболевания и, возможно, мониторинга будущей целевой терапии.

Описан метод обнаружения активированных НГ в ПК и подтверждена его клинико-диагностическая ценность с использованием флуоресцентной проточной цитометрии на гематологи-

ческом анализаторе Sysmex™ XN-9100 (Япония). Эта сложная технология предлагает в дополнение к оценке общего анализа крови, ядерных эритроцитов и незрелых гранулоцитов набор гематологических параметров воспаления, которые обеспечивают улучшенную дифференциацию подгрупп НГ на основе прямого и бокового светорассеяния, а также содержания РНК, оценить статус активации НГ [35].

Учитывая вышесказанное, существует необходимость в новых и доступных методах определения и оценки активации НГ у пациентов с COVID-19.

Цель исследования — разработать новый диагностический интеграционный критерий, позволяющий оценить тяжесть течения COVID-19 и риск развития осложнений в постковидном периоде, в том числе постковидного синдрома в периферической крови.

Материалы и методы

В исследование были включены: пациенты, поступившие в стационар с острым течением COVID-19 ($n = 31$) на 9-й (6; 14) день от начала заболевания и появления симптомов коронавирусной инфекции, в возрасте 61 (57; 71) года, обоего пола (58% мужчины, 42% женщины): группа 1 — 15 пациентов со среднетяжелым течением заболевания, группа исследования 2 — 16 пациентов с тяжелым течением заболевания; 52 пациента, выписанных из стационара после лечения COVID-19 тяжелой степени тяжести, в сроки от 30 до 60 дней, имеющие постковидный синдром (ПКС) с широким спектром клинических проявлений — группа исследования 3. Группу сравнения составили 100 условно здоровых добровольцев соответствующего возраста и пола. Исследовано 183 образца периферической крови (ПК), оценивались показатели общеклинического анализа крови на гематологическом анализаторе MicroCC-20Plus. Параллельно приготавливались мазки ПК, с последующей фиксацией и окраской по Романовскому—Гимзе. Окрашенные мазки крови оценивались с помощью световой микроскопии при увеличении 100×10 (масляная иммерсия). Проводился подсчет относительного количества популяций лейкоцитов (лейкоцитарная формула) с учетом количества образованных NET и НГ, ушедших в патологический апоптоз на 100 НГ. На основе полученных результатов рассчитывался интеграционный диагностический критерий по формуле:

$$\text{ИДК} = \frac{\% \text{ неизменных НГ}}{\% \text{NET} + \% \text{НГ в апоптозе}}$$

Статистическую обработку данных проводили в StatSoft Statistica 10.0. Проверку нормального распределения производили методом Колмогорова—Смирнова. Результаты описаны с использованием медиан (Me) с межквартильными диапазонами ($Q_{0,25}$ – $Q_{0,75}$). Для сравнения групп по количественным признакам использовали непараметрический критерий: U-критерий Манна—Уитни. Различие показателей исследуемых групп полагали статистически значимым при $p < 0,05$.

Результаты

Анализ уровня лейкоцитов и морфологической картины крови у пациентов группы 1 выявил изменения показателей при среднетяжелом течении COVID-19. Так, у пациентов на фоне тенденции снижения общего количества лейкоцитов до $5,8 (4,6-6,0) \times 10^9/\text{л}$ против $6,25 (4,25-6,75)$ в группе сравнения ($p > 0,05$), отмечено снижение относительного количества лимфоцитов $27,0 (17,0-30,5) \%$ против $34,0 (31,0-36,0) \%$ в группе сравнения, $p < 0,05$ и повышение содержания НГ $69,5 (67,5-78,0)$ против $60,0 (56,0-63,0) \%$ в группе сравнения, $p < 0,05$ и доли палочкоядерных форм (ПЯЛ) (табл. 1).

Обращают внимание на еще более выраженные сдвиги в общеклиническом анализе крови, выявленные при анализе показателей в группе 2 тяжелого течения COVID-19. Был обнаружен лейкоцитоз, значимое повышение содержания НГ, сдвиг нейтрофильного ростка в сторону молодых форм $15,0 (10,0-24,0)$, при этом у 100% пациентов отмечалась относительная лимфопения $11,0 (8,0-17,0) \%$ против $34,0 (31,0-36,0) \%$ в группе сравнения.

Нами дополнительно было проведено расширенное морфологическое исследование системы НГ и выявлено, что в ПК пациентов со среднетяжелым и тяжелым течением COVID-19 содержатся НГ, сформировавшие NET, и клетки в апоптозе (рис. 1, см. 2-ю стр. обложки).

Так, в группе 1 на 100 просчитанных НГ выявлялось $3,5 (2,5-4,0) \%$ клеток, вошедших в NETos и $3,0 (3,0-3,5) \%$ клеток в апоптозе. В группе 2 при тяжелом течении заболевания выявлялось в 4 раза большее количество NET и апоптотических клеток — $13,0 (9,0-16,0) \%$ и $12,0 (10,0-16,5) \%$ соответственно. При этом у пациентов группы сравнения выявлялись только единичные клетки с физиологическим апоптозом $1,0 (1,0-2,0) \%$. Принимая во внимание полученные данные, нами был разработан новый интеграционный диагностический критерий (ИДК), характери-

ТАБЛИЦА 1. МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ КРОВИ ПАЦИЕНТОВ СО СРЕДНЕТЯЖЕЛЫМ И ТЯЖЕЛЫМ ТЕЧЕНИЕМ COVID-19 И ПАЦИЕНТОВ С ПОСТКОВИДНЫМ СИНДРОМОМ, Ме ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)

TABLE 1. BLOOD MORPHOLOGICAL PARAMETERS OF PATIENTS WITH MODERATE AND SEVERE COVID-19 AND PATIENTS WITH POST-COVID SYNDROME, Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)

Показатель Index	Группа со среднетяжелым течением заболевания Group with moderate course diseases (n = 15)	Группа с тяжелым течением заболевания Severe group diseases (n = 16)	Группа с постковидным синдромом Group with post- COVID syndrome (n = 52)	Группа сравнения Условно здоровые добровольцы Group comparisons Healthy volunteers (n = 100)
WBC, $\times 10^9/\text{л}$ WBC, $\times 10^9/\text{L}$	5,8 (4,6-6,0)	11,95* [^] (10,2-16,1)	6,75 (5,75-6,75)	6,25 (4,75-6,75)
ЛФ, % LY, %	27,0* (17,0-30,5)	11,0* (8,0-17,0)	18,0* (15,0-21,0)	34,0 (31,0-36,0)
НГ, % NG, %	69,5* (67,5-78,0)	77,5* (75,8-86,5)	78,0* (76,0-81,0)	60,0 (56,0-63,0)
СЯЛ, % Segmented NG, %	61,5 (51,5-71,5)	57,0 (47,0-73,8)	75,0* (73,0-78,7)	55,5 (54,25-59,75)
ПЯЛ, % Banded NG, %	7,0* (6,0-8,5)	15,0* [^] (10,0-24,0)	2,0 (1,0-2,5)	3,0 (1,0-4,5)
NET, %	3,5* (2,5-4,0)	13,0* [^] (9,0-16,0)	5,5* (5,0-6,0)	0
НГ в апоптозе, % NG in apoptosis, %	3,0* (3,0-3,5)	12,0* [^] (10,0-16,5)	2,0 (1,25-2,75)	1,0 (1,0-2,0)
ИДК IDC	11,6* (8,8-13,6)	3,2* [^] (2,5-9,5)	12,4 * (10,5-15,0)	99,0 (99,0-99,0)

Примечание. * – различия показателей пациентов с COVID-19 и постковидным синдромом по сравнению с показателями условно здоровых лиц; [^] – различия показателей в группах пациентов со среднетяжелым и тяжелым течением COVID-19, статистически обоснованы с ошибкой 1 рода $p < 0,05$ (критерий Манна-Уитни).

Note. *, differences in the indicators of patients with COVID-19 and post-covid syndrome compared with those of healthy individuals; [^], differences in indicators in groups of patients with moderate and severe COVID-19, statistically substantiated by type 1 error $p < 0.05$ (Mann-Whitney test).

зующий состояние системы НГ у пациентов в остром периоде коронавирусной инфекции, который с учетом частоты встречаемости НГ, формирующих NET в периферической крови и находящихся в состоянии патологического апоптоза, рассчитывается по формуле, представленной в материалах и методах.

Данный интеграционный критерий в группе сравнения составил 99,0 (99,0-99,0), в группе 1 он составил 11,6 (8,8-13,6), что в 8,5 раза меньше, чем в группе сравнения ($p < 0,05$) (рис. 2). Стоит отметить, что наибольшее снижение данного интеграционного диагностического критерия отмечалось у пациентов, имеющих более тяжелое течение коронавирусной инфекции, сопровождающееся более выраженными признаками

нарушения гемодинамики, с высоким процентом поражения легочной ткани на снимках компьютерной томографии и более высоким риском развития имунотромбозов у которых ИДК составил 3,2 (2,5-9,5), что в 30 раз ($p < 0,05$) ниже показателя группы сравнения и в 3,6 раза ниже значений группы 1 ($p < 0,05$).

Для оценки регрессии изменений, наблюдаемых в нейтрофильном гранулоцитарном компартменте во время острого COVID-19, были исследованы образцы ПК пациентов, перенесших COVID-19 тяжелой степени через 3-6 месяцев после выписки из стационара. Исследованные образцы продемонстрировали нормализацию общего количества лейкоцитов ($p > 0,05$), но при этом в группе 3 отмечалось достоверное повы-

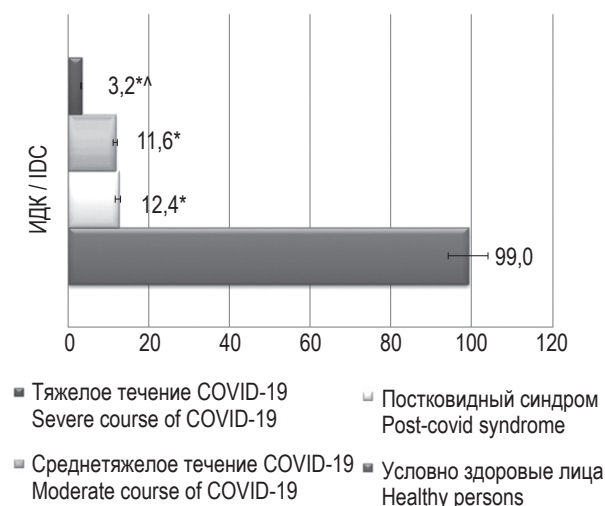


Рисунок 2. Интеграционный диагностический критерий у пациентов со среднетяжелым и тяжелым течением COVID-19 и пациентов с постковидным синдромом

Примечание. * – различия показателей пациентов с COVID-19 и постковидным синдромом по сравнению с показателями условно здоровых лиц; ^ – различия показателей в группах пациентов со среднетяжелым и тяжелым течением COVID-19, статистически обоснованы с ошибкой 1 рода $p < 0,05$ (критерий Манна–Уитни).

Figure 2. Integration diagnostic criterion in patients with moderate to severe COVID-19 and patients with post-COVID syndrome

Note. *, differences in the indicators of patients with COVID-19 and post-covid syndrome compared with those of healthy individuals; ^, differences in indicators in groups of patients with moderate and severe COVID-19, statistically substantiated by type 1 error $p < 0,05$ (Mann–Whitney test).

шение уровней НГ до 78,0 (76,0–81,0) %, против 60,0 (56,0–63,0) % в группе сравнения ($p < 0,05$), на фоне сохраняющейся относительной лимфопении – 18,0 (15,0–21,0) % против – 34,0 (31,0–36,0) ($p < 0,05$).

При морфологической оценке НГ в группе 3 с ПКС у 6 пациентов из 52 человек (11,5% случаев) были выявлены NETs – 5,5 (5,0–6,0) % и НГ в состоянии апоптоза – 2,0 (1,25–2,75) %, неизмененные НГ составили 92,5 (91,25–93,75) % (табл. 1).

При расчете интеграционного критерия НГ в группе 3 ИДК составил 12,4 (10,5–15,0), что в 8 раз меньше, чем в группе сравнения ($p < 0,05$). При этом выявлено, что снижение ИДК наиболее выражено у лиц с большим количеством клинических проявлений ПКС, основными жалобами которых являлись: сохраняющийся кашель и одышка, снижение работоспособности, утомляемость, головная боль, головокружение, ощущение тумана в голове, возникшие проблемы с памятью, усвоение новой информации, нарушение внимания, понимания, проблемы в общении с окружающими, а также нарушения засыпания и

сна. Оценка степени выраженности хронической усталости и симптомов когнитивных расстройств (в баллах) проводилась с использованием Шкалы, разработанной Нестеровой И.В. и соавт. (2021): 0 – отсутствие симптомов; 1 – минимальные симптомы; 2 – средняя тяжесть симптомов; 3 – тяжелая степень симптомов; 4 – очень тяжелая степень [23] (табл. 2).

Необходимо отметить, что исследуемые показатели НГ, лимфоцитов, а также содержание NETs и клеток в апоптозе в образцах ПК пациентов с постковидным синдромом значимо не отличаются от показателей группы 1 пациентов с острой вирусной инфекцией среднетяжелого течения (табл. 1). Наиболее показательным явился предложенный расчетный интеграционный диагностический критерий, низкие значения которого могут служить фактором риска развития осложнений, таких как системный васкулит и коагулопатии, учитывая роль NET в патогенезе этих заболеваний.

Обсуждение

Полученные нами в стандартных лабораторных тестах данные соответствуют описанному в научной литературе, в которых констатируется, что клинические синдромы COVID-19 имеют несколько уникальных особенностей, в том числе, повышение уровня НГ и снижение содержания лимфоцитов, а отношение НГ к лимфоцитам являются предикторами критических случаев COVID-19 [12, 14, 16, 26, 31, 34].

При COVID-19 выявлены характерные изменения лейкоцитов, которые можно легко идентифицировать в периферической крови и которые можно легко и последовательно отслеживать, что может помочь в диагностике, прогнозировании и протоколах лечения. Сообщалось об атипичных лимфоцитах, циркулирующих в крови у пациентов с COVID-19 [20, 27]. Предполагалось, что их присутствие отражает повышенное образование специфичных к вирусу Т-клеток, что объясняет лучший исход у пациентов, у которых эти клетки циркулируют в крови [20, 29]. Были замечены активированные моноциты, которые демонстрировали выраженный анизоцитоз с заметной вакуолизацией цитоплазмы и небольшим количеством гранул, связанные с воспалением, тяжесть которых коррелирует с исходом пациента с COVID-19 [36]. В то же время при морфологической оценке НГ описано только повышение конденсированного хроматина ядра, токсические гранулы и вакуоли в цитоплазме [34].

В настоящем исследовании установлено, что в остром периоде среднетяжелой и тяжелой ко-

ТАБЛИЦА 2. ВЫРАЖЕННОСТЬ КЛИНИЧЕСКИХ ПРОЯВЛЕНИЙ ПОСТКОВИДНОГО СИНДРОМА В РАННЕМ ПОСТКОВИДНОМ ПЕРИОДЕ (30-60 ДНЕЙ) У ПАЦИЕНТОВ, ПЕРЕНЕСШИХ COVID-19 ТЯЖЕЛОЙ СТЕПЕНИ (В БАЛЛАХ)

TABLE 2. SEVERITY OF CLINICAL MANIFESTATIONS OF POST-COVID SYNDROME IN THE EARLY POST-COVID PERIOD (30-60 DAYS) IN PATIENTS WITH SEVERE COVID-19 (IN POINTS)

Симптомы Symptoms	Группа сравнения Comparison group	Группа исследования 3 Study group 3
Синдром хронической усталости, непереносимость физической нагрузки, снижение работоспособности, повышенная утомляемость Chronic fatigue syndrome, exercise intolerance, decreased performance, increased fatigue	0,5 (0,1-1,0)	3,0 (3,0-3,0)
Головная боль, головокружение, мигрень Headache, dizziness, migraine	0,5 (0,1-1,0)	2,5 (2,00-3,75)
Боли в суставах, миалгии Joint pain, myalgia	0	2,0 (1,25-2,00)
Снижение процессов запоминания, трудности с концентрацией внимания, ощущение тумана в голове Decreased memory processes, difficulty concentrating, feeling of fog in the head	0	3,0 (3,00-3,75)
Панические атаки, расстройства настроения, эмоциональная лабильность, психогенная депрессия Panic attacks, mood disorders, emotional lability, psychogenic depression	0	2,0 (2,00-2,75)
Нарушения засыпания и сна Sleep and sleep disturbances	0	2,0 (1,25-2,00)
Повышенная потливость, субфебрилитет Increased sweating, subfebrile condition	0	1,5 (1,0-2,0)
Кашель и одышка Cough and shortness of breath	0	1,5 (1,0-2,0)
Общее количество баллов Total points	1,0 (0,5-2,0)	13,0 (10,75-17,25)

роновирусной инфекции у всех пациентов, отмечается появление в крови NET и клеток с патологическим апоптозом. НГ с одной стороны участвуют в клиренсе вируса посредством NETs, но при гиперактивации могут оказывать пагубное воздействие, способствуя патогенезу SARS-CoV-2 и усугубляя осложнения COVID-19, такие как ОРДС, тромбоз, развитие эндотелиита и васкулита. Расчет диагностического интеграционного критерия у пациентов с COVID-19 с учетом частоты встречаемости НГ, формирующих NET в периферической крови и находящихся в состоянии патологического апоптоза позволяет оценить тяжесть течения заболевания: при среднетяжелом течении ИПК снижается в 8,5 раза ($p < 0,05$), а при тяжелом течении в 30 раз ($p < 0,05$) по сравнению с группой условно здоровых лиц. Кроме того, установлено, что у 88,5% пациентов с ПКС, перенесших SARS-CoV-2, в ПК не выявлено патологически измененных НГ. В то же время у 11,5% пациентов с ПКС отмечено появление NETs и НГ находящихся в апоптозе,

при этом интеграционный критерий НГ-ПКС был в 8 раз меньше ($p < 0,05$), чем в группе сравнения, и не отличался от показателей пациентов со среднетяжелым течением COVID-19 ($p > 0,05$), что диктует необходимость дальнейшего диспансерного наблюдения таких пациентов.

Заключение

Таким образом, полученные в настоящем исследовании данные свидетельствуют о том, что разработанный интеграционный диагностический критерий позволяет оценить как тяжесть течения COVID-19, так и риск возникновения постковидного синдрома. Следует подчеркнуть, что выявленные при COVID-19 характерные изменения НГ можно легко идентифицировать в ПК и последовательно отслеживать по расчетному интегральному диагностическому критерию. Значительное снижение ИДК свидетельствует о сохраняющейся гиперактивации НГ и необходимости проведения таргетной иммунотерапии, направленной на модулирование дисфункций НГ.

Список литературы / References

1. Al-Kuraishy H.M., Al-Gareeb A.I., Abdullah S.M., Cruz-Martins N., Batiha G.E. Case report: hyperbilirubinemia in gilbert syndrome attenuates Covid-19-Induced metabolic disturbances. *Front. Cardiovasc. Med.*, 2021, Vol.8, 642181. doi: 10.3389/fcvm.2021.642181.
2. Al-Kuraishy H.M., Al-Gareeb A.I., Qusti S., Alshammari E.M., Atanu F.O., Batiha G.E. Arginine vasopressin and pathophysiology of COVID-19: An innovative perspective. *Biomed. Pharmacother.*, 2021, Vol. 143, 112193. doi: 10.1016/j.biopha.2021.112193.
3. Al-Kuraishy H.M., Al-Gareeb A.I., Qusti N., Cruz-Martins N., El-Saber Batiha G. Sequential doxycycline and colchicine combination therapy in Covid-19: The salutary effects. *Pulm. Pharmacol. Ther.*, 2021, Vol. 67, 102008. doi: 10.1016/j.pupt.2021.102008.
4. Apel F., Andreeva L., Knackstedt L., Streeck R., Frese C., Goosmann C., Zychlinsky A. The cytosolic DNA sensor cGAS recognizes neutrophil extracellular traps. *Sci. Signal.*, 2021, Vol. 14, 7942. doi: 10.1126/scisignal.aax7942.
5. Barnes B.J., Adrover J.M., Baxter-Stoltzfus A., Borczuk A., Cools-Lartigue J., Crawford J.M., Daßler-Plenker J., Guerci P., Huynh C., Knight J.S., Loda M., Looney M.R., McAllister F., Rayes R., Renaud S., Rousseau S., Salvatore S., Schwartz R.E., Spicer J.D., Yost C.C., Weber A., Zuo Y., Egeblad M. Targeting potential drivers of COVID-19: Neutrophil extracellular traps. *J. Exp. Med.*, 2020, Vol. 217, no. 6, 20200652. doi: 10.1084/jem.20200652.
6. Berthelot J., Drouet L., Lioté F., Kawasaki-like diseases and thrombotic coagulopathy in COVID-19: Delayed over-activation of the STING pathway? *Emerg. Microbes Infect.*, 2020, no. 9, pp. 1514-1522.
7. Bonow R.O., Fonarow G.C., O'Gara P.T., Yancy C.W. Association of coronavirus disease 2019 (COVID-19) with myocardial injury and mortality. *JAMA Cardiol.*, 2020, Vol. 5, no. 7, pp. 751-753.
8. Brinkmann V., Reichard U., Goosmann C., Fauler B., Uhlemann Y., Weiss D.S., Weinrauch Y., Zychlinsky A. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science*, 2004, Vol. 303, pp. 1532-1535.
9. 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, no. 10223, pp. 507-513.
10. Darcy C., Minigo G., Piera K., Davis J., McNeil Y., Chen Y., Volkheimer A.D., Weinberg J.B., Anstey N.M., Woodberry T. Neutrophils with myeloid derived suppressor function deplete arginine and constrain T Cell function in septic shock patients. *Crit. Care*, 2014, Vol. 18, 163. doi: 10.1186/cc14003.
11. Dennison D., Al Khabori M., Al Mamari S., Aurelio A., Al Hinai H., Al Maamari K., Alshekaili J., Al Khadouri G. Circulating activated neutrophils in COVID-19: An independent predictor for mechanical ventilation and death. *Int. J. Infect. Dis.*, 2021, Vol. 106, pp. 155-159.
12. Fois A.G., Paliogiannis P., Scano V., Cau S., Babudieri S., Perra R., Ruzzittu G., Zinellu E., Pirina P., Carru C., Arru L.B., Fancellu A., Mondoni M., Mangoni A. A., Zinellu A. The systemic inflammation index on admission predicts in-hospital mortality in COVID-19 patients. *Molecules*, 2020, Vol. 25, 5725. doi: 10.3390/molecules25235725.
13. Hiroki C., Toller-Kawahisa J., Fumagalli M., Colon D., Figueiredo L., Fonseca B., Franca R.F.O., Cunha F.Q. Neutrophil extracellular traps effectively control acute chikungunya virus infection. *Front. Immunol.*, 2020, Vol. 10, 3108. doi: 10.3389/fimmu.2019.03108.
14. Jimeno S., Ventura P.S., Castellano J.M., García-Adasme S.I., Miranda M., Touza P., Lllana I.L., López-Escobar A. Prognostic implications of neutrophil-lymphocyte ratio in COVID-19. *Eur. J. Clin. Invest.*, 2021, Vol. 51, no. 1, 13404. doi: 10.1111/eci.13404.
15. Jorch S.K., Kubes P. An emerging role for neutrophil extracellular traps in noninfectious disease. *Nat. Med.*, 2017, Vol. 23, pp. 279-287.
16. Kantri A., Ziati J., Khalis M., Haoudar A., Aidaoui K.E., Daoudi Y., Chikhaoui I., Yamani K.E., Mouhaoui M., Bakkouri J.E., Dini N., Mahi M., Naitlho A., Bahlaoui A., Bennana A., Noussair M., Belyamani L., Kettani Ch.El. Hematological and biochemical abnormalities associated with severe forms of COVID-19: A retrospective single-center study from Morocco. *PLoS One*, 2021, Vol. 16, 0246295. doi: 10.1371/journal.pone.0246295.
17. Lefrançois E., Mallavia B., Zhuo H., Calfee C.S., Looney M.R. Maladaptive role of neutrophil extracellular traps in pathogen-induced lung injury. *JCI Insight*, 2018, Vol.3, no. 3, 98178. doi: 10.1172/jci.insight.98178.
18. Masso-Silva J., Moshensky A., Lam M., Odish M., Patel A., Xu L., Hansen E., Trescott S., Nguyen C., Kim R., Perofsky K., Perera S., Ma L., Pham J., Rolfsen M., Olay J., Shin J., Dan J.M., Abbott R.K., Ramirez S., Alexander T.H., Lin G.Y., Fuentes A.L., Advani I., Gunge D., Pretorius V., Malhotra A., Sun X., Duran J., Hepokoski M., Crotty Sh., Coufal N.G., Meier A., Crotty A.L.E. Increased peripheral blood neutrophil activation phenotypes and neutrophil extracellular trap formation in critically ill Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) patients: A case series and review of the literature. *Clin. Infect. Dis.*, 2022, Vol. 74, pp. 479-489.

19. McKenna E., Wubben R., Isaza-Correa J.M., Melo A.M., Mhaonaigh A.U., Conlon N., O'Donnell J.S., Ní Cheallaigh C., Hurley T., Stevenson N.J., Little M.A., Molloy E.J. Neutrophils in COVID-19: Not innocent bystanders. *Front. Immunol.*, 2022, Vol. 13, 864387. doi: 10.3389/fimmu.2022.864387.
20. Merino A., Vlagea A., Molina A., Egri N., Laguna J., Barrera K., Boldú L., Acevedo A., Díaz-Pavón M., Sibina F., Bascón F., Sibila O., Juan M., Rodellar J. Atypical lymphoid cells circulating in blood in COVID-19 infection: morphology, immunophenotype and prognosis value. *J. Clin. Pathol.*, 2022, Vol. 75, pp. 104-111.
21. Middleton E.A., He X.Y., Denorme F., Campbell R.A., Ng D., Salvatore S.P., Mostyka M., Baxter-Stoltzfus A., Borczuk A.C., Loda M., Cody M.J., Manne B.K., Portier I., Harris E.S., Petrey A.C., Beswick E.J., Caulin A.F., Iovino A., Abegglen L.M., Weyrich A.S., Rondina M.T., Egeblad M., Schiffman J.D., Yost C.C. Neutrophil extracellular traps contribute to immunothrombosis in COVID-19 acute respiratory distress syndrome. *Blood*, 2020, Vol. 136, no. 10, pp. 1169-1179.
22. Naumenko V., Turk M., Jenne C., Kim S. Neutrophils in Viral Infection. *Cell Tissue Res.*, 2018, Vol. 371, pp. 505-516.
23. Nesterova I.V., Khalturina E.O., Malinovskaya V.V., Nguen Duen L. Recombinant IFN α 2b in complex with immunotropic drugs restored antiviral functions of subset IFN α / β RI⁺IFN γ R⁺TLR₄⁺ neutrophilic granulocyte and demonstrated good clinical efficacy in patients with active chronic herpes-viral infections and chronic fatigue syndrome. Ebook Edition, Filodiritto Publisher, 2021, pp. 70-78.
24. Nicolai L., Leunig A., Brambs S., Kaiser R., Joppich M., Hoffknecht M.L., Gold C., Engel A., Polewka V., Muenchhoff M., Hellmuth J.C., Ruhle A., Ledderose S., Weinberger T., Schulz H., Scherer C., Rudelius M., Zoller M., Keppler O.T., Zwißler B., von Bergwelt-Baildon M., Kääb S., Zimmer R., Bülow R.D., von Stillfried S., Boor P., Massberg S., Pekayvaz K., Stark K. Vascular neutrophilic inflammation and immunothrombosis distinguish severe COVID-19 from influenza pneumonia. *J. Thromb. Haemost.*, 2021, Vol. 19, no. 2, pp. 574-581.
25. Papayannopoulos V. Neutrophil extracellular traps in immunity and disease. *Nat. Rev. Immunol.*, 2018, Vol. 18, no. 2, pp. 134-147.
26. Qu R., Ling Y., Zhang Y.H., Wei L.Y., Chen X., Li X.M., Liu X.Y., Liu H.M., Guo Z., Ren H., Wang Q. Platelet-to-lymphocyte ratio is associated with prognosis in patients with coronavirus disease-19. *J. Med. Virol.*, 2020, Vol. 92, no. 9, pp. 1533-1541.
27. Singh A., Sood N., Narang V., Narang V., Goyal A. Morphology of COVID-19-affected cells in peripheral blood film. *BMJ Case Rep.*, 2020, Vol. 13, no. 5, e236117. doi: 10.1136/bcr-2020-236117.
28. Teluguakula N. Neutrophils set extracellular traps to injure lungs in coronavirus disease 2019. *J. Infect. Dis.*, 2021, Vol. 223, no. 9, pp. 1503-1505.
29. Thiam H., Wong S., Wagner D., Waterman C. Cellular mechanisms of NETosis. *Annu Rev. Cell Dev. Biol.*, 2020, Vol. 36, pp. 191-218.
30. Veras F.P., Pontelli M.C., Silva C.M., Toller-Kawahisa J.E., de Lima M., Nascimento D.C., Schneider A.H., Caetité D., Tavares L.A., Paiva I.M., Rosales R., Colón D., Martins R., Castro I.A., Almeida G.M., Lopes M.I.F., Benatti M.N., Bonjorno L.P., Giannini M.C., Luppino-Assad R., Almeida S.L., Vilar F., Santana R., Bollela V.R., Auxiliadora-Martins M., Borges M., Miranda C.H., Pazin-Filho A., da Silva L.L.P., Cunha L.D., Zamboni D.S., dal-Pizzol F., Leiria L.O., Siyuan L., Batah S., Fabro A., Mauad T., Dolhnikoff M., Duarte-Neto A., Saldiva P., Cunha T.M., Alves-Filho J.C., Arruda E., Louzada-Junior P., Oliveira R.D., Cunha F.Q. SARS-CoV-2-triggered neutrophil extracellular traps mediate COVID-19 pathology. *J. Exp. Med.*, 2020, Vol. 217, no. 12, 20201129. doi: 10.1084/jem.20201129.
31. Wang X., Li X., Shang Y., Wang J., Zhang X., Su D., Zhao S., Wang Q., Liu L., Li Y., Chen H. Ratios of neutrophil-to-lymphocyte and platelet-to-lymphocyte predict all-cause mortality in inpatients with coronavirus disease 2019 (COVID-19): a retrospective cohort study in a single medical centre. *Epidemiol. Infect.*, 2020, Vol. 148, e211. doi: 10.1017/S0950268820002071.
32. Wang Y., Luo L., Braun O.Ö., Westman J., Madhi R., Herwald H., Mörgelin M., Thorlacius H. Neutrophil extracellular trap-microparticle complexes enhance thrombin generation via the intrinsic pathway of coagulation in mice. *Sci. Rep.*, 2018, Vol. 8, no. 1, 4020. doi: 10.1038/s41598-018-22156-5.
33. Wu C., Chen X., Cai Y., Xia J., Zhou X., Xu Sh., Huang H., Zhang Li, Zhou X., Du Ch., Zhang Y., Song J., Wang S., Chao Y., Yang Z., Xu J., Zhou X., Chen D., Xiong W., Xu L., Zhou F., Jiang J., Bai Ch., Zheng J., Song Y. Risk Factors associated with acute respiratory distress syndrome and death in patients with coronavirus disease 2019 pneumonia in Wuhan, China. *JAMA Intern. Med.*, 2020, Vol. 180, no. 7, pp. 934-943.
34. Yang A.-P., Liu J., Tao W., Li H. The Diagnostic and predictive role of NLR, d-NLR and PLR in COVID-19 patients. *Int. Immunopharmacol.*, 2020, Vol. 84, 106504. doi: 10.1016/j.intimp.2020.106504.
35. Yip C.Y.C., Yap E.S., de Mel S., Teo Z. Y., Lee Ch.-T., Kan S., Lee M.C.C., Loh W.N.H., Lim E.L., Lee Sh.Y. Temporal changes in immune blood cell parameters in COVID-19 infection and recovery from severe infection. *Br. J. Haematol.*, 2020, Vol. 190, no. 1, pp. 33-36.

36. Zhang D., Guo R., Lei L., Liu H., Wang Y., Wang Y., Qian H., Dai T., Zhang T., Lai Y., Wang J., Liu Z., Chen T., He A., O'Dwyer M., Hu J. COVID-19 infection induces readily detectable morphological and inflammation-related phenotypic changes in peripheral blood monocytes, the severity of which correlate with patient outcome. *MedRxiv*, 2020.03.24.20042655. doi: 10.1101/2020.03.24.20042655.

37. Zuo Y., Zuo M., Yalavarthi S., Gockman K., Madison J., Shi H., Madison J.A., Woodard H.Sh.W., Lezak S.P., Lugogo N.L., Knight J.S., Kanthi Y. Neutrophil extracellular traps and thrombosis in COVID-19. *J. Thromb. Thrombolysis*, 2021, Vol. 51, no. 2, pp. 446-453.

Авторы:

Нестерова И.В. — д.м.н., профессор, главный научный сотрудник отдела клинко-экспериментальной иммунологии и молекулярной биологии Центральной научно-исследовательской лаборатории ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Краснодар; профессор кафедры клинической иммунологии, аллергологии и адаптологии факультета непрерывного медицинского образования Медицинского института, ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов им. Патриса Лумумбы», Москва, Россия

Атажыхова М.Г. — аспирант кафедры клинической иммунологии, аллергологии и лабораторной диагностики ФПК и ППС ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Краснодар, Россия

Матушкина В.А. — ассистент кафедры инфекционных болезней и эпидемиологии ФПК и ППС ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Краснодар, Россия

Тетерин Ю.В. — аспирант кафедры клинической иммунологии, аллергологии и лабораторной диагностики ФПК и ППС ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Краснодар, Россия

Городин В.Н. — д.м.н., доцент, заведующий кафедрой инфекционных болезней и эпидемиологии ФПК и ППС ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Краснодар, Россия

Чудилова Г.А. — д.б.н., доцент, заведующая отделом клинко-экспериментальной иммунологии и молекулярной биологии Центральной научно-исследовательской лаборатории, профессор кафедры клинической иммунологии, аллергологии и лабораторной диагностики ФПК и ППС ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Краснодар, Россия

Authors:

Nesterova I.V., PhD, MD (Medicine), Professor, Chief Research Associate, Department of Clinical and Experimental Immunology and Molecular Biology, Central Scientific Research Laboratory, Kuban State Medical University, Krasnodar; Professor, Department of Clinical Immunology, Allergology and Adaptology, Medical Institute, P. Lumumba Peoples' Friendship University, Moscow, Russian Federation

Atazhakhova M.G., Postgraduate Student, Department of Clinical Immunology, Allergology and Laboratory Diagnostics, Kuban State Medical University, Krasnodar, Russian Federation

Matushkina V.A., Assistant Professor, Department of Infectious Diseases and Epidemiology, Kuban State Medical University, Krasnodar, Russian Federation

Teterin Yu.V., Postgraduate Student, Department of Clinical Immunology, Allergology and Laboratory Diagnostics, Kuban State Medical University, Krasnodar, Russian Federation

Gorodin V.N., PhD, MD (Medicine), Associate Professor, Head, Department of Infectious Diseases and Epidemiology, Kuban State Medical University, Krasnodar, Russian Federation

Chudilova G.A., PhD, MD (Biology), Associate Professor, Head of the Department of Clinical and Experimental Immunology and Molecular Biology of the Central Scientific Research Laboratory, Professor of the Department of Clinical Immunology, Allergology and Laboratory Diagnostics, Kuban State Medical University, Krasnodar, Russian Federation

ИДЕНТИФИКАЦИЯ И ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА SARS-CoV-2-СПЕЦИФИЧНЫХ Т-ЛИМФОЦИТОВ У ПЕРЕНЕСШИХ COVID-19 ПАЦИЕНТОВ В ПЕРИОД ДО 16 МЕСЯЦЕВ ОТ НАЧАЛА ЗАБОЛЕВАНИЯ

Владимиров И.С., Жданова А.С., Мухин В.Е., Макаров В.В.,
Юдин В.С., Краевой С.А.

ФГБУ «Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью»
Федерального медико-биологического агентства, Москва, Россия

Резюме. При респираторных вирусных инфекциях, наряду с механизмами врожденного иммунитета, важную роль в защите организма играет адаптивная иммунная система. Эффективность ее клеточного звена имеет решающее значение для элиминации патогена. Т-клеточный ответ выявляется практически во всех случаях COVID-19 и является одним из ключевых факторов контроля SARS-CoV-2 в организме и устойчивости к инфекции, в том числе и повторной. Однако к настоящему моменту остаются неясными многие аспекты клеточного иммунного ответа к вирусу SARS-CoV-2 спустя год и более после перенесенной инфекции. Цель — изучить динамику лабораторных показателей постинфекционного клеточного иммунитета к SARS-CoV-2 в течение 16 месяцев от момента появления симптомов.

В исследование было включено 15 здоровых добровольцев и 87 пациентов, перенесших COVID-19. Переболевшие участники были разделены на 3 исследуемые группы в зависимости от времени, прошедшего с момента появления первых симптомов до момента взятия образцов крови для исследования (от 14 до 500 суток). Для всех образцов было выполнено определение количества S- и N-специфичных Т-лимфоцитов и профиль секретируемых цитокинов. Для обнаружения различных функциональных групп клеток был использован алгоритм автоматической кластеризации Phenograph.

Приблизительно 1 из 5×10^3 мононуклеарных клеток периферической крови была специфична к S-белку SARS-CoV-2, и 1 из 10^4 к N-белку. С первых недель инфекции количество специфичных CD8⁺ клеток у переболевших было достоверно выше, чем в группе не болевших участников. С увеличением постинфекционного периода количество специфичных CD4⁺ и CD8⁺ клеток постепенно снижается, но остается достоверно выше, чем в контрольной группе. Среди CD4⁺ клеток уменьшается доля IFN γ IL-2-TNF α ⁺ клеток и увеличивается доля IFN γ ⁺IL-2-TNF α ⁻. CD8⁺ лимфоциты в первые недели после начала заболевания представлены преимущественно IFN γ ⁺IL-2-TNF α ⁻ клетками, а к концу наблюдаемого периода — IFN γ IL-2-TNF α ⁺. По результатам кластеризации было показано, что

Адрес для переписки:

Владимиров Иван Сергеевич
ФГБУ «Центр стратегического планирования
и управления медико-биологическими рисками здоровью»
Федерального медико-биологического агентства
119121, Россия, Москва, ул. Погодинская, 10, стр. 1.
Тел.: 8 (495) 540-61-75 (доб. 4866).
E-mail: ISVladimirov@cspfmba.ru

Address for correspondence:

Ivan S. Vladimirov
Centre for Strategic Planning
and Management of Biomedical Health Risks
10 Pogodinskaya St, Bldg 1
Moscow
119121 Russian Federation
Phone: +7 (495) 540-61-75 (acc. 4866).
ISVladimirov@cspfmba.ru

Образец цитирования:

И.С. Владимиров, А.С. Жданова, В.Е. Мухин,
В.В. Макаров, В.С. Юдин, С.А. Краевой
«Идентификация и функциональная характеристика
SARS-CoV-2-специфичных Т-лимфоцитов у перенесших
COVID-19 пациентов в период до 16 месяцев от начала
заболевания» // Медицинская иммунология, 2024. Т. 26,
№ 3. С. 555-568. doi: 10.15789/1563-0625-IAF-2921

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

For citation:

I.S. Vladimirov, A.S. Zhdanova, V.E. Mukhin, V.V. Makarov,
V.S. Yudin, S.A. Kraevoy "Identification and functional
characteristic of SARS-CoV-2-specific T lymphocytes in
COVID-19 patients up to 16 months after disease onset",
Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya,
2024, Vol. 26, no. 3, pp. 555-568.
doi: 10.15789/1563-0625-IAF-2921

© Vladimirov I.S. et al., 2024
The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License
DOI: 10.15789/1563-0625-IAF-2921

на ранних постинфекционных сроках вирус-специфичные Т-лимфоциты представлены популяциями $IFN\gamma^-$ и $TNF\alpha^-$ -продуцирующих $CD4^+$ эффекторных клеток памяти, тогда как на поздних сроках значительную долю составляют $TNF\alpha^-$ -продуцирующие $CD8^+$ TEMRA и $IFN\gamma^-$ -продуцирующие $CD8^+$ Т-лимфоциты центральной памяти.

Т-клеточное звено адаптивного иммунитета играет важную роль в контроле и элиминации вирусных инфекций. В данной работе были продемонстрированы результаты, показывающие, что устойчивый клеточный иммунитет против SARS-CoV-2 присутствует у подавляющего большинства переболевших, начиная с первых недель и вплоть до 16 месяцев с момента появления первых симптомов COVID-19. Иммунная память к SARS-CoV-2 обеспечивается формированием Т-клеток центральной и эффекторной памяти, а полученные данные об их динамике за исследуемый период позволяют надеяться и на более продолжительную клеточную иммунную память к вирусу SARS-CoV-2.

Ключевые слова: COVID-19, SARS-CoV-2, клеточный иммунитет, Т-лимфоциты, проточная цитометрия, кластеризация данных

IDENTIFICATION AND FUNCTIONAL CHARACTERISTIC OF SARS-CoV-2-SPECIFIC T LYMPHOCYTES IN COVID-19 PATIENTS UP TO 16 MONTHS AFTER DISEASE ONSET

Vladimirov I.S., Zhdanova A.S., Mukhin V.E., Makarov V.V., Yudin V.S., Kraevoy S.A.

Centre for Strategic Planning and Management of Biomedical Health Risks, Moscow, Russian Federation

Abstract. In cases of respiratory viral infection, along with innate immunity mechanisms, the adaptive immune system plays a crucial role in the body's defence. The efficiency of its cellular component is crucial for pathogen elimination. T cell response is detected in almost all cases of COVID-19, being among the key factors of the virus control and resistance to infection, including re-infection. So far, however, many aspects of cellular immune response to SARS-CoV-2 over one year or later after infection remain unclear. The aim of this study was to investigate the dynamics of laboratory parameters of post-infection cellular immunity to SARS-CoV-2 within 16 months from the symptoms' onset.

Fifteen healthy volunteers and 87 COVID-19 patients were included into the study. The patients were divided into 3 groups depending on the time elapsed from the onset of the first symptoms to the time when blood samples were collected (from 14 to 500 days). For all samples, the number of S- and N-specific T lymphocytes and the cytokines secreting profiles were determined. Also, the Phenograph automatic clustering algorithm was used to discern different functional groups of the cells.

Approximately 1 in 5×10^3 peripheral blood mononuclear cells was specific for SARS-CoV-2 S-protein, and 1 in 10^4 was specific for N-protein. Since the first weeks of infection, the number of specific $CD8^+$ cells was significantly higher in COVID-19 patients, as compared with the group of healthy volunteers. As the post-infection period increased, the number of virus-specific $CD4^+$ and $CD8^+$ cells gradually decreased, but remained significantly higher than in control group. Among $CD4^+$ cell population, the proportion of $IFN\gamma^-$ IL-2 $^-$ $TNF\alpha^+$ cells decreased and the ratio of $IFN\gamma^+$ IL-2 $^-$ $TNF\alpha^-$ cells increases. During first weeks of the disease, $CD8^+$ lymphocytes are represented predominantly by $IFN\gamma^+$ IL-2 $^-$ $TNF\alpha^-$ cells and $IFN\gamma^-$ IL-2 $^-$ $TNF\alpha^+$ cells by the end of the observation period. The clustering results showed that, in the early post-infection period, virus-specific T lymphocytes were mostly presented by populations of $IFN\gamma^-$ and $TNF\alpha^-$ -producing $CD4^+$ effector memory cells. Meanwhile, in later time period, the most common populations were $TNF\alpha^-$ -producing $CD8^+$ TEMRA and $IFN\gamma^-$ -producing $CD8^+$ central memory T lymphocytes.

T cell adaptive immunity plays an important role in the control and elimination of viral infections. In this study, we demonstrated that robust cellular immunity against SARS-CoV-2 is present in the vast majority of patients from the first weeks up to 16 months after the onset of the first symptoms of COVID-19. The immune memory to SARS-CoV-2 is provided by production of central and effector memory T cells, and the data on their time dynamics during the study period allow us to hope for a longer duration of cellular immune memory to SARS-CoV-2.

Keywords: COVID-19, SARS-CoV-2, cellular immunity, T lymphocytes, flow cytometry, data clustering

Введение

В последние годы научным сообществом было получено значительное количество информации о вирусе SARS-CoV-2, опубликовано множество результатов исследований его структурных и функциональных характеристик, а также эпидемиологических и клинических особенностей вызываемого им COVID-19 [1, 4, 14, 17, 31]. Наряду с механизмами врожденного иммунитета, важную роль в защите организма от SARS-CoV-2 играет адаптивная иммунная система. Она распознает вирусные антигены, в том числе при повторной инфекции, осуществляет их блокирование и предотвращает развитие заболевания. Адаптивный иммунитет состоит из двух основных компонентов: В-лимфоцитов, обеспечивающих выработку антител (в том числе нейтрализующих), и Т-лимфоцитов, непосредственно уничтожающих инфицированные вирусом клетки и выполняющих вспомогательные функции. Нейтрализующие антитела служат ключевым фактором сдерживания вируса в организме [2, 19], однако они могут демонстрировать сниженную нейтрализующую активность против вновь возникающих генетических вариантов SARS-CoV-2 [24, 33]. В то же время Т-клеточный ответ выявляется практически во всех случаях заражения SARS-CoV-2 [5, 15, 23, 25, 29] и коррелирует с величиной вирусной нагрузки [3]. Он, как правило, направлен против различных антигенов — как структурных, так и неструктурных белков [20] и, таким образом, является одним из ключевых факторов для контроля возбудителя COVID-19 и устойчивости организма к инфекции, в том числе и повторной.

Т-лимфоциты человека можно разделить на две основные субпопуляции, которые экспрессируют на своей поверхности молекулы CD4 или CD8. CD8⁺Т-лимфоциты при COVID-19 в дыхательных путях препятствуют вирусной репликации, непосредственно уничтожая инфицированные клетки, а также выделяют противовирусные цитокины, такие как IFN γ и TNF α . В других тканях организма CD8⁺Т-клетки также участвуют в клиренсе вирусных частиц благодаря своей способности уничтожать инфицированные клетки. При инфицировании SARS-CoV-2 высокий уровень вирус-специфичных CD8⁺Т-клеток ассоциирован с благоприятными исходами заболевания, а CD8⁺Т-клеточный ответ быстро развивается во время острого COVID-19 [25, 33]. Например, сообщается о вирус-специфичных клетках уже через 1 день после появления симптомов [28]. В остром периоде заболевания специфичные к SARS-CoV-2 CD8⁺Т-клетки демонстрируют высокий уровень экспрессии IFN γ , гранзима В, перфорина и CD107a, связанных с цитотоксическими эффекторными функциями [28, 29].

CD4⁺ клетки осуществляют множество ключевых функций для координации и регуляции противовирусного иммунитета. Они обладают способностью дифференцироваться в целый ряд хелперных и эффекторных подтипов, помогают в CD8⁺Т-клеточном ответе, рекрутируют другие эффекторные клетки в очаг инфекции, оказывают прямую противовирусную активность, способствуют восстановлению тканей [12, 22]. Кроме того, посредством секреции растворимых медиаторов и рецепторной ко-стимуляции фолликулярные Т-хелперные клетки способствуют выработке высокоаффинных антител и дифференцировке В-клеток герминативного центра в клетки памяти и долгоживущие плазматические клетки [14]. Отмечено, что CD4⁺Т-клеточный ответ на SARS-CoV-2 более выражен, чем ответ CD8⁺Т-клеток и в большей степени связан с контролем первичной инфекции [15, 25, 29]. Вирус-специфичные CD4⁺Т-клетки могут быть обнаружены уже через 2-4 дня после появления симптомов, а их быстрая индукция при остром COVID-19 обычно ассоциируется с легкой формой заболевания и быстрым клиренсом организма от вируса [32]. Примечательно, что в некоторых исследованиях уровень антиген-специфичных CD4⁺Т-клеток сильнее коррелировал с низкой тяжестью COVID-19 по сравнению с уровнем антител или CD8⁺Т-клеток [25]. Напротив, длительное отсутствие специфичных CD4⁺Т-клеток (в некоторых случаях более 22 дней от появления симптомов) было ассоциировано с тяжелой или летальной формой COVID-19 [25, 32]. По литературным данным, доминирующими цитокинами, продуцируемыми SARS-CoV-2-специфичными CD4⁺Т-клетками, являются IFN γ , TNF α , IL-2 [15, 21, 23, 29].

Целью данного исследования было изучить динамику лабораторных показателей постинфекционного клеточного иммунитета к вирусу SARS-CoV-2 в период до 16 месяцев с момента появления симптомов.

Материалы и методы

Этические требования

Данное исследование было проведено в соответствии с этическими принципами Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации «Этические принципы проведения медицинских исследований с участием человека в качестве субъекта» от 1964 г. с последующими изменениями и дополнениями. Протокол исследования был одобрен Этическим Комитетом ФГБУ «ЦСП» ФМБА России. В исследование были включены индивидуумы старше 18 лет, не прошедшие вакцинацию, с подтвержденным методом ПЦР COVID-19 в анамнезе и не пере-

несшие повторной инфекции SARS-CoV-2. Критериями исключения являлись: наличие любого онкологического заболевания в течение 1 года до включения в исследование, наличие в анамнезе системных аутоиммунных заболеваний, первичных иммунодефицитов, ВИЧ-инфекции, гепатитов В и С, сифилиса, беременности и периода кормления грудью. Все участники подписали добровольное информированное согласие на участие в данном исследовании. Забор образцов крови производили в период с 20 марта по 30 августа 2021 года.

Получение мононуклеарных клеток периферической крови

Образцы периферической крови человека были получены посредством процедуры венопункции с использованием коммерческих систем BD Vacutainer (Becton Dickinson, США) с K_2EDTA в качестве антикоагулянта. Выделение мононуклеарных клеток периферической крови (МКПК) производили методом центрифугирования в градиенте плотности с помощью раствора Фиколла плотностью 1077 г/л (НПП «ПанЭко», Россия) при 450 g 20 минут. Полученные МКПК дважды отмывали в 10 мл фосфатно-солевого буфера (Phosphate-buffered saline, PBS) и криоконсервировали в клеточной среде RPMI-1640 (НПП «ПанЭко», Россия) с добавлением 20% фетальной бычьей сыворотки (Capricorn Scientific, Германия) и 10% диметилсульфоксида (Sigma-Aldrich, США). Образцы хранили в парах жидкого азота при температуре -178°C . Для проведения исследования клетки размораживали на водяной бане при 37°C и отмывали от криоконсерванта в 10 мл RPMI-1640.

Анализ концентрации интерферон- γ -продуцирующих антиген-специфичных клеток методом ELISPOT

Определение концентрации антиген-специфических клеток осуществляли с помощью наборов пептидов SARS-CoV-2: PepTivator SARS-CoV-2 Prot_S1, PepTivator SARS-CoV-2 Prot_S+, PepTivator SARS-CoV-2 Prot_S, PepTivator SARS-CoV-2 Prot_N (все — Miltenyi Biotec, Германия) и набора реагентов ELISPOT Interferon- γ (AID, Германия) в соответствии с инструкцией производителя. В качестве положительного контроля использовали лектин *Phytolacca americana* (GenID GmbH).

Исследуемые образцы МКПК помещали в количестве 2×10^5 клеток в 100 мкл клеточной среды AIM-V (Gibco, США) на одну лунку планшета ELISPOT Interferon- γ . Затем в лунки добавляли пулированные S- или N-пептиды (15-мерные последовательности с перекрытием в 11 аминокислот, покрывающие всю аминокислотную последовательность S- и N-белков) для активации

клеток с конечной концентрацией 0,6 нМ/мл. Клетки инкубировали в течение 18-24 ч при 37°C и 5% CO_2 . По окончании инкубации планшеты отмывали от клеток и вносили в лунки раствор конъюгата. После 2-часовой инкубации планшет промывали и вносили субстрат. После 20 минут инкубации планшет промывали и оставляли при 37°C до полного высыхания мембраны. Подсчет пятен производили на микропланшетном анализаторе iSpot (AID, Германия). Результаты фиксировали как количество пятнообразующих единиц (ПОЕ) на 10^5 исследуемых МКПК.

Анализ концентрации цитокинпродуцирующих антиген-специфичных клеток методом проточной цитометрии

Стимуляция пептидными пулами SARS-CoV-2

Исследуемые образцы МКПК помещали в количестве 5×10^5 клеток в 100 мкл клеточной среды AIM-V (Gibco, США) на одну лунку 96-луночного круглодонного планшета. Затем в лунки добавляли S- или N-пептидные пулы для активации Т-клеток с конечной концентрацией каждого 0,6 нМ/мл. Клетки инкубировали в течение 18 ч при 37°C и 5% CO_2 . Через 2 часа от начала инкубации внутриклеточный транспорт блокировали путем добавления BD GolgiPlug™ Protein Transport Inhibitor (BD BioSciences, США). По окончании инкубации образцы переносили в цитометрические пробирки, добавляли 1 мл PBS и центрифугировали 300 g 5 мин. Затем производили фиксацию, пермеабелизацию и окраску флуоресцентно мечеными моноклональными антителами.

Окрашивание поверхностных и внутриклеточных маркеров

Для окраски поверхностных антигенов использовался коктейль моноклональных антител (табл. 1).

Клетки инкубировали в 100 мкл коктейля моноклональных антител в течение 10 мин при комнатной температуре в темноте, а затем фиксировали 10 минут путем добавления 100 мкл реагента IntraPrep A (Beckman Coulter, США). После отмывки от поверхностных антител в 2 мл PBS, добавляли коктейль растворенных в 100 мкл реагента IntraPrep B моноклональных антител для цитоплазматического окрашивания (табл. 2). После 20-минутной инкубации клетки отмывали в 1 мл PBS и собирали данные на проточном цитометре.

Анализ данных

Данные всех образцов были записаны с использованием проточного цитометра Cytoflex LX (Beckman Coulter, США), оснащенный 375 нм, 405 нм, 488 нм, 561 нм, 638 нм лазерами. Ежедневный контроль качества выполнялся по рекомендациям производителя с помощью ПО

ТАБЛИЦА 1. СОСТАВ КОКТЕЙЛЯ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ ДЛЯ ПОВЕРХНОСТНОГО ОКРАШИВАНИЯ

TABLE 1. COMPOSITION OF MONOCLONAL ANTIBODY COCKTAIL FOR SURFACE CELL STAINING

Поверхностный маркер Surface marker	Клон Clone	Флуорохром Fluorochrome	Производитель Manufacturer
CD3	UCHT1	ECD	Beckman Coulter
CD4	13B8.2	APC	Beckman Coulter
CD8	B9.11	PC5.5	Beckman Coulter
CD45RA	2H4	PC7	Beckman Coulter
CD197	G043H7	PE	Beckman Coulter
Оценка жизнеспособности Viability Dye	–	Zombie Aqua™	Biolegend

ТАБЛИЦА 2. СОСТАВ КОКТЕЙЛЯ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ ДЛЯ ЦИТОПЛАЗМАТИЧЕСКОГО ОКРАШИВАНИЯ

TABLE 2. COMPOSITION OF MONOCLONAL ANTIBODY COCKTAIL FOR CYTOPLASMIC STAINING

Цитоплазматический маркер Cytoplasmic marker	Клон Clone	Флуорохром Fluorochrome	Производитель Manufacturer
IL-2	IL2.39.1	FITC	Beckman Coulter
TNF α	IPM2	AF700	Beckman Coulter
IFN γ	45.15	PB	Beckman Coulter

CytExpert 2.4 и калибровочных частиц CytoFLEX Daily QC Fluorospheres. Настройки усиления фотодетекторов и создание матрицы компенсаций спектральных перекрытий осуществлялись с помощью единично-окрашенных клеточных образцов.

Для анализа записывалось не менее $1,2 \times 10^5$ событий в регионе жизнеспособных CD3⁺ клеток. Полученные данные анализировались в программном обеспечении CytExpert 2.4, Kaluza Analysis 2.1 (Beckman Coulter) и FlowJo 10.5.3 (TreeStar). Схема гейтирования представлена на рисунке 1.

Определение клеточных популяций с помощью алгоритма автоматической кластеризации Phenograph

Алгоритм автоматической кластеризации Phenograph был использован в виде пакета расширения функционала (плагины) ПО FlowJo 10.5.3. Данный пакет находится в свободном доступе на сайте разработчика ПО: <https://www.flowjo.com/exchange>.

Статистическая обработка

Для статистических расчетов и построения диаграмм использовался программный пакет GraphPad Prism 8.0.1 (Dotmatics). Для оценки значимости различий между группами использовался критерий Краскела–Уоллиса. Статистически значимым считалось р-значение менее 0,05.

Результаты

Клиническая характеристика исследуемых групп

В исследование было включено 15 здоровых добровольцев (Группа сравнения) без COVID-19 в анамнезе и 87 пациентов перенесших COVID-19. Переболевшие участники были разделены на 3 исследуемые группы в зависимости от времени, прошедшего с момента появления первых симптомов до момента взятия образцов крови для исследования (дни после инфекции, ДПИ): Группа 1 (от 14 до 70 дней), Группа 2 (от 121 до 285 дней), Группа 3 (от 315 до 500 дней). Подробная характеристика групп представлена в таблице 3.

Динамика изменения концентрации антиген-специфических клеток

Методом EliSpot была проведена оценка изменения концентрации антиген-специфических IFN γ -продуцирующих клеток к S- и N-белку в периферической крови. Результаты представлены на рисунке 2. Можно отметить, что концентрация S-специфических клеток была максимальной в группе 1, после чего в группах 2 и 3 наблюдалось ее снижение (рис. 2А). Интересно, что для N-специфических клеток была обнаружена противоположная динамика (рис. 2В). Тем не менее даже спустя 16 месяцев от момента появления первых симптомов уровень

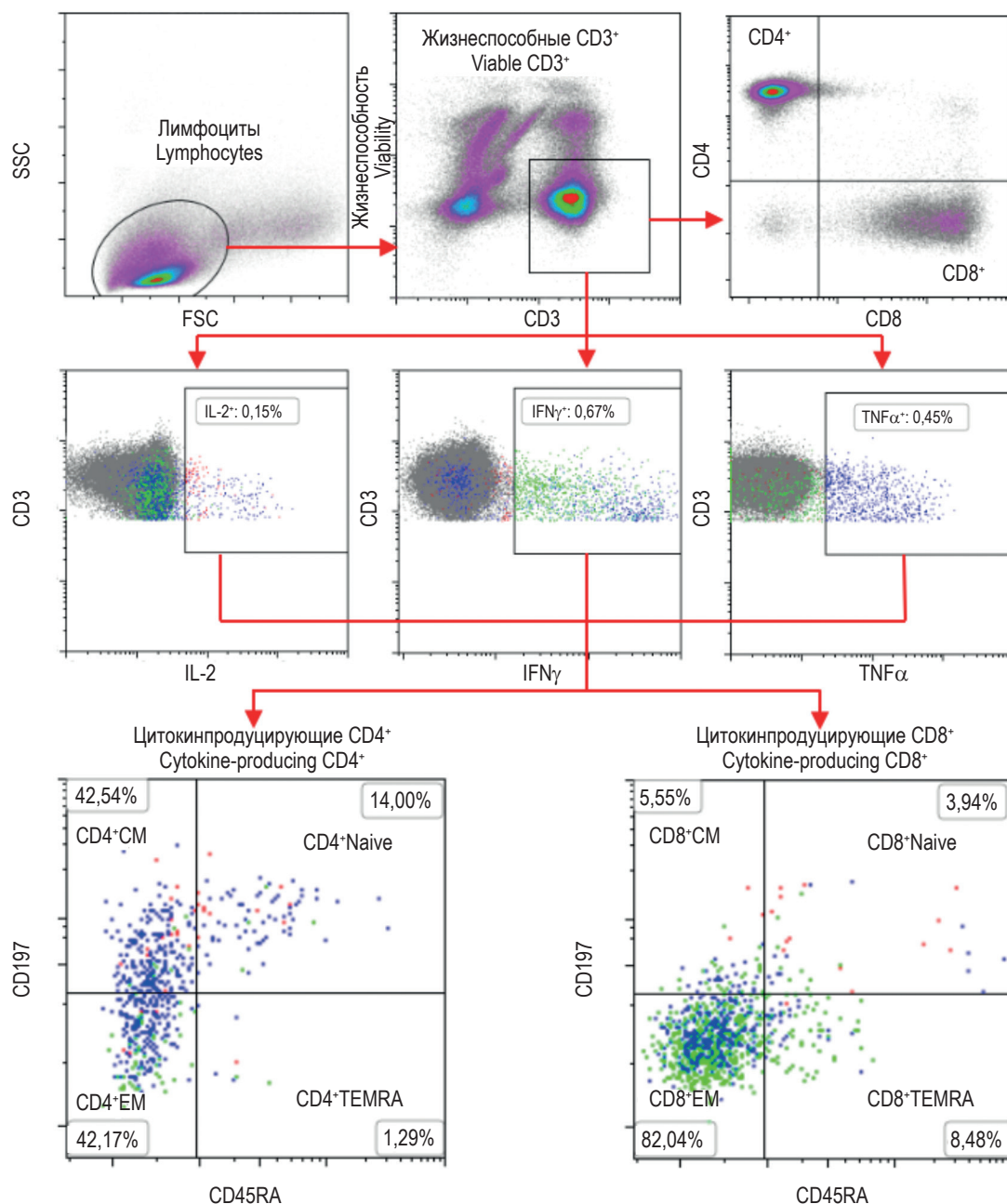


Рисунок 1. Стратегия гейтирования для определения субпопуляций Т-лимфоцитов

Примечание. По параметрам прямого и бокового светорассеяния отбирался лимфоцитарный пул (регион «Лимфоциты»). Далее из региона лимфоцитов выделялись жизнеспособные клетки, несущие на поверхности маркер CD3 («Жизнеспособные CD3⁺») и разделялись на CD4⁺ и CD8⁺ клетки. Также среди жизнеспособных CD3⁺ лимфоцитов определялись клетки, секретирующие цитокины – IL-2, IFN γ или TNF α . Объединенные вместе с помощью логического оператора, они составляют популяцию «Цитокин-продуцирующие». Затем все цитокинпродуцирующие клетки разделялись по присутствию маркеров CD4 или CD8, а также на 4 субпопуляции по экспрессии маркеров памяти CD45RA и CD197 (наивные клетки – Naïve (N), центральные клетки памяти – Central Memory (CM), эффекторные клетки памяти – Effector Memory (EM), терминальные эффекторные клетки памяти 45RA⁺ – Terminal Effector Memory RA (TEMRA)).

Figure 1. A gating strategy to determine T lymphocyte subpopulations

Note. The lymphocyte region (Lymphocytes) was selected accordingly to the parameters of forward and side light scattering. Then, viable CD3 cells ("Viable CD3⁺") were selected from the lymphocyte region as viability-dye negative events and divided into CD4⁺ and CD8⁺ cells. Also, among the viable CD3⁺ lymphocytes, cells secreting cytokines such as IL-2, IFN γ or TNF α were identified. Combined them together using a logical operator, they were named the "Cytokine-producing" population. All cytokine-producing cells were then divided into those carrying CD4 or CD8 marker and into 4 subpopulations based on the expression of CD45RA and CD197 memory markers (naïve cells – Naïve (N), Central Memory cells (CM), Effector Memory cells (EM), and Terminal Effector Memory RA cells (TEMRA)).

ТАБЛИЦА 3. КЛИНИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ГРУПП

TABLE 3. CLINICAL CHARACTERISTICS OF THE GROUPS

Параметр Parameter	Группа сравнения Reference group (n = 15)	Группа 1 Group 1 (n = 20)	Группа 2 Group 2 (n = 32)	Группа 3 Group 3 (n = 35)
Возраст, Ме ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$) Age, MeMe ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)	53,0 (43,0-57,0)	53,5 (41,3-65,0)	55,5 (42,8-60,8)	38,0 (30,0-48,0)
Пол, М/Ж, (%) Genger, M/F, (%)	8/7 (53/47%)	7/13 (35/65%)	12/20 (38/62%)	14/21 (40/60%)
ДПИ, Ме ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$) DPO, Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)	—	20 (17-23)	208 (171-235)	403 (381-430)

Примечание. Ме – медиана, $Q_{0,25}$ – первый квартиль, $Q_{0,75}$ – третий квартиль, ДПИ – дни после инфекции.

Note. Me is the median, $Q_{0,25}$ is the first quartile, $Q_{0,75}$ is the third quartile, DPO is the days post onset.

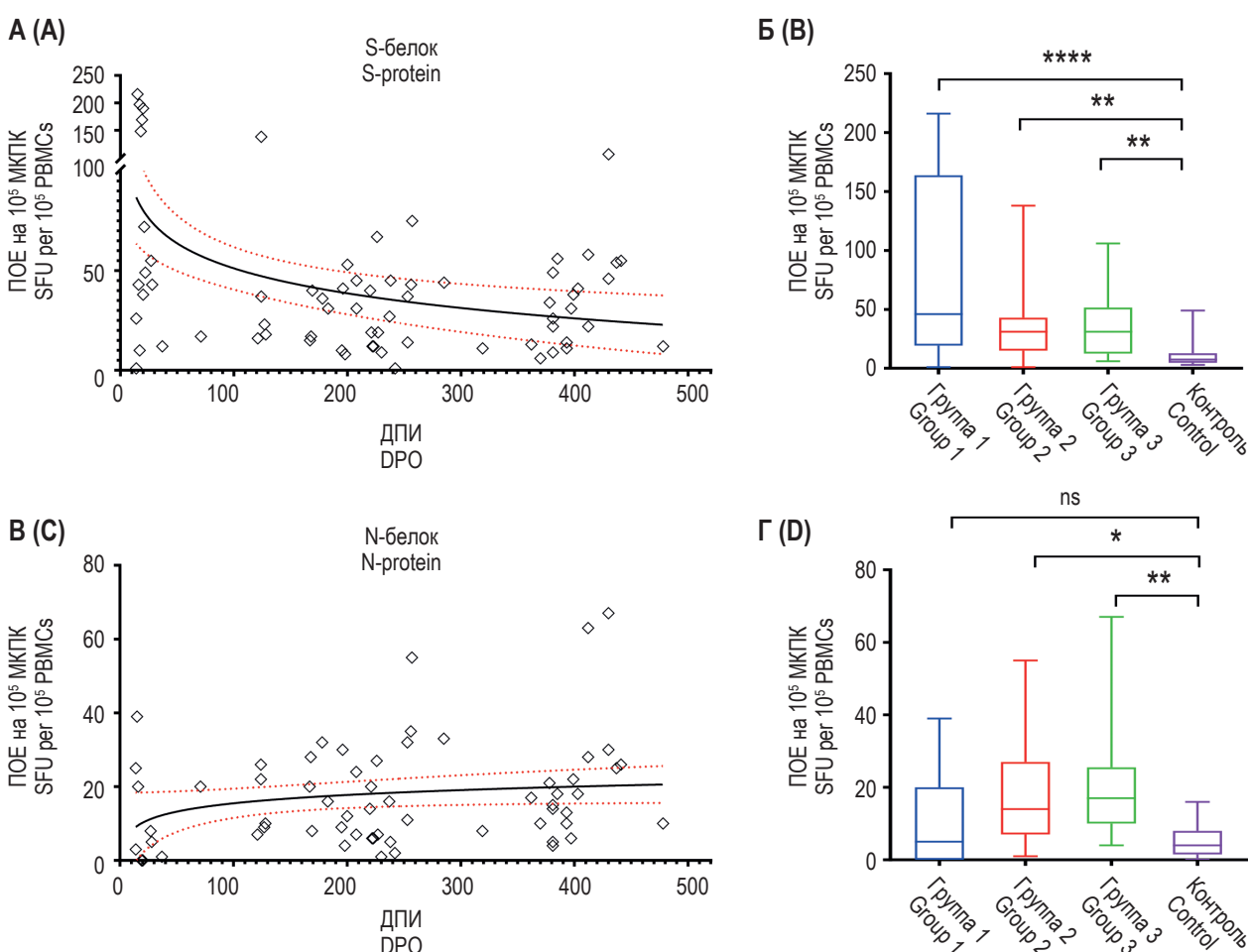


Рисунок 2. Концентрация антиген-специфичных IFN γ -продуцирующих клеток к S- и N-белкам

Примечание. Отображены все наблюдения и построена регрессионная модель зависимости количества пятно-образующих единиц (ПОЕ) на 10⁵ МКПК от количества дней после начала инфекции (ДПИ), пунктирной линией обозначен 95%-ный доверительный интервал (А, В). Продемонстрированы межгрупповые различия для S-белка (Б) и N-белка (Г), достоверность различий оценивалась с помощью критерия Краскела–Уоллиса. * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$; **** – $p < 0,0001$; ns – отсутствие значимых различий.

Figure 2. Concentration of antigen-specific IFN γ -producing cells against S- and N-proteins

Note. All observations are plotted, and a regression model of the relationship between the number of spot-forming units (SFU) per 10⁵ PBMCs and the DPO is created. The dotted lines indicate the 95% confidence interval (A, C). Intergroup differences for S-protein (B) and N-protein (D) are also demonstrated; the significance of differences was assessed using the Kruskal–Wallis test. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$; ****, $p < 0.0001$; ns, not significant.

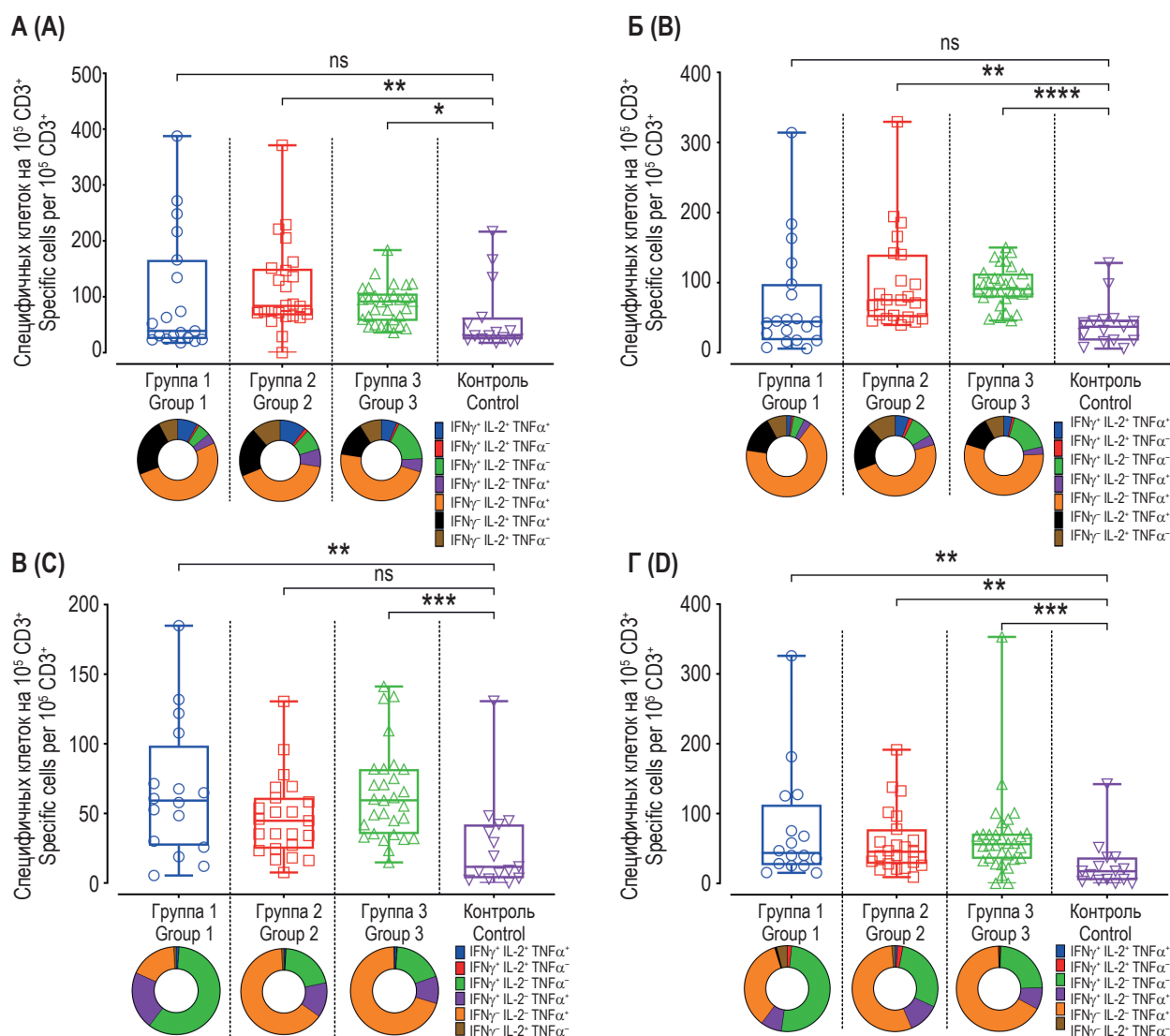


Рисунок 3. Сравнение исследуемых групп по уровню антиген-специфичных цитокинсекретирующих CD4⁺ и CD8⁺Т-лимфоцитов и профилю секретируемых ими цитокинов

Примечание. Доля S- (А) и N-специфичных (Б) CD4⁺ клеток в группах 2 и 3 достоверно выше, чем в группе сравнения. Доля специфичных CD8⁺ клеток во всех исследуемых группах для S- и N-пептидов достоверно выше, чем в группе сравнения (В, Г). Также, доля N-специфичных CD4⁺ клеток в 1 группе достоверно выше, чем в 3 группе (Б). Секреторный профиль для каждой группы представлен на круговых диаграммах. Других достоверных изменений уровня антиген-специфичных CD4⁺ и CD8⁺ между группами выявлено не было (не отмечено дополнительно). Для межгрупповых сравнений использовался критерий Краскела–Уоллиса. * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$; **** – $p < 0,0001$.

Figure 3. Comparison between the groups by the levels of antigen-specific cytokine-secreting CD4⁺ and CD8⁺T lymphocytes and the profile of cytokines secreted by them

Note. The proportion of S- (A) and N-specific (B) CD4⁺ cells in groups 2 and 3 was significantly higher than in the reference group. The proportion of specific CD8⁺ cells in all studied groups for S and N peptides is significantly higher than in the reference group (C, D). Also, the proportion of N-specific CD4⁺ cells in group 1 is significantly higher than in group 3 (B). The secretory profile for each group is shown in the pie charts. There were no other significant changes observed in the levels of antigen-specific CD4⁺ and CD8⁺ between the groups (not shown). The significance of differences was assessed using the Kruskal–Wallis test. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$; ****, $p < 0.0001$; ns, not significant.

SARS-CoV2 S-специфичных клеток был достоверно выше, чем в группе сравнения (рис. 2Б). Уровень N-специфичных клеток, напротив, был минимальным в группе 1 и не отличался от группы сравнения, тогда как в группах 2 и 3 был достоверно выше (рис. 2Г).

Определение концентрации антиген-специфичных клеток памяти к SARS-CoV-2 и секретируемых цитокинов методом проточной цитометрии

Используя метод проточной цитометрии, мы смогли более детально изучить популяционный состав SARS-CoV-2-специфичных

Т-лимфоцитов, а также профиль секретируемых ими цитокинов. На рисунке 3 представлены диаграммы изменения концентрации цитокинпродуцирующих ($IFN\gamma$, IL-2 и $TNF\alpha$) S- и N-специфичных Т-лимфоцитов, а также отражены изменения спектра вырабатываемых ими цитокинов между исследуемыми группами. Комбинации секретируемых цитокинов представлены на круговых диаграммах для каждой группы.

Концентрация S- и N-специфичных $CD4^+$ лимфоцитов у пациентов из первой группы не отличается от группы сравнения. С увеличением постинфекционного периода (во 2-й и 3-й группах) концентрация антиген-специфичных $CD4^+$ клеток достоверно повышается в сравнении с группой сравнения. Состав клеток по цитокиновому профилю также изменяется. С увеличением времени, прошедшего от момента появления симптомов инфекции, уменьшается доля $IFN\gamma$ IL-2- $TNF\alpha^+$ клеток и увеличивается доля $IFN\gamma$ IL-2- $TNF\alpha^-$ (рис. 3А, Б).

Концентрация S- и N-специфичных $CD8^+$ лимфоцитов достоверно повышается по сравнению со здоровыми добровольцами уже в первые недели после манифестации заболевания и сохраняется выше, чем в группе сравнения на всем протяжении периода наблюдения. Состав $CD8^+$ клеток по цитокиновому профилю претерпевает более выраженные изменения: цитотоксические лимфоциты в первые недели после начала заболевания представлены преимущественно $IFN\gamma^+IL-2-TNF\alpha^-$ клетками, в то время как к концу наблюдения $IFN\gamma$ IL-2- $TNF\alpha^+$ (рис. 3В, Г).

Оценка фенотипа цитокинпродуцирующих Т-лимфоцитов с помощью алгоритма кластеризации Phenograph

С помощью алгоритма кластеризации Phenograph были проанализированы изменения фенотипа цитокинпродуцирующих Т-лимфоцитов с увеличением времени от момента появления первых симптомов (рис. 4А, Б). Каждый кластер был охарактеризован по экспрессии маркеров клеток памяти ($CD45RA$ и

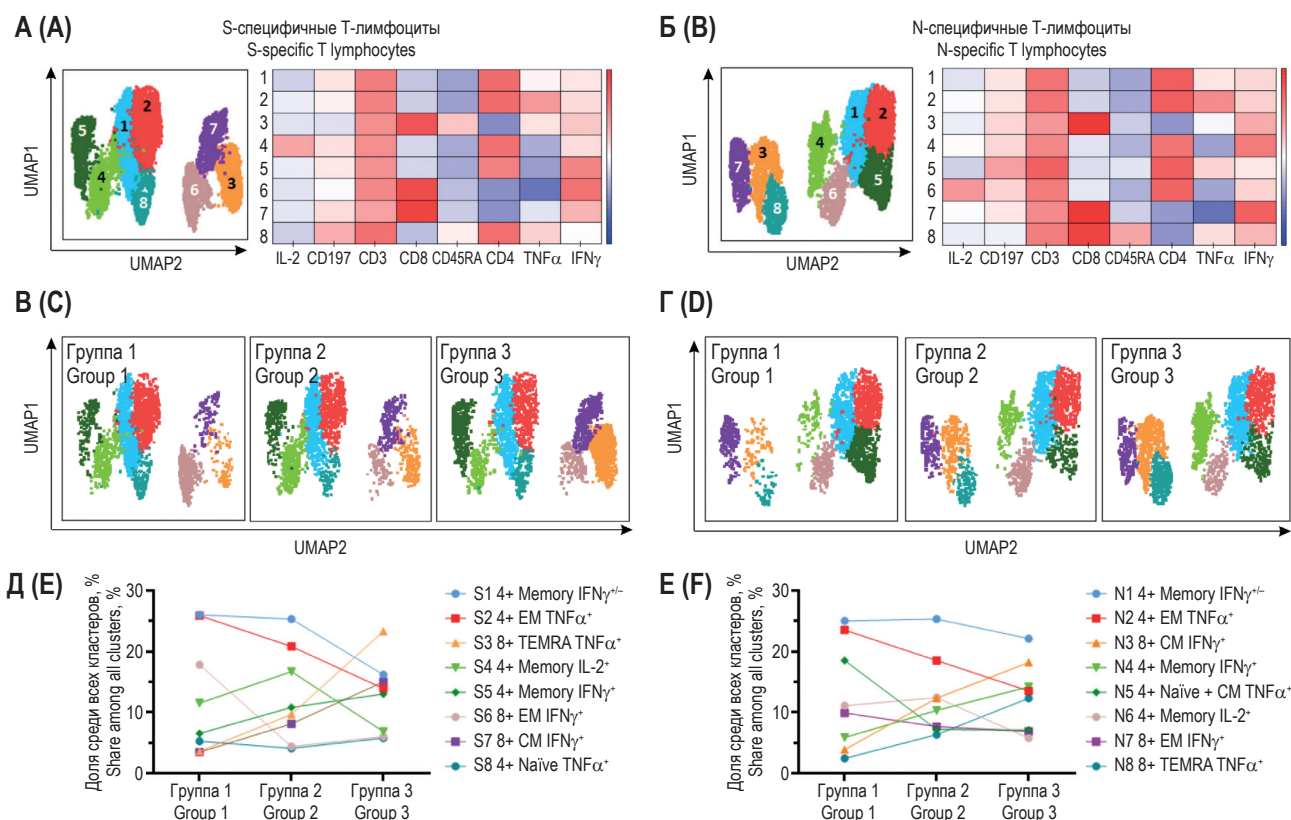


Рисунок 4. Результаты применения алгоритма кластеризации Phenograph

Представлены UMAP-диаграммы, отображающие состав кластеров и тепловые карты, характеризующие степень экспрессии поверхностных маркеров и цитокинов в Т-лимфоцитах для белков S (А) и N (Б). Также представлены изменения соотношения кластеров между исследуемыми группами в виде графиков UMAP (В, Г) и линейных графиков (Д, Е) для S- и N-белков соответственно.

Figure 4. Results of application of the Phenograph clustering algorithm

Note. UMAP diagrams show the composition of clusters and heat maps characterize the expression of surface markers and cytokines in T lymphocytes for S (A) and N (B) proteins. Changes in the cluster ratio between the studied groups are also presented as UMAP plots (C, D) and line charts (E, F) for S- and N-proteins, respectively.

CD197) и преимущественно продуцируемому цитокину (IL-2, IFN γ или TNF α). Изменения в соотношении кластеров между группами изображены на рисунке 4B-E. Можно отметить, что на ранних постинфекционных сроках Т-лимфоциты представлены преимущественно IFN γ - и TNF α -продуцирующими CD4⁺ эффекторными клетками памяти для S- (рис. 4D) и N-белков (рис. 4E), тогда как на поздних сроках значительную долю составляют TNF α -продуцирующие CD8⁺ терминальные RA (TEMRA) и IFN γ -продуцирующие CD8⁺ лимфоциты центральной памяти.

Обсуждение

Количественный и качественный состав клеток иммунной памяти к SARS-CoV-2 имеет решающее значение для предотвращения повторного заражения. Клеточное звено иммунной системы оказывает прямое защитное действие против тяжелой формы коронавирусной инфекции [8], а также необходимо для нормальной выработки антител. Мы провели оценку специфического для SARS-CoV-2 Т-клеточного иммунного ответа в течение 16 месяцев от момента появления симптомов. По результатам ELISPOT, приблизительно 1 из 5000 клеток среди МКПК была специфична к S-белку SARS-CoV-2 и 1 из 10000 к N-белку, что сопоставимо с имеющимися литературными данными [7, 13]. Что касается субпопуляций Т-лимфоцитов, мы показали, что SARS-CoV-2-специфичные CD4⁺Т-клетки преимущественно имеют фенотипы центральной памяти CCR7⁺CD45RA⁻ или эффекторной памяти CCR7⁻CD45RA⁺, а специфичные для SARS-CoV-2 CD8⁺Т-клетки преимущественно относятся к лимфоцитам эффекторной памяти. Это также согласуется с уже опубликованными данными [13].

Известно, что после быстрой экспансии CD4⁺ и CD8⁺Т-клеток во время острой фазы, их концентрация снижается с периодом полужизни около 200 дней [11]. Согласно нашим результатам ELISPOT, концентрация IFN-продуцирующих S-специфичных клеток снижается с увеличением постинфекционного периода, тогда как уровень N-специфичных клеток, наоборот, повышается. Было высказано предположение, что уровень SARS-CoV-2-специфических Т-клеток со временем выходит на плато, что, вероятно, связано с увеличением доли стволовых Т-клеток памяти [18].

В последние годы с развитием методов машинного обучения для анализа данных проточной цитометрии широко применяются алгоритмы автоматической идентификации клеточных популяций [10]. Они, в том числе, включают в себя инструменты для уменьшения размерности

(например, t-SNE, UMAP) и кластеризации данных (например, FlowSOM, SPADE, Phenograph и др.) [26]. В нашей работе для обнаружения различных субпопуляций Т-лимфоцитов мы использовали алгоритм автоматической кластеризации Phenograph. Его преимуществом перед другими алгоритмами является автоматическое определение итогового количества кластеров. Phenograph строит граф для ближайших «соседей» из исходных многомерных данных, а затем использует алгоритм Лувена для разбиения его на сообщества (популяции). Данные инструменты позволяют отображать многомерные данные в удобной форме и упрощают их анализ, что становится особенно актуальным при использовании современных проточных цитометров с большим количеством каналов детекции.

При использовании алгоритма Phenograph на наших данных мы получили по 8 кластеров для S- и N-специфичных цитокинпродуцирующих Т-лимфоцитов, различающихся степенью экспрессии поверхностных маркеров и типом секретируемых цитокинов. Одновременно, используя традиционный метод гейтирования, мы интерпретировали каждый кластер по отношению его к различным типам клеток памяти и определили его секреторный профиль. Анализ секретируемых цитокинов показал, что IFN γ и TNF α были основными цитокинами, продуцируемым вирус-специфическими Т-клетками на разных стадиях после инфекции, что указывает на преобладание Th1-пула лимфоцитов, который может способствовать формированию долгосрочной иммунной памяти. Цитокинпродуцирующие клетки были представлены в подавляющем большинстве центральными и эффекторными клетками памяти (CD45RA⁻CD197^{+/+}), что не противоречит ранее опубликованным данным [9, 21, 30]. Для N- и S-пептидов доля CD4⁺ антиген-специфичных клеток центральной памяти повышалась с увеличением времени с момента заражения, в то время как доля клеток эффекторной памяти снижалась. Доля CD8⁺ антиген-специфичных центральных клеток памяти и терминальных эффекторных клеток памяти также увеличивалось, а доля эффекторных CD8⁺ клеток памяти уменьшалась для N- и S-белков. Снижение выработки IL-2 на более поздних сроках от момента появления симптомов позволяет предположить постепенное замещение эффекторных популяций Т-лимфоцитов, наиболее многочисленных на ранних сроках, клетками центральной памяти, осуществляющими контроль за потенциально возможной реинфекцией, что согласуется с ранее опубликованными данными [8, 16, 27].

Заключение

Т-клеточное звено адаптивного иммунитета играет важную роль в контроле и элиминации вирусных инфекций. В данной работе были продемонстрированы результаты, показывающие, что устойчивый клеточный иммунитет против SARS-CoV-2 присутствует у подавляющего большинства переболевших, начиная с первых не-

дель и вплоть до 16 месяцев с момента появления первых симптомов COVID-19. Иммунная память к SARS-CoV-2 обеспечивается формированием Т-клеток центральной и эффекторной памяти, а полученные данные об их динамике за исследуемый период позволяют надеяться и на более продолжительную клеточную иммунную память к вирусу SARS-CoV-2.

Список литературы / References

1. Гудима Г.О., Хаитов Р.М., Кудлай Д.А., Хаитов М.Р. Молекулярно-иммунологические аспекты диагностики, профилактики и лечения коронавирусной инфекции // Иммунология, 2021. Т. 42, № 3. С. 198-210. [Gudima G.O., Khaitov R.M., Kudlay D.A., Khaitov M.R. Molecular immunological aspects of diagnostics, prevention and treatment of coronavirus infection. *Immunologiya = Immunology*, 2021, Vol. 42, no. 3, pp. 198-210. (In Russ.)]
2. Закурская В.Я., Сизякина Л.П., Харитонов М.В., Шлык С.В. Динамика специфического гуморального ответа у пациентов, перенесших COVID-19 // Иммунология, 2022. Т. 43, № 1. С. 71-77. [Zakurskaya V.Ya., Siziakina L.P., Kharitonova M.V., Shlyk S.V. Dynamics of specific humoral response in COVID-19 patients. *Immunologiya = Immunology*, 2022, Vol. 43, no. 1, pp. 71-77. (In Russ.)]
3. Никитин Ю.В., Александрова Е.В., Криворучко А.Б., Мешкова М.Е., Минаева Л.В., Жданов К.В., Артамонов А.А., Козлов К.В., Иванов А.М., Мальцев О.В., Иванов К.С., Ляшенко Ю.И., Масалов Е.Б. Взаимосвязь вирусной нагрузки и показателей клеточного звена иммунной системы у пациентов с COVID-19 различной степени тяжести // Медицинская иммунология, 2023. Т. 25, № 1. С. 167-180. [Nikitin Yu.V., Aleksandrova E.V., Krivoruchko A.B., Meshkova M.E., Minaeva L.V., Zhdanov K.V., Artamonov A.A., Kozlov K.V., Ivanov A.M., Maltsev O.V., Ivanov K.S., Lyashenko Yu.I., Masalov E.B. Interrelations between viral load and cellular immunity in patients with COVID-19 of varying severity. *Meditinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2023, Vol. 25, no. 1, pp. 167-180. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-IBV-2586.
4. Пашенков М.В., Хаитов М.Р. Иммунный ответ против эпидемических коронавирусов // Иммунология, 2020. Т. 41, № 1. С. 5-18. [Pashenkov M.V., Khaitov M.R. Immune response against epidemic coronaviruses. *Immunologiya = Immunology*, 2020, Vol. 41, no. 1, pp. 5-18. (In Russ.)]
5. Попов О.С., Сушенцева Н.Н., Полковникова И.А., Апалько С.В., Рудник А.Ю., Анисенкова А.Ю., Колесник С.В., Кудлай Д.А., Мосенко С.В., Щербак С.Г. Влияние специфического Т-клеточного и гуморального иммунного ответа к SARS-CoV-2 на выживаемость пациентов, впервые болеющих COVID-19 // Иммунология, 2023. Т. 44, № 1. С. 53-62. [Popov O.V., Sushentseva N.N., Polkovnikova I.A., Apalko S.V., Rudnik A.Yu., Anisenkova A.Yu., Kolesnik S.V., Kudlay D.A., Mosenko S.V., Shcherbak S.G. Impact of SARS-CoV-2-specific cellular and humoral immunity on survival in patients with COVID-19 for the first time. *Immunologiya = Immunology*, 2023, Vol. 44, no. 1, pp. 53-62. (In Russ.)]
6. Braun J., Loyal L., Frentsch M., Wendisch D., Georg P., Kurth F., Hippenstiel S., Dingeldey M., Kruse B., Fauchere F., Baysal E., Mangold M., Henze L., Lauster R., Mall M.A., Beyer K., Röhm J., Voigt S., Schmitz J., Miltenyi S., Demuth I., Müller M.A., Hocke A., Witzenthalm M., Suttorp N., Kern F., Reimer U., Wenschuh H., Drosten C., Cormann V.M., Giesecke-Thiel C., Sander L.E., Thiel A. SARS-CoV-2-reactive T cells in healthy donors and patients with COVID-19. *Nature*, 2020, Vol. 587, no. 7833, pp. 270-274.
7. Cassaniti I., Percivalle E., Bergami F., Piralla A., Comolli G., Bruno R., Vecchia M., Sambo M., Colaneri M., Zuccaro V., Benazzo M., Robotti C., Calastri A., Maiorano E., Ferrari A., Cambiè G., Baldanti F. SARS-CoV-2 specific T-cell immunity in COVID-19 convalescent patients and unexposed controls measured by ex vivo ELISpot assay. *Clin. Microbiol. Infect.*, 2021, Vol. 27, no. 7, pp. 1029-1034.
8. Channappanavar R., Fett C., Zhao J., Meyerholz D.K., Perlman S. Virus-specific memory CD8 T cells provide substantial protection from lethal severe acute respiratory syndrome coronavirus infection. *J. Virol.*, 2014, Vol. 88, no. 19, pp. 11034-11044.
9. Chen Z., John Wherry E. T cell responses in patients with COVID-19. *Nat. Rev. Immunol.*, 2020, Vol. 20, no. 9, pp. 529-536.
10. Cheung M., Campbell J.J., Whitby L., Thomas R.J., Braybrook J., Petzing J. Current trends in flow cytometry automated data analysis software. *Cytometry Part A*, 2021, Vol. 99, no. 10, pp. 1007-1021.
11. Cohen K.W., Linderman S.L., Moodie Z., Czartoski J., Lai L., Mantus G., Norwood C., Nyhoff L.E., Edara V.V., Floyd K., de Rosa S.C., Ahmed H., Whaley R., Patel S.N., Prigmore B., Lemos M.P., Davis C.W., Furth S., O'Keefe J.B., Gharpure M.P., Gunisetty S., Stephens K., Antia R., Zarnitsyna V.I., Stephens D.S., Edupuganti S., Roupheal N., Anderson E.J., Mehta A.K., Wrammert J., Suthar M.S., Ahmed R., McElrath M.J. Longitudinal analysis shows durable and broad immune memory after SARS-CoV-2 infection with persisting antibody responses and memory B and T cells. *Cell Rep. Med.*, 2021, Vol. 2, no. 7, 100354. doi: 10.1016/j.xcrm.2021.100354.

12. Crotty S. T follicular helper cell biology: a decade of discovery and diseases. *Immunity*, 2019, Vol. 50, no. 5, pp. 1132-1148.
13. 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.
14. DiPiazza A.T., Graham B.S., Ruckwardt T.J. T cell immunity to SARS-CoV-2 following natural infection and vaccination. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2021, Vol. 538, pp. 211-217.
15. Grifoni A., Weiskopf D., Ramirez S.I., Mateus J., Dan J.M., Moderbacher C.R., Rawlings S.A., Sutherland A., Premkumar L., Jadi R.S., Marrama D., de Silva A.M., Frazier A., Carlin A.F., Greenbaum J.A., Peters B., Krammer F., Smith D.M., Crotty S., Sette A. Targets of T cell responses to SARS-CoV-2 coronavirus in humans with COVID-19 disease and unexposed individuals. *Cell*, 2020, Vol. 181, no. 7, pp. 1489-1501.
16. Hanna S.J., Codd A.S., Gea-Mallorqui E., Scourfield D.O., Richter F.C., Ladell K., Borsa M., Compeer E.B., Moon O.R., Galloway S.A.E., Dimonte S., Capitani L., Shepherd F.R., Wilson J.D., Uhl L.F.K.; Oxford-Cardiff COVID-19 Literature Consortium; Gallimore A.M., Milicic A. T cell phenotypes in COVID-19 – a living review. *Oxford Open Immunol.*, 2021, Vol. 2, no. 1, iqaa007. doi: 10.1093/oxfimm/iqaa007.
17. Jordan S.C. Innate and adaptive immune responses to SARS-CoV-2 in humans: relevance to acquired immunity and vaccine responses. *Clin. Exp. Immunol.*, 2021, Vol. 204, no. 3, pp. 310-320.
18. Jung J.H., Rha M.S., Sa M., Choi H.K., Jeon J.H., Seok H., Park D.W., Park S.H., Jeong H.W., Choi W.S., Shin E.C. SARS-CoV-2-specific T cell memory is sustained in COVID-19 convalescent patients for 10 months with successful development of stem cell-like memory T cells. *Nat. Commun.*, 2021, Vol. 12, no. 1, 4043. doi: 10.1038/s41467-021-24377-1.
19. Khoury D.S., Wheatley A.K., Ramuta M.D., Reynaldi A., Cromer D., Subbarao K., O'Connor D.H., Kent S.J., Davenport M.P. Measuring immunity to SARS-CoV-2 infection: comparing assays and animal models. *Nat. Rev. Immunol.*, 2020, Vol. 20, no. 12, pp. 727-738.
20. Lehmann A.A., Kirchenbaum G.A., Zhang T., Reche P.A., Lehmann P.V. Deconvoluting the T Cell response to SARS-CoV-2: specificity versus chance and cognate cross-reactivity. *Front. Immunol.*, 2021, Vol. 12, 635942. doi: 10.3389/fimmu.2021.635942.
21. Mathew D., Giles J.R., Baxter A.E., Oldridge D.A., Greenplate A.R., Wu J.E., Alanio C., Kuri-Cervantes L., Pampena M.B., D'Andrea K., Manne S., Chen Z., Huang Y.J., Reilly J.P., Weisman A.R., Ittner C.A.G., Kuthuru O., Dougherty J., Nzingha K., Han N., Kim J., Pattekar A., Goodwin E.C., Anderson E.M., Weirick M.E., Gouma S., Arevalo C.P., Bolton M.J., Chen F., Lacey S.F., Ramage H., Cherry S., Hensley S.E., Apostolidis S.A., Huang A.C., Vella L.A.; UPenn COVID Processing Unit; Betts M.R., Meyer N.J., Wherry E.J. Deep immune profiling of COVID-19 patients reveals distinct immunotypes with therapeutic implications. *Science*, 2020, Vol. 369, no. 6508, eabc8511. doi: 10.1126/science.abc8511.
22. Meckiff B.J., Ramírez-Suástegui C., Fajardo V., Chee S.J., Kusnadi A., Simon H., Eschweiler S., Grifoni A., Pelosi E., Weiskopf D., Sette A., Ay F., Seumois G., Ottensmeier C.H., Vijayanand P. Imbalance of Regulatory and Cytotoxic SARS-CoV-2-Reactive CD4⁺ T Cells in COVID-19. *Cell*, 2020, Vol. 183, no. 5, pp. 1340-1353.
23. Peng Y., Mentzer A.J., Liu G., Yao X., Yin Z., Dong D., Dejnirattisai W., Rostron T., Supasa P., Liu C., López-Camacho C., Slon-Campos J., Zhao Y., Stuart D.I., Paesen G.C., Grimes J.M., Antson A.A., Bayfield O.W., Hawkins D.E.D.P., Ker D.S., Wang B., Turtle L., Subramaniam K., Thomson P., Zhang P., Dold C., Ratcliff J., Simmonds P., de Silva T., Sopp P., Wellington D., Rajapaksa U., Chen Y.L., Salio M., Napolitani G., Paes W., Borrow P., Kessler B.M., Fry J.W., Schwabe N.F., Semple M.G., Baillie J.K., Moore S.C., Openshaw P.J.M., Ansari M.A., Dunachie S., Barnes E., Frater J., Kerr G., Goulder P., Lockett T., Levin R., Zhang Y., Jing R., Ho L.P.; Oxford Immunology Network Covid-19 Response T cell Consortium; ISARIC4C Investigators; Cornall R.J., Conlon C.P., Klenerman P., Sreaton G.R., Mongkolsapaya J., McMichael A., Knight J.C., Ogg G., Dong T. Broad and strong memory CD4⁺ and CD8⁺ T cells induced by SARS-CoV-2 in UK convalescent individuals following COVID-19. *Nat. Immunol.*, 2020, Vol. 21, no. 11, pp. 1336-1345.
24. Planas D., Veyer D., Baidaliuk A., Staropoli I., Guivel-Benhassine F., Rajah M.M., Planchais C., Porrot F., Robillard N., Puech J., Prot M., Gallais F., Gantner P., Velay A., Le Guen J., Kassis-Chikhani N., Edriss D., Belec L., Seve A., Courtellemont L., Péré H., Hocqueloux L., Fafi-Kremer S., Prazuck T., Mouquet H., Bruel T., Simon-Lorière E., Rey F.A., Schwartz O. Reduced sensitivity of SARS-CoV-2 variant Delta to antibody neutralization. *Nature*, 2021, Vol. 596, no. 7871, pp. 276-280.
25. 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., Ollmann Saphire E., 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.
26. Saeys Y., van Gassen S., Lambrecht B.N. Computational flow cytometry: helping to make sense of high-dimensional immunology data. *Nat. Rev. Immunol.*, 2016, Vol. 16, no. 7, pp. 449-462.
27. Sallusto F., Geginat J., Lanzavecchia A. Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance. *Annu. Rev. Immunol.*, 2004, Vol. 22, pp. 745-763.

28. Schulien I., Kemming J., Oberhardt V., Wild K., Seidel L.M., Killmer S., Sagar, Daul F., Salvat Lago M., Decker A., Luxemburger H., Binder B., Bettinger D., Sogukpinar O., Rieg S., Panning M., Huzly D., Schwemmler M., Kochs G., Waller C.F., Nieters A., Duerschmied D., Emmerich F., Mei H.E., Schulz A.R., Llewellyn-Lacey S., Price D.A., Boettler T., Bengsch B., Thimme R., Hofmann M., Neumann-Haefelin C. Characterization of pre-existing and induced SARS-CoV-2-specific CD8⁺ T cells. *Nat. Med.*, 2021, Vol. 27, no. 1, pp. 78-85.
29. Sekine T., Perez-Potti A., Rivera-Ballesteros O., Strålin K., Gorin J.B., Olsson A., Llewellyn-Lacey S., Kamal H., Bogdanovic G., Muschiol S., Wullimann D.J., Kammann T., Emgård J., Parrot T., Folkesson E.; Karolinska COVID-19 Study Group; Rooyackers O., Eriksson L.I., Henter J.I., Sönnnerborg A., Allander T., Albert J., Nielsen M., Klingström J., Gredmark-Russ S., Björkström N.K., Sandberg J.K., Price D.A., Ljunggren H.G., Aleman S., Buggert M. Robust T cell immunity in convalescent individuals with asymptomatic or mild COVID-19. *Cell*, 2020, Vol. 183, no. 1, pp. 158-168.
30. Sibbertsen F., Glau L., Paul K., Mir T.S., Gersting S.W., Tolosa E., Dunay G.A. Phenotypic analysis of the pediatric immune response to SARS-CoV-2 by flow cytometry. *Cytometry Part A*, 2022, Vol. 101, no. 3, pp. 220-227.
31. Swadling L., Maini M.K. T cells in COVID-19-united in diversity. *Nat. Immunol.*, 2020, Vol. 21, no. 11, pp. 1307-1308.
32. Tan A.T., Linster M., Tan C.W., Le Bert N., Chia W.N., Kunasegaran K., Zhuang Y., Tham C.Y.L., Chia A., Smith G.J.D., Young B., Kalimuddin S., Low J.G.H., Lye D., Wang L.F., Bertoletti A. Early induction of functional SARS-CoV-2-specific T cells associates with rapid viral clearance and mild disease in COVID-19 patients. *Cell Rep.*, 2021, Vol. 34, no. 6, 108728. doi: 10.1016/j.celrep.2021.108728.
33. Wang M., Zhang L., Li Q., Wang B., Liang Z., Sun Y., Nie J., Wu J., Su X., Qu X., Li Y., Wang Y., Huang W. Reduced sensitivity of the SARS-CoV-2 Lambda variant to monoclonal antibodies and neutralizing antibodies induced by infection and vaccination. *Emerg. Microbes Infect.*, 2022, Vol. 11, no. 1, pp. 18-29.

Авторы:

Владимиров И.С. — аналитик 2-й категории отдела медицинской геномики ФГБУ «Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью» Федерального медико-биологического агентства, Москва, Россия

Жданова А.С. — аналитик 2-й категории отдела анализа и прогнозирования медико-биологических рисков здоровью ФГБУ «Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью» Федерального медико-биологического агентства, Москва, Россия

Мухин В.Е. — к.м.н., заместитель начальника отдела анализа и прогнозирования медико-биологических рисков здоровью ФГБУ «Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью» Федерального медико-биологического агентства, Москва, Россия

Authors:

Vladimirov I.S., The 2nd Category Analyst, Medical Genomics Department, Centre for Strategic Planning and Management of Biomedical Health Risks, Moscow, Russian Federation

Zhdanova A.S., The 2nd Category Analyst, Department of Analysis and Forecasting of Biomedical Health Risks, Centre for Strategic Planning and Management of Biomedical Health Risks, Moscow, Russian Federation

Mukhin V.E., PhD (Medicine), Deputy Head, Department of Analysis and Forecasting of Biomedical Health Risks, Centre for Strategic Planning and Management of Biomedical Health Risks, Moscow, Russian Federation

Макаров В.В. — к.б.н., начальник отдела анализа и прогнозирования медико-биологических рисков здоровью ФГБУ «Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью» Федерального медико-биологического агентства, Москва, Россия

Юдин В.С. — к.б.н., начальник отдела медицинской геномики ФГБУ «Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью» Федерального медико-биологического агентства, Москва, Россия

Краевой С.А. — д.м.н., первый заместитель генерального директора ФГБУ «Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью» Федерального медико-биологического агентства, Москва, Россия

Makarov V.V., PhD (Biology), Head, Department of Analysis and Forecasting of Biomedical Health Risks, Centre for Strategic Planning and Management of Biomedical Health Risks, Moscow, Russian Federation

Yudin V.S., PhD (Biology), Head, Department of Medical Genomics, Centre for Strategic Planning and Management of Biomedical Health Risks, Moscow, Russian Federation

Kraevoy S.A., PhD, MD (Medicine), 1st Deputy General Director, Centre for Strategic Planning and Management of Biomedical Health Risks, Moscow, Russian Federation

Поступила 26.10.2023
Принята к печати 14.11.2023

Received 26.10.2023
Accepted 14.11.2023

ПСЕВДОНЕЙТРАЛИЗУЮЩИЙ ТЕСТ ДЛЯ ДОКЛИНИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ ВАКЦИН ПРОТИВ SARS-CoV-2

Черепович Б.С.¹, Кудряшова А.М.¹, Карташова Н.П.¹, Грачева А.В.¹, Мануйлов В.А.², Ленева И.А.¹, Борисова О.В.¹, Свитич О.А.¹

¹ ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова», Москва, Россия

² ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Резюме. Цель данного исследования — оценка эффективности конкурентного иммуноферментного метода, определяющего антитела, специфически связывающие рецептор-связывающий домен субъединицы S1 шиповидного белка коронавируса SARS-CoV-2 и блокирующие образование инициаторного инфицирующего комплекса между RBD и ангиотензин-превращающим ферментом 2 (псевдонейтрализующий тест, ПНТ) на стадии доклинических исследований вакцины против SARS-CoV-2.

Исследовали 37 сывороток крови животных (8 коров, 10 собак, 19 трансгенных мышей линии B6.Cg-Tg(K18-ACE2)2Prlmn/HEMI Hemizygous for Tg(K18-ACE2)2Prlmn, самки и самцы (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, США)), иммунизированных кандидатными вакцинными препаратами против COVID-19, содержащими белок Spike SARS-CoV-2. В данном исследовании использовали 3 метода определения антител к вирусу SARS-CoV-2, а именно: 1) псевдонейтрализующий тест (ПНТ) для выявления антител, блокирующих взаимодействие RBD и ACE-2; 2) реакцию нейтрализации (РН) для выявления вируснейтрализующих антител и 3) твердофазный иммуноферментный анализ для определения антител класса G к RBD SARS-CoV-2. Результаты выражались, соответственно, в виде коэффициента подавления (КП), титра вируснейтрализующих антител (ВНА) и индекса позитивности (ИП).

Полученные данные показывают выраженную, статистически значимую корреляцию между результатами, полученными иммуноферментными методами с титрами ВНА, определенными в вирусологической РН в исследуемых группах животных. Так, коэффициент Спирмена, определенный для корреляции между титрами ВНА и КП, составил, соответственно, 0,9151; 0,8085 и 0,9207 для собак, трансгенных мышей и коров. Коэффициент Спирмена для титров ВНА и ИП составил 0,8854 и 0,8955 для собак и трансгенных мышей. Таким образом, для целей оценки иммуногенности вакцинных препаратов в настоящем исследовании, адекватными и безопасными аналогами РН являются оба метода — ИФА для определения IgG к RBD и ПНТ для определения антител, блокирующих образование комплекса между RBD и ACE-2. Однако преимуществом ПНТ является его универсальность, исклю-

Адрес для переписки:

Черепович Богдан Сергеевич
ФГБНУ «Научно-исследовательский институт
вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова»
115088, Россия, Москва, ул. 1-я Дубровская, 15.
Тел.: 8 (495) 674-54-97.
E-mail: bogdancherepovich@mail.ru

Address for correspondence:

Bogdan S. Cherepovich
I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera
15 1st Dubrovskaya St
Moscow
115088 Russian Federation
Phone: +7 (495) 674-54-97.
E-mail: bogdancherepovich@mail.ru

Образец цитирования:

Б.С. Черепович, А.М. Кудряшова, Н.П. Карташова, А.В. Грачева, В.А. Мануйлов, И.А. Ленева, О.В. Борисова, О.А. Свитич «Псевдонейтрализующий тест для доклинических исследований вакцин против SARS-CoV-2» // Медицинская иммунология, 2024. Т. 26, № 3. С. 569-576. doi: 10.15789/1563-0625-PTF-2905

© Черепович Б.С. и соавт., 2024

Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

B.S. Cherepovich, A.M. Kudryashova, N.P. Kartashova, A.V. Gracheva, V.A. Manuilov, I.A. Leneva, O.V. Borisova, O.A. Svitich "Pseudoneutralizing test for preclinical studies of vaccines against SARS-CoV-2", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2024, Vol. 26, no. 3, pp. 569-576. doi: 10.15789/1563-0625-PTF-2905

© Cherepovich B.S. et al., 2024

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

DOI: 10.15789/1563-0625-PTF-2905

чающая необходимость использования различных конъюгатов для выявления антител в сыворотках крови разных видов животных.

Данные, полученные нами для образцов трех видов животных (трансгенных мышей, собак и коров), хорошо соотносятся с аналогичными, полученными нами и другими исследователями для сывороток крови людей и демонстрирующими высокую корреляцию между результатами ПНТ-подобных конкурентных тестов для определения антител, блокирующих образование комплекса RBD и ACE-2, с результатами определения ВНА в вирусологической РН. Следовательно, предлагаемый в настоящей работе ПНТ может найти применение при проведении доклинических и клинических испытаний кандидатных вакцинных и лекарственных препаратов.

Ключевые слова: COVID-19, SARS-CoV-2, твердофазный ИФА, вируснейтрализующие антитела, псевдонейтрализующий тест, сыворотки крови животных

PSEUDONEUTRALIZING TEST FOR PRECLINICAL STUDIES OF VACCINES AGAINST SARS-CoV-2

Cherepovich B.S.^a, Kudryashova A.M.^a, Kartashova N.P.^a,
Gracheva A.V.^a, Manuilov V.A.^b, Leneva I.A.^a, Borisova O.V.^a,
Svitich O.A.^a

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

^b N. Gamaleya Research Center of Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation

Abstract. The purpose of this study was to evaluate efficiency of a competitive enzyme immunoassay which specifically detects antibodies that recognize the receptor-binding domain at the S1 subunit of SARS-CoV-2 coronavirus spike protein and block the formation of initiator infection complex between RBD and angiotensin-converting enzyme 2 (pseudo-neutralizing test, PNT) being applied at the stage of preclinical studies of anti-SARS-CoV-2 vaccine.

We studied 37 animal blood sera (8 cows, 10 dogs) as well as 19 male and female transgenic mice of the B6.Cg-Tg(K18-ACE2)2PrImn/HEMI line hemizygous for Tg(K18-ACE2)2PrImn (Jackson Immunoresearch, West Grove, PA, USA)) immunized with candidate COVID-19 vaccine preparations containing SARS-CoV-2 Spike protein. In this study, 3 techniques were used for detection of antibodies to SARS-CoV-2 virus, as follows: 1) a pseudo-neutralizing test (PNT) to detect antibodies that block interaction between RBD and ACE-2; 2) neutralization test (RN) to detect virus-neutralizing antibodies, and 3) enzyme-linked immunosorbent assay to detect class G antibodies to RBD SARS-CoV-2. The results were expressed, respectively, as the suppression quotients (SC), titers of virus-neutralizing antibodies (VNA), and the positivity index (IP).

The data obtained show a pronounced, statistically significant correlation between the results obtained by immunoassay methods with VNA titers determined in the studied animals by the virological neutralization test. E.g., the Spearman correlation quotients for VNA and SC titers, were, respectively, 0.9151; 0.8085, and 0.9207 for dogs, transgenic mice and cows. The Spearman quotient for VNA and PI titers was 0.8854 and 0.8955 for dogs and transgenic mice. Thus, in order to evaluate immunogenicity of vaccine preparations in our study, both methods are adequate and safe analogues to RN-ELISA for determination of IgG to RBD and PNT aiming for detection of antibodies blocking the formation of RBD/ACE-2 complex. However, the advantage of PNT is its versatility, eliminating the need to use different conjugates to detect antibodies in blood sera of different animal species.

The data obtained for samples of three animal species (transgenic mice, dogs and cows) well agree with similar data obtained by us and other researchers for human blood sera, thus demonstrating high correlation between the results of PNT-like competitive tests to determine antibodies that block the formation of the RBD/ACE-2 complex, with VNA results in virologic neutralization test (RN). Therefore, the proposed PNT technique may be used in preclinical and clinical trials of candidate vaccines and drugs.

Keywords: COVID-19, SARS-CoV-2, solid-phase ELISA, virus-neutralizing antibodies, pseudo-neutralizing test, blood serum, animals

Введение

Титр вируснейтрализующих антител (ВНА) является основным серологическим параметром, используемым для оценки эффективности иммунизации против SARS-CoV-2 [6, 9]. Титр ВНА определяется при помощи реакции нейтрализации (РН), результатом которой является последнее разведение анализируемой сыворотки, в котором антитела предотвращают репликацию живого вируса в перmissive для него компетентной культуре клеток [2]. Метод является трудозатратным и требует соблюдения условий биобезопасности. В связи с этим предпринимаются попытки создания эффективного и безопасного метода определения ВНА без использования живого вируса.

В ранее опубликованной нами работе [7] сыворотки крови пациентов, иммунизированных вакциной «Спутник V» [6], были протестированы параллельно в РН на культуре клеток Vero [4] и в псевдонейтрализующем тесте (ПНТ) [7]. ПНТ — конкурентный иммуноферментный метод, позволяющий определять антитела, специфически связывающие RBD-домен (рецептор-связывающий домен субъединицы S1 шиповидного белка) коронавируса SARS-CoV-2 и блокирующие образование инициаторного инфицирующего комплекса между RBD и белком клеток человека ACE2 (ангиотензин-превращающий фермент 2). Коэффициент корреляции между титрами, полученный для ПНТ и РН, составил 0,86 (95% ДИ: 0,79–0,90, $p < 0,0001$) [7], что указывает на то, что ПНТ является привлекательной альтернативой классической вирусологической РН. Метод ПНТ не различает изотипы иммуноглобулинов (IgG, IgM и пр.) и определяет наличие в образце любых антител или препаратов, которые обладают нейтрализующим действием в отношении образования комплекса RBD-ACE2. Важным моментом является то, что твердофазный иммуноферментный анализ обладает ценовой доступностью и высокой пропускной способностью. Кроме того, поскольку ПНТ не является видоспецифичным (определяет ВНА любых иммунных к SARS-CoV-2 животных), он выглядит особенно перспективным для применения в рамках доклинических исследований (ДКИ) вакцин против SARS-CoV-2 на животных моделях.

В настоящем исследовании мы приводим сравнительный анализ данных, полученных в классической РН и в ПНТ для образцов сывороток крови животных (трансгенных мышей, коров и собак) на стадии ДКИ экспериментальных вакцинных препаратов против COVID-19, содержащих белок Spike SARS-CoV-2.

Материалы и методы

Сыворотки животных

Исследовали 37 сывороток крови животных (8 коров, 10 собак, 19 трансгенных мышей линии B6.Cg-Tg(K18-ACE2)2PrImn/HEMI Hemizygous for Tg(K18-ACE2)2PrImn, самки и самцы (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, США)), иммунизированных кандидатными вакцинными препаратами против COVID-19, содержащими белок Spike SARS-CoV-2. Образцы предоставлены разработчиком указанных препаратов ООО «Фирн М» (Россия). Сыворотки аликвотировали по 100 мкл и хранили при -20°C . Все эксперименты проведены в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» (Приложение к приказу Министерства здравоохранения СССР от 12.08.1977 № 755) и «Европейской конвенцией о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях» от 18.03.1986.

Реакция нейтрализации

Использовали лабораторный штамм SARS-CoV-2 Dubrovka (GenBank: MW514307.1), выделенный из назофарингеального мазка больного COVID-19 на культуре клеток Vero CCL81 (ATCC) из коллекции НИИВС им. И.И. Мечникова. Для проведения РН клетки Vero CCL81 предварительно культивировали в 96-луночных планшетах при 37°C в питательной среде DMEM на основе буфера Эрла (НПП «ПанЭко», Россия) с добавлением 5% эмбриональной телячьей сыворотки (Gibco, США), 300 мкг/мл L-глутамина (НПП «ПанЭко», Россия), 40 мкг/мл гентамицина (НПП «ПанЭко», Россия) в атмосфере с 5% CO_2 в течение 72 часов до образования монослоя.

Перед постановкой РН образцы сывороток размораживали, прогревали при 56°C в течение 30 минут, готовили последовательные двукратные разведения средой для культивирования без эмбриональной сыворотки. Разведения сывороток смешивали с равным объемом вирусного материала SARS-CoV-2 в титре $2 \cdot 10^3$ ТЦД₅₀/мл в той же среде. Из планшета с 3-дневным монослоем клеток Vero удаляли среду, в лунки вносили смесь вируса и сыворотки в 4 повторах по 100 мкл (доза вируса — 100 ТЦД₅₀ на лунку) в разведении 1/20–1/2056 и инкубировали в течение 5 сут. при 37°C в атмосфере с 5% CO_2 . В качестве контролей использовали: клеточный контроль (незараженная клеточная культура), вирусный контроль (клетки, зараженные рабочим разведением вируса), контроль сыворотки (сыворотка в разведении 1:20), контроль дозы (пятикратные разведения вируса). Учет результата РН проводили визуально путем микроскопического исследования клеток. При визуальном учете нейтрализу-

ющим титром сыворотки (титром ВНА) считали обратное значение ее последнего разведения, в котором признаков ЦПД не обнаруживалось в 2 или более лунках.

Определения антител класса G к RBD SARS-CoV-2

Рекомбинантный антиген RBD SARS-CoV-2 (ООО «Хайтест», Россия, кат. № 8COV1) в концентрации 2 мкг/мл в 100 мМ карбонатно-бикарбонатном буфере (pH 9,6) вносили по 100 мкл в лунки 96-луночного планшета (Corning, США, кат. №2592) и выдерживали в течение 18 часов при температуре 4–8 °С. Затем удаляли раствор из лунок планшет, планшеты промывали 1 раз дистиллированной водой и вносили по 150 мкл блокирующего раствора, представляющего собой 0,02 М фосфатный буферный раствор, содержащий 5% сахарозы, 0,09% казеината натрия, 0,05% Tween 20. После инкубирования планшета в течение 1,5 часов при комнатной температуре удаляли блокирующий раствор и высушивали лунки планшета (иммуносorbента).

При проведении анализа в лунки иммуносorbента вносили образцы сывороток в разведении 1/100 в 0,02 М фосфатном буферном растворе (pH 7,2), содержащем 0,2% бычьего сывороточного альбумина и 0,05% Tween 20. После инкубирования в течение 30 минут при 37 °С и отмывки вносили для определения антител в сыворотках крови мышей 100 мкл конъюгата антител к IgG мыши с пероксидазой хрена (ООО «ИМТЕК», Россия); к сыворотке собак – 100 мкл конъюгата белка А с пероксидазой (Sigma-Aldrich, Германия) (в сыворотках коров IgG не определяли, см. ниже). Повторяли этап инкубирования и вносили по 100 мкл 33 мМ цитратного буферного раствора pH 4,0, содержащего 0,01% перекиси водорода и 0,5 мМ 3,3',5,5'-тетраметилбензидина. Через 15 мин реакцию останавливали добавлением 100 мкл 2N серной кислоты, измеряли оптическую плотность (ОП) в двухволновом режиме при основной длине волны 450 нм и длине волны сравнения 680 нм.

Результаты выражали в виде индекса позитивности (ИП):

$$\text{ИП} = \text{ОП}_{\text{образца}} / \text{ОП}_{\text{порог.}}$$

где $\text{ОП}_{\text{порог.}} = \text{ОП}_{\text{ср. К-}} + 3\sigma$, $\text{ОП}_{\text{ср. К-}}$ – среднее арифметическое значение регистрируемого сигнала для выборки образцов неиммунизированных животных, σ – стандартное отклонение. Образец считали содержащим антитела к RBD Spike SARS-CoV-2 при $\text{ИП}_{\text{Побр.}} \geq 1$.

Выявление антител, блокирующих взаимодействие RBD и ACE-2 (псевдонейтрализующий тест)

Рекомбинантный антиген ACE-2 (Vazyme Technologies, Китай, кат. № CG206) в концентрации 2 мкг/мл в 100 мМ карбонатно-бикарбонат-

ном буфере pH 9,6 вносили по 100 мкл в лунки планшет и выдерживали в течение 18 часов при температуре 4–8 °С. Затем удаляли раствор из лунок планшет, планшеты промывали 1 раз дистиллированной водой, вносили по 150 мкл блокирующего раствора, представляющего собой 0,02 М фосфатный буферный раствор, содержащий 5% сахарозы, 0,09% казеината натрия, 0,05% Tween 20. После инкубирования планшета в течение 1,5 часов при комнатной температуре, удаляли блокирующий раствор и высушивали лунки иммуносorbента.

При проведении анализа в лунки другого (чистого) планшета вносили по 50 мкл образцов сывороток в разведении 1/10 в 0,02 М фосфатном буферном растворе pH 7,2, содержащем 0,2% бычьего сывороточного альбумина, 0,05% Tween 20, а также 50 мкл рекомбинантного белка Spike, конъюгированного с пероксидазой хрена (Vazyme Technologies, Китай, кат. № CG204H-00H-C1) в том же буферном растворе в разведении 1/150. После инкубирования в течение 30 минут при 37 °С смесь переносили в лунки иммуносorbента и инкубировали еще 30 минут при 37 °С. Внесение субстратной буферной смеси, остановку реакции и измерение ОП проводили аналогично описанному для определения антител класса G к RBD SARS-CoV-2.

Для каждого образца рассчитывали коэффициент подавления (КП, %) по формуле:

$$\text{КП} = \frac{\text{ОП}_{\text{ср. (К-)}} - \text{ОП}_{\text{Побр.}}}{\text{ОП}_{\text{ср. (К-)}}} \times 100\%,$$

где $\text{ОП}_{\text{ср. (К-)}}$ – среднее арифметическое значение ОП для группы неиммунизированных животных; $\text{ОП}_{\text{Побр.}}$ – значение ОП для тестируемого образца. Образец считали содержащим антитела, блокирующие взаимодействие RBD и ACE-2, в случае $\text{КП} \geq \text{КП}_{\text{отр. ср.}} - 3\sigma$, где $\text{КП}_{\text{отр. ср.}}$ – среднее арифметическое значение КП для группы неиммунизированных животных, σ – стандартное отклонение.

Статистическая обработка данных

Для оценки корреляции между количественными характеристиками, полученными разными методами, использовали коэффициент ранговой корреляции Спирмена. Доверительный интервал оценивали при $p < 0,05$. Полученные данные анализировали с помощью программного обеспечения Microsoft Excel, GraphPad Prism.

Требования к безопасности работ

Все работы с вирусом SARS-CoV-2 проводили в условиях, отвечающих требованиям безопасности работ с патогенными биологическими объектами II группы патогенности. Сотрудники, работающие с вирусом, прошли инструктаж по технике безопасности и имеют действующее

удостоверение о повышении квалификации по программе «Бактериология. Вирусология. Биологическая безопасность», выданное ФКУН РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора.

Результаты

Образцы сывороток крови животных протестировали параллельно в вирусологической РН и иммуноферментном ПНТ. Для собак и коров анализируемые парные образцы получены от животных до и после иммунизации (табл. 1). В случае трансгенных мышей в эксперименте участвовали две группы животных — контрольная группа и группа вакцинированных животных (табл. 2). Для образцов сывороток мышей и собак также определяли антитела класса G к RBD SARS-CoV-2

(табл. 1, 2). Результаты представлены в таблицах 1 и 2 и на рисунках 1 и 2. Результаты статистической обработки результатов, представленных на рисунках 1 и 2 (корреляции между измеряемыми параметрами) суммированы в таблице 3.

Обсуждение

Полученные данные (рис. 1, 2; табл. 3) показывают выраженную, статистически значимую корреляцию между КП и ИП, полученных иммуноферментными методами, с титрами ВНА, определенными в вирусологической РН в исследуемых группах. Таким образом, для целей оценки иммуногенности вакцинных препаратов в настоящем исследовании, адекватными (и безопасными) аналогами РН являются оба метода —

ТАБЛИЦА 1. ОПРЕДЕЛЕНИЕ АНТИТЕЛ МЕТОДАМИ ИФА, ПНТ И РН В СЫВОРОТКЕ КРОВИ СОБАК И КОРОВ

TABLE 1. DETERMINATION OF ANTIBODIES BY ELISA, PNT AND RN IN THE BLOOD SERUM OF DOGS AND COWS

Собаки Dogs						
№ No.	До имм. Before imm.	После имм. After imm.	До имм. Before imm.	После имм. After imm.	До имм. Before imm.	После имм. After imm.
	IgG к RBD, ИП IgG to RBD, PI	IgG к RBD, ИП IgG to RBD, PI	КП, % SC, %	КП, % SC, %	ВНА, титр VNA, titer	ВНА, титр VNA, titer
1	1,1	27,1	0,0	98,9	< 10	640,0
2	1,9	3,3	8,6	76,4	< 10	20,0
3	0,3	30,8	6,9	97,6	< 10	1280,0
4	1,1	5,2	4,0	78,4	< 10	20,0
5	0,7	12,5	0,0	86,7	< 10	40,0
6	0,6	10,0	9,5	88,8	< 10	40,0
7	0,3	7,2	0,0	84,9	< 10	40,0
8	0,5	24,2	3,1	84,5	< 10	20,0
9	0,4	13,3	0,0	91,8	< 10	20,0
10	0,3	7,2	4,1	68,0	< 10	10,0
Коровы Cows						
1	—	—	2,3	72,8	< 10	15,0
2	—	—	3,1	89,7	< 10	60,0
3	—	—	3,8	94,1	< 10	80,0
4	—	—	0,9	66	< 10	15,0
5	—	—	0,0	43,8	< 10	0,0
6	—	—	2,6	73,6	< 10	60,0
7	—	—	2,1	70,9	< 10	30,0
8	—	—	0,0	30,4	< 10	20,0

Примечание. ИП — индекс позитивности; КП — коэффициент подавления; ВНА — вируснейтрализующие антитела, см. раздел «Материалы и методы» для определения; для сывороток коров определение IgG к RBD не проводили.

Note. PI, positivity index; SC, suppression coefficient; VNA, virus neutralizing antibody, see the section "Materials and methods" for determination; for cow serums, IgG to RBD was not determined.

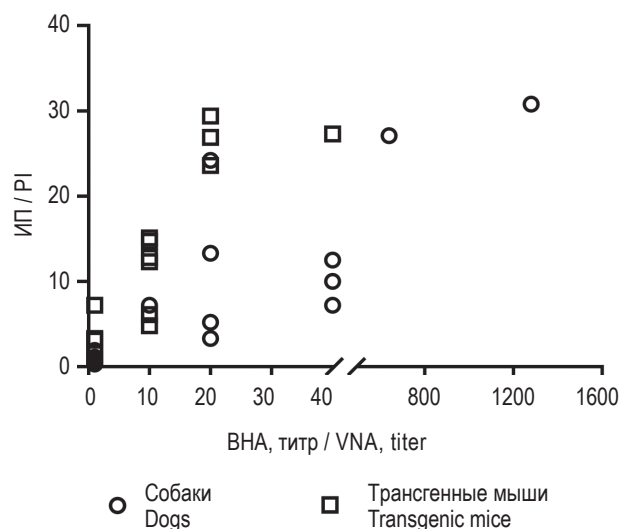


Рисунок 1. График корреляция между концентрацией IgG к RBD (выраженном в ИП, ось X) и титром ВНА, полученным в РН (ось Y) в исследуемых сыворотках собак и трансгенных мышей линии B6.Cg-Tg(K18-ACE2)2PrImn/HEMI Hemizygous for Tg(K18-ACE2)2PrImn
Примечание. Коэффициент корреляции между измеряемыми параметрами представлен в таблице 3.

Figure 1. Plot of the correlation between the concentration of IgG to RBD (expressed in PI, x-axis) and the VHA titer obtained in RN (y-axis) in the studied sera of dogs and transgenic mice B6.Cg-Tg(K18-ACE2)2PrImn/HEMI Hemizygous for Tg(K18-ACE2)2PrImn

Note. The correlation coefficient between the measured parameters is presented in Table 3.

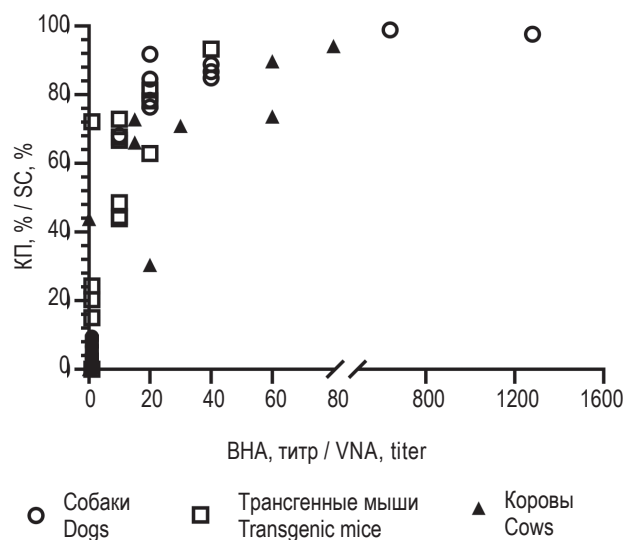


Рисунок 2. График корреляции между результатами ПНТ (выражены в КП,%, ось X) и титром ВНА, полученным в РН (ось Y) исследуемых сывороток собак, мышей и коров

Figure 2. Plot of the correlation between SC (X-axis) and VHA titer obtained in the RN (Y-axis) of the dog, mouse and cow sera tested

ТАБЛИЦА 2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ АНТИТЕЛ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ТРАНСГЕННЫХ МЫШЕЙ ЛИНИИ B6.Cg-Tg(K18-ACE2)2PrImn/HEMI HEMIZYGOUS FOR Tg(K18-ACE2)2PrImn МЕТОДАМИ ИФА, ПНТ И РН

TABLE 2. DETERMINATION OF ANTIBODIES IN THE BLOOD SERUM OF TRANSGENIC MICE B6.Cg-Tg(K18-ACE2)2PrImn/HEMI HEMIZYGOUS FOR Tg(K18-ACE2)2PrImn BY ELISA, PNT, AND RN

Группы Groups	№ живот- ного Animal No.	IgG к RBD, ИП IgG to RBD, IP	ВНА, титр VNA, titer	КП, % SC, %
Контроль Control	1-4	0,52-0,75	< 10	2,7-8,1
Опыт Experiment	5	12,3	10	43,9
	6	14,7	10	66,7
	7	6,1	10	67,7
	8	23,6	20	81,4
	9	27,3	40	93,3
	10	3,1	< 10	72,1
	11	15,1	10	72,9
	12	29,4	20	62,9
	13	12,8	10	48,5
	14	7,2	< 10	24,3
	15	3,3	< 10	20,3
	16	0,8	< 10	15
	17	26,9	20	78,2
	18	1,6	< 10	0
	19	4,8	10	44,5

Примечание. См. примечание к таблице 1.

Note. As for Table 1.

ИФА для определения IgG к RBD и ПНТ для определения антител, блокирующих образование комплекса между RBD и ACE-2. Однако преимуществом ПНТ является его универсальность, исключая необходимость использования различных конъюгатов для выявления антител в сыворотках крови разных видов животных.

Данные, полученные нами для образцов трех видов животных (трансгенных мышей, собак и коров), хорошо соотносятся с аналогичными, полученными нами и другими исследователями для сывороток крови людей и демонстрирующими высокую корреляцию между результатами ПНТ-подобных конкурентных тестов для определения антител, блокирующих образование комплекса RBD и ACE-2, с результатами определения ВНА в вирусологической РН [1, 5, 7, 8].

ТАБЛИЦА 3. КОЭФФИЦИЕНТЫ КОРРЕЛЯЦИИ МЕЖДУ ИЗУЧАЕМЫМИ ПАРАМЕТРАМИ, РАССЧИТАННЫЕ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ КРИТЕРИЯ СПИРМЕНА

TABLE 3. CORRELATION COEFFICIENTS BETWEEN THE STUDIED PARAMETERS CALCULATED USING SPEARMAN'S TEST

	Титр ВНА v. КП, собаки Titer VNA v. SC, dogs	Титр ВНА, v. КП, мыши Titer VNA v. SC, mice	Титр ВНА v. КП, коровы Titer VNA v. SC, cows	Титр ВНА v. ИП, собаки Titer VNA v. PI, dogs	Титр ВНА v. ИП, мыши Titer VNA v. PI, mice
Коэф. корреляции Spearman r	0,9151	0,8085	0,9207	0,8854	0,8955
95% доверительный интервал 95% confidence interval	0,7890-0,9672	0,5499-0,9257	0,7662-0,9746	0,7215-0,9553	0,7373-0,9606
P (two-tailed)	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001

Следует отметить, что в настоящем исследовании анализировали образцы сыворотки крови животных, иммунизированных кандидатными вакцинными препаратами против COVID-19, содержащими белок Spike SARS-CoV-2 варианта «Ухань». Соответственно, в разработанном псевдонейтрализующем тесте использовался рекомбинантный антиген RBD Spike SARS-CoV-2 (HyTest, RF, Cat.No.8COV1) соответствующий также варианту «Ухань». Описываемый вариант ПНТ, однако, позволял выявлять антитела и в образцах людей, перенесших коронавирусную инфекцию вариан-

та «Омикрон» (результаты не опубликованы), однако для обоснования универсальности метода в отношении различных вариантов коронавирусов требуются дополнительные исследования.

Заключение

Предлагаемый в настоящей работе ПНТ может найти применение при проведении доклинических и клинических испытаний кандидатных вакцинных и лекарственных препаратов, а также для отбора плазмы доноров, переболевших COVID-19, собираемой в целях терапии [3, 9].

Список литературы / References

1. Adams O., Andrée M., Hermesen D., Lübke N., Timm J., Schaal H., Müller L. Comparison of commercial SARS-CoV-2 surrogate neutralization assays with a full virus endpoint dilution neutralization test in two different cohorts. *J. Virol. Methods*, 2022, Vol. 307, 114569. doi: 10.1016/j.jviromet.2022.114569.
2. Amanat F., White K.M., Miorin L., Strohmeier S., McMahon M., Meade P., Liu W.C., Albrecht R.A., Simon V., Martinez-Sobrido L., Moran T., García-Sastre A., Krammer F. An *in vitro* microneutralization assay for SARS-CoV-2 serology and drug screening. *Curr. Protoc. Microbiol.*, 2020, Vol. 58, no. 1, e108. doi: 10.1002/cpmc.108.
3. Benner S.E., Patel E.U., Laeyendecker O., Pekosz A., Littlefield K., Eby Y., Fernandez R.E., Miller J., Kirby C.S., Keruly M., Klock E., Baker O.R., Schmidt H.A., Shrestha R., Burgess I., Bonny T.S., Clarke W., Caturegli P., Sullivan D., Shoham S., Quinn T.C., Bloch E.M., Casadevall A., Tobian A.A.R., Redd A.D. SARS-CoV-2 antibody avidity responses in COVID-19 patients and convalescent plasma donors. *J. Infect. Dis*, 2020, Vol. 222, pp. 1974-1984.
4. Gushchin V.A., Dolzhikova I.V., Shchetinin A.M., Odintsova A.S., Siniavin A.E., Nikiforova M.A., Pochtovyi A.A., Shidlovskaya E.V., Kuznetsova N.A., Burgasova O.A., Kolobukhina L.V., Iliukhina A.A., Kovyrshina A.V., Botikov A.G., Kuzina A.V., Grousova D.M., Tikhvatulin A.I., Shcheblyakov D.V., Zubkova O.V., Karpova O.V., Voronina O.L., Ryzhova N.N., Akseanova E.I., Kunda M.S., Lioznov D.A., Danilenko D.M., Komissarov A.B., Tkachuk A.P., Logunov D.Y., Gintsburg A.L. Neutralizing activity of sera from Sputnik V-vaccinated people against variants of concern (VOC: B.1.1.7, B.1.351, P.1, B.1.617.2, B.1.617.3) and Moscow Endemic SARS-CoV-2 Variants. *Vaccines (Basel)*, 2021, Vol. 9, no. 7, 779. doi: 10.3390/vaccines9070779.
5. Kolesov D.E., Sinigubova M.V., Dayanova L.K., Dolzhikova I.V., Vorobiev I.I., Orlova N.A. Fast and accurate surrogate virus neutralization test based on antibody-mediated blocking of the interaction of ACE2 and SARS-CoV-2 spike protein RBD. *Diagnostics (Basel)*, 2022, Vol. 12, no. 2, 393. doi: 10.3390/diagnostics12020393.
6. Logunov D.Y., Dolzhikova I.V., Shcheblyakov D.V., Tikhvatulin A.I., Zubkova O.V., Dzharullaeva A.S., Kovyrshina A.V., Lubenets N.L., Grousova D.M., Erokhova A.S., Botikov A.G., Izhaeva F.M., Popova O., Ozharovskaya T.A., Esmagambetov I.B., Favorskaya I.A., Zrelkin D.I., Voronina D.V., Shcherbinin D.N., Semikhin A.S., Simakova Y.V., Tokarskaya E.A., Egorova D.A., Shmarov M.M., Nikitenko N.A., Gushchin V.A., Smolyarchuk E.A., Zyryanov S.K., Borisevich S.V., Naroditsky B.S., Gintsburg A.L.; Gam-COVID-Vac Vaccine Trial

Group. Safety and efficacy of an rAd26 and rAd5 vector-based heterologous prime-boost COVID-19 vaccine: an interim analysis of a randomised controlled phase 3 trial in Russia. *Lancet*, 2021, Vol. 397, no. 10275, pp. 671-681.

7. Manuylov V., Dolzhikova I., Kudryashova A., Cherepovich B., Kovyrshina A., Iliukhina A., Kharchenko O., Semashko M., Tkachuk A., Gushchin V., Borisova O. Simple ELISA methods to estimate neutralizing antibody Titers to SARS-CoV-2: IgG quantification, the avidity index, and the surrogate virus neutralization test. *Arch. Microbiol. Immunol.*, 2022, Vol. 6, pp. 213-220.

8. Taylor S.C., Hurst B., Martiszus I., Hausman M.S., Sarwat S., Schapiro J.M., Rowell S., Lituev A. Semi-quantitative, high throughput analysis of SARS-CoV-2 neutralizing antibodies: Measuring the level and duration of immune response antibodies post infection/vaccination. *Vaccine*, 2021, Vol. 39, no. 39, pp. 5688-5698.

9. Wajnberg A., Amanat F., Firpo A., Altman D.R., Bailey M.J., Mansour M., McMahon M., Meade P., Mendu D.R., Muellers K., Stadlbauer D., Stone K., Strohmeier S., Simon V., Aberg J., Reich D.L., Krammer F., Cordon-Cardo C. Robust neutralizing antibodies to SARS-CoV-2 infection persist for months. *Science*, 2020, Vol. 370, no. 6521, pp. 1227-1230.

Авторы:

Черепович Б.С. — младший научный сотрудник лаборатории генетики РНК-содержащих вирусов ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова», Москва, Россия

Кудряшова А.М. — научный сотрудник лаборатории медицинской биотехнологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова», Москва, Россия

Карташова Н.П. — научный сотрудник лаборатории экспериментальной вирусологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова», Москва, Россия

Грачева А.В. — научный сотрудник лаборатории молекулярной вирусологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова», Москва, Россия

Мануйлов В.А. — к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории трансляционной медицины ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Ленева И.А. — д.б.н., заведующая лабораторией экспериментальной вирусологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова», Москва, Россия

Борисова О.В. — к.х.н., заведующая лабораторией медицинской биотехнологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова», Москва, Россия

Свитич О.А. — д.м.н., член-корр. РАН, заведующая лабораторией молекулярной иммунологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова», Москва, Россия

Authors:

Cherepovich B.S., Junior Research Associate, Laboratory of Genetics of RNA-containing Viruses, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation

Kudryashova A.M., Research Associate, Laboratory of Medical Biotechnology, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation

Kartashova N.P., Research Associate, Laboratory of Experimental Virology, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation

Gracheva A.V., Research Associate, Laboratory of Molecular Virology, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation

Manuilov V.A., PhD (Biology), Senior Research Associate, Laboratory of Translational Medicine, N. Gamaleya Research Center of Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation

Leneva I.A., PhD, MD (Biology), Head, Laboratory of Experimental Virology, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation

Borisova O.V., PhD (Chemistry), Head, Laboratory of Medical Biotechnology, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation

Svitich O.A., PhD, MD (Medicine), Corresponding Member, Russian Academy of Sciences, Head, Laboratory of Molecular Immunology, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation

Поступила 23.08.2023

Отправлена на доработку 14.09.2023

Принята к печати 04.10.2023

Received 23.08.2023

Revision received 14.09.2023

Accepted 04.10.2023

ОПЫТ ПРИМЕНЕНИЯ ИММУНОМОДУЛИРУЮЩЕЙ ТЕРАПИИ В КОМПЛЕКСНОМ ЛЕЧЕНИИ НЕТЯЖЕЛОЙ ВНЕБОЛЬНИЧНОЙ ПНЕВМОНИИ И ЕЕ ОТДАЛЕННЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ

Костинов М.П.^{1, 2}, Гайнитдинова В.В.^{1, 2}, Кажарова С.В.¹,
Власенко А.Е.³, Полищук В.Б.¹, Аллабердина Д.У.⁴

¹ ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова», Москва, Россия

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

³ Новокузнецкий государственный институт усовершенствования врачей – филиал ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Министерства здравоохранения РФ, г. Новокузнецк, Россия

⁴ ФГБОУ ВО «Башкирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Уфа, Республика Башкортостан, Россия

Резюме. Большой вклад в патогенез внебольничной пневмонии (ВП) вносят снижение неспецифической резистентности организма, дисбаланс локального и системного иммунитета, нарушение процессов свободно-радикального окисления.

Цель – изучить эффективность включения иммуномодуляторов в комплексное лечение нетяжелой внебольничной пневмонии и оценить отдаленные эффекты проведенной терапии.

В исследование включены пациенты (n = 55) с нетяжелой формой ВП (41 (31-48) года, CRB-65 0,15 (0-1) балла). 1-я группа (контроль) получала только стандартную терапию ВП; в двух других группах одновременно со стандартной терапией назначали иммуномодуляторы: во 2-й группе – бактериальный лизат (БЛ), в 3-й группе – азоксимера бромид (АБ). Концентрация TNFα и IL-6 определялась в день обращения, на 13-й и 60-й дни наблюдения. В течение двух лет у этих же пациентов с перенесенной ВП (n = 55) изучалась частота инфекций нижних дыхательных путей (ИНДП).

У всех пациентов (n = 55) отмечались клинические проявления нетяжелой внебольничной пневмонии. Общая продолжительность всех симптомов была ниже в группах иммуномодуляторов, по сравнению с группой контроля: 12 (11-13) дней в группе БЛ (p < 0,001) и 12 (11-12) дней в группе АБ (p < 0,001), между собой группы вмешательства статистически значимо не различались (p = 0,36).

Адрес для переписки:

Гайнитдинова Вилия Вилевна
ФГБНУ «Научно-исследовательский институт
вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова»
105064, Россия, Москва, Малый Казенный пер., 5А.
Тел.: 8 (495) 708-35-76.
E-mail: gaynitdinova_v_v@staff.sechenov.ru

Address for correspondence:

Viliya V. Gainitdinova
I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera
5a Maly Kazenny Lane
Moscow
105064 Russian Federation
Phone: +7 (495) 708-35-76.
E-mail: gaynitdinova_v_v@staff.sechenov.ru

Образец цитирования:

М.П. Костинов, В.В. Гайнитдинова, С.В. Кажарова,
А.Е. Власенко, В.Б. Полищук, Д.У. Аллабердина
«Опыт применения иммуномодулирующей терапии
в комплексном лечении нетяжелой внебольничной
пневмонии и ее отдаленные результаты»
// Медицинская иммунология, 2024. Т. 26, № 3.
С. 577-590. doi: 10.15789/1563-0625-EOU-2871

© Костинов М.П. и соавт., 2024

Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

M.P. Kostinov, V.V. Gainitdinova, S.V. Kazharova,
A.E. Vlasenko, V.B. Polishchuk, D.U. Allaberdina
“Experience of using immunomodulatory therapy in the complex treatment
of mild community-acquired pneumonia and its long-term
results”, Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya
Immunologiya, 2024, Vol. 26, no. 3, pp. 577-590.
doi: 10.15789/1563-0625-EOU-2871

© Kostinov M.P. et al., 2024

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

DOI: 10.15789/1563-0625-EOU-2871

Концентрация TNF α , IL-6 на фоне терапии на 13-й и 60-й день снизилась у всех больных; у пациентов, получавших иммуномодуляторы, TNF α , IL-6 достоверно были ниже по сравнению с контролем. Динамика концентрации TNF α и IL-6 в группах на 60-й день исследования по сравнению с исходным уровнем показала снижение в группе БЛ на 85 (-89 – -82) % и 86 (-90 – -85) % ($p < 0,001$; $p = 0,001$); в группе АБ – на 82 (-86 – -80) % и 86 (-88 – -84) % ($p = 0,002$; $p = 0,007$). Интенсивность снижения концентрации IL-6 на 60-й день в группах БЛ и АБ не различалась ($p = 0,72$). Скорректированное на пол и возраст отношение шансов развития заболевания нижних дыхательных путей (в течение 2 лет после перенесенной ВП) в группе АБ составило 0,15 (0,02-0,93) ($p = 0,04$), что свидетельствует о его протективном эффекте.

Включение иммуномодуляторов в базисное лечение нетяжелой внебольничной пневмонии приводит к сокращению длительности симптомов, сопровождается улучшением профиля провоспалительных цитокинов. Отдаленные эффекты проведенной иммуномодулирующей терапии за 2 года наблюдения показали статистически значимо меньшую частоту инфекций нижних дыхательных путей в группе пациентов, получивших АБ.

Ключевые слова: нетяжелая внебольничная пневмония, бактериальный лизат, азоксимера бромид, концентрация TNF α , концентрация IL-6, отдаленные эффекты

EXPERIENCE OF USING IMMUNOMODULATORY THERAPY IN THE COMPLEX TREATMENT OF MILD COMMUNITY-ACQUIRED PNEUMONIA AND ITS LONG-TERM RESULTS

Kostinov M.P.^{a, b}, Gainitdinova V.V.^{a, b}, Kazharova S.V.^b, Vlasenko A.E.^c, Polishchuk V.B.^b, Allaberdina D.U.^d

^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 Novokuznetsk State Institute of Advanced Training of Doctors, Branch of the Russian Medical Academy of Continuing Professional Education, Novokuznetsk, Russian Federation

^d Bashkir State Medical University, Ufa, Republic of Bashkortostan, Russian Federation

Abstract. A decrease of nonspecific body resistance, an imbalance of local and systemic immunity and a free-radical oxidation abnormality substantially contribute to the pathogenesis of community-acquired pneumonia (CAP).

Purpose: To study the efficiency of including immunomodulators into the comprehensive treatment of non-severe community-acquired pneumonia and assess the long-term effects of the treatment conducted.

Patients ($n = 55$) with non-severe CAP (41 (31-48) years old, with CRB-65 score of 0.15 (0-1)) are included in the study. Group 1 (control) received only standard CAP therapy; the other two groups received immunomodulators concurrently with the standard therapy: bacterial lysate (BL) for group 2 and azoximer bromide (AzB) for group 3. TNF α and IL-6 concentration was determined on the day of visit, on day 13 and day 60 of follow-up. During 2 years, the incidence of low respiratory tract infections (LRTI) was studied in the same patients with CAP in past ($n = 55$).

All patients ($n = 55$) had clinical signs of non-severe community-acquired pneumonia. The overall duration of all symptoms was lower in immunomodulators groups as compared to the control group: 12 (11-13) days in BL group ($p < 0.001$) and 12 (11-12) days in AzB group ($p < 0.001$) with no statistically significant difference between intervention groups ($p = 0.36$). During treatment, TNF α and IL-6 concentration decreased on day 13 and day 60 in all patients; in patients who received immunomodulators, TNF α and IL-6 were reliably lower as compared to the control. Changes of TNF α and IL-6 concentration in the groups on day 60 of the study as compared to the baseline showed a decrease in BL group by 85 (-89 – -82) % and 86 (-90 – -85) % ($p < 0.001$; $p = 0.001$ and control); in AzB group by 82 (-86 – -80) % and 86 (-88 – -84) % ($p = 0.002$; $p = 0.007$ and control). Intensity of IL-6 concentration decrease on day 60 in BL and AzB groups did not differ ($p = 0.72$). Gender- and age-adjusted odds ratio for the development of low respiratory tract diseases (during 2 years after CAP) in AzB group was 0.15 (0.02-0.93) ($p = 0.04$) suggesting its protective effect.

Inclusion of immunomodulators in basic treatment of non-severe community-acquired pneumonia reduces duration of symptoms and is associated with improvement of the proinflammatory cytokine profile. In 2 years of follow-up, long-term effects of the immunomodulatory therapy showed statistically significant lower incidence of low respiratory tract infections in AzB group only.

Keywords: non-severe community-acquired pneumonia, immunomodulators, bacterial lysate, azoximer bromide, TNF α concentration, IL-6 concentration, long term effects

Введение

Внебольничная пневмония (ВП) является одной из актуальных проблем современной медицины, что обусловлено высокой заболеваемостью, существенным вкладом в структуру смертности населения и значительными затратами на оказание медицинской помощи при данной патологии [4, 13, 14, 21]. Чаще всего возбудителями внебольничной пневмонии являются *S. pneumoniae*, *M. pneumoniae*, *C. pneumoniae*, *H. influenza*, а также *S. aureus* и *L. pneumophila*. Большой вклад в патогенез заболевания вносит снижение неспецифической резистентности организма, дисбаланс локального и системного иммунитета, нарушение процессов свободно-радикального окисления [2, 18]. Опасность представляет все большее распространение антибиотикорезистентных штаммов, которые могут не только исказить иммунный ответ, но и приводить к формированию устойчивости к патогенетической терапии [6]. Это обосновывает необходимость комплексного подхода к лечению внебольничной пневмонии, включая использование иммунокорректирующих препаратов [7]. В настоящее время имеется положительный опыт использования азоксимера бромид (АБ) в комплексном лечении ряда острых и тяжелых хронических инфекционно-воспалительных процессов [11]. Азоксимера бромид (АБ), обладая выраженной иммуномодулирующей активностью. При его воздействии регистрируется усиление продукции провоспалительных цитокинов (интерлейкина (IL-1 β , IL-6), фактора некроза опухоли (TNF α) и интерферона (IFN α). Следствием активации клеток моноцитарно-макрофагального ряда и естественных киллеров является усиление функциональной активности как клеточного, так и гуморального иммунитета. Обсуждается также пролонгированный эффект [10].

Согласно результатам проведенных клинических исследований, большинство иммуномодулирующих препаратов другого класса — механических бактериальных лизатов, также демонстрируют превосходную безопасность и снижают активность проявления инфекций дыхательных путей (ИДП) [1]. При этом в ряде случаев их применение позволяло снизить количество назначаемых антибиотиков и других препаратов, с сохранением эффективности терапии [6]. Счи-

тается, что распознавание дендритными клетками бактериальных антигенов в составе подобных препаратов приводит к активации иммунного ответа и выработке антител В-клетками, также повышается фагоцитарная активность макрофагов, полиморфноядерных нейтрофилов, увеличивается продукция лизоцима и секреторного компонента IgA (sIgA), повышающие устойчивость организма [2, 9].

В то же время актуальной проблемой являются рецидивирующие инфекции дыхательных путей (ИРО) у взрослых, которые возникают вследствие дисбаланса между защитными механизмами легких и бактериальной нагрузкой. Антибактериальное лечение может временно восстановить равновесие между хозяином и бактериальной нагрузкой, но не предотвращает рецидив инфекции. Альтернативным подходом к предотвращению рецидива инфекции является включение в комплексное лечение ИМ, которые обеспечивают иммунную защиту от повторных бактериальных и вирусных инфекций [15].

На сегодняшний день исследования по изучению эффективности применения иммуномодулирующей терапии при внебольничной пневмонии в остром и отдаленном периодах разрознены и не всегда доказательны [3]. В связи с этим **целью нашей работы** стали изучение эффективности включения иммуномодуляторов в комплексное лечение нетяжелой внебольничной пневмонии и оценка отдаленных эффектов проведенной терапии.

Материалы и методы

Материалы исследования

Клинический набор материала проводился на базе Городской клинической больницы № 57 (Москва), городской клинической больницы № 1 (г. Нальчик), Республиканской клинической больницы Кабардино-Балкарской Республики (г. Нальчик).

В исследование включены взрослые пациенты (n = 55) с нетяжелой формой внебольничной пневмонии; при постановке диагноза и назначении лечения пневмонии руководствовались Федеральными клиническими рекомендациями по ведению взрослых больных внебольничной пнев-

монией (2010, 2021). Диагноз нетяжелой внебольничной пневмонии ставился на основании клинических, объективных данных (по крайней мере два критерия из следующих: лихорадка $\geq 38^\circ\text{C}$, кашель с мокротой, физикальные данные (укорочение перкуторного звука, фокус крепитации и/или мелкопузырчатые хрипы, жесткое бронхиальное дыхание), лейкоцитоза $> 10 \times 10^9$ и/или сдвига влево $> 10\%$ и подтверждался рентгенологически (наличие очагово-инфильтративных изменений не более чем в одном сегменте легкого). Оценка тяжести ВП проводилась по шкале CRB-65, при этом в исследование включались больные с результатом < 1 балла, что соответствует нетяжелому течению заболевания, лечение которого проводится в амбулаторных условиях [4, 13].

Критерии включения в исследование

Пациенты с нетяжелой формой внебольничной пневмонии, наблюдавшиеся и получавшие лечение амбулаторно; возраст ≥ 18 лет и ≤ 60 лет; добровольцы, способные выполнять требования протокола; письменное информированное согласие всех добровольцев на участие в клиническом исследовании.

Критерии исключения из исследования

Возраст < 18 лет и > 60 лет; инфильтрация легочной ткани более, чем в одном сегменте легкого; сопутствующие болезни органов дыхания (бронхиальная астма, хроническая обструктивная болезнь легких, бронхоэктазы, абсцесс легких, эмпиема плевры, активный туберкулез); тяжелые внелегочные сопутствующие заболевания (хроническая сердечная недостаточность, сахарный диабет, хроническая почечная и печеночная недостаточность, вирусные гепатиты В и С, злокачественные образования, иммунодефицитные состояния); добровольцы, получавшие препараты иммуноглобулина или переливание крови в течение последних трех месяцев до начала исследования; длительное применение (более 14 дней) иммунодепрессантов или других иммуномодулирующих препаратов в течение шести месяцев, предшествующих исследованию; хроническое злоупотребление алкоголем и/или употребление наркотиков; беременность и лактация; неспособность соблюдения пациентом условий протокола; отказ пациента от дальнейшего исследования.

Группы исследования

Всего было обследовано 55 человек. Путем случайного распределения пациенты были разделены на 3 группы: 1-я группа (контроль, $n = 15$) получала только стандартную терапию без применения иммуномодуляторов; 2-я группа ($n = 20$) получала бактериальный лизат (БЛ) (Бронхо-Ваксом, OM Pharma S.A., Швейцария) 7 мг 1 раз в сутки, один цикл 30 дней, а затем два цикла по 10 дней с интервалом в 20 дней; пациенты 3 груп-

пы ($n = 20$) получали Азоксимера бромид (АБ) (Полиоксидоний, ООО «НПО Петровакс Фарм», Россия) 6 мг внутримышечно, 1 раз в сутки ежедневно в течение 3 дней, далее через день (на курс 10 инъекций). Стандартная терапия (антибактериальная и симптоматическая) проводилась в соответствии с клиническими рекомендациями «Внебольничная пневмония у взрослых» Минздрава России. Иммуномодуляторы назначались одновременно с началом стандартной терапии. Проводился анализ суммарной длительности заболевания и отдельно длительность каждого симптома. Регистрация симптомов происходила ежедневно: пациенты самостоятельно регистрировала симптомы и заполняли разработанную таблицу.

Критерии эффективности

Стойкое снижение температуры тела $< 37,2^\circ\text{C}$ в течение не менее 48 ч; отсутствие интоксикационного синдрома (общая слабость, потливость); частота дыхания < 20 /мин (у пациентов без хронической ДН); отсутствие гнойной мокроты (за исключением пациентов с ее постоянной продукцией); количество лейкоцитов в крови $< 10 \times 10^9$ /л, нейтрофилов $< 80\%$, юных форм $< 6\%$ [4]. Длительность ВП оценивалась как максимальная продолжительность длительности каждого из регистрируемых симптомов. Анализ литературы (с учетом критериев включения и исключения) показал, что ожидаемое сокращение длительности ВП может составить 4,35 (5,18-3,52) дня [19, 24]. С помощью соответствующих преобразований была рассчитана предполагаемая величина эффекта для анализа 3 групп исследования, которая составила $f = 0,44$ [17]. Соответствующий данной величине эффекта размер выборки равен 54 человека суммарно, по 18 в каждой группе [15].

Методы исследования

У всех больных оценивались демографические показатели, интенсивность курения, индекс массы тела, симптомы, данные объективного, лабораторно-инструментального обследования (общий и биохимический анализ крови, бактериологическое исследование мокроты, рентгенография (или компьютерная томография) органов грудной клетки при обращении и через 10 дней, определялись сопутствующие заболевания.

Оценка тяжести ВП проводилась по шкале CRB-65 (нарушение сознания, частота дыхания, систолическое артериальное давление (АД) < 90 мм рт. ст. или диастолическое АД ≥ 60 мм рт. ст., возраст ≥ 65 лет). При этом в исследование включались больные с результатом < 1 балла.

Измерение концентрации сывороточных/плазменных биомаркеров (TNF α и IL-6) проводилось в день обращения (1-й), на 13-й, 60-й дни

наблюдения. Образцы крови были получены из локтевой вены, сыворотка отделена центрифугированием (3000 об/мин), образцы замораживались до проведения исследования коллекции. Определение уровня $\text{TNF}\alpha$, IL-6 проводилось методом сэндвич-варианта твердофазного иммуноферментного анализа со специфическими реактивами фирмы R&D Diagnostis Inc. (США).

Оценка отдаленных результатов

На третьем этапе исследования, в течение двух лет у этих же пациентов с перенесенной ВП ($n = 55$) изучалась частота острых респираторных заболеваний (ОРЗ). Регистрация случаев ОРЗ осуществлялась на основании опроса (каждые 3 месяца проводился обзвон наблюдаемых пациентов) и документального подтверждения в виде записи в медицинской карте. Отдаленное влияние иммуномодулирующей терапии оценивалось также в трех группах перенесших ВП пациентов: 1-я группа ($n = 15$) – контроль, пациенты, получавшие стандартную терапию ВП, 2-я группа ($n = 20$) – пациенты, дополнительно принимавшие БЛ, 3-я группа ($n = 20$) – пациенты, дополнительно принимавшие АБ (схема приема приведена выше).

Методы статистического анализа

Описательная статистика большинства переменных представлена медианой и интерквартильным размахом. Значения концентрации биомаркеров представлены в виде $\text{Mean (M)} \pm \text{SD}$, изменение относительно исходного уровня представлено медианой и интерквартильным размахом ряда индивидуальных изменений, выраженных в процентах от исходного уровня. Для сравнения двух несвязанных выборок по количественному показателю применялся критерий Манна–Уитни, трех – критерий Краскела–Уоллиса с проведением апостериорных сравнений критерием Стила–Двасса. Сравнение трех и более зависимых выборок (одна группа в разные моменты времени) проводилось критерием Фридмана, в случае его статистической значимости на уровне $p \leq 0,05$ проводились парные сравнения апостериорным критерием Немени.

Оценку различий продолжительности отдельных симптомов у пациентов групп исследования проводили с использованием техники Каплана–Мейера и критерия Log-Rank, приводится медианное время до исчезновения симптома (с указанием 95% доверительного интервала) и разница между медианным временем групп, рассчитанная с применением оценок Ходжеса–Лемана.

Анализ взаимосвязи схемы лечения и заболеваемости респираторными заболеваниями в течение 2 лет после перенесенной ВП (в пересчете на 1000 человеко-дней) проводился с помощью регрессии Пуассона с оценкой Incidence Risk Ratio

(IRR) и соответствующего 95% ДИ. Была рассчитана как однофакторная модель, так и многофакторная с учетом пола и возраста пациентов.

Для анализа взаимосвязи иммуномодулирующей терапии с вероятностью развития повторной инфекции нижних дыхательных путей в течение 2 лет после перенесения ВП применялась многофакторная логистическая регрессия (с поправкой на пол и возраст пациента) с расчетом отношений шансов и их 95% доверительных интервалов.

Для качественных признаков находили абсолютные и относительные (в %) частоты. Сравнения двух групп по качественным номинальным показателям проводили в ходе анализа таблиц сопряженности критерием χ^2 (точным критерием Фишера, в случае наличия в таблице ячеек с ожидаемыми частотами $\leq 5\%$).

Различия считали статистически значимыми при $p \leq 0,05$. Расчеты и графические построения производились с использованием программы GraphPad Prism (v. 9.3.0 лицензия GPS-1963924) и статистической среды R (v. 3.6, лицензия GNU GPL2).

Результаты

У всех исследуемых пациентов ($n = 55$) отмечались клинические проявления нетяжелой внебольничной пневмонии в виде кашля, синдрома интоксикации и общевоспалительных изменений. Группы исследования были сопоставимы по всем анализируемым характеристикам (табл. 1).

Кашель, общая слабость, крепитация были зарегистрированы у всех 55 пациентов, повышение температуры тела наблюдалась у 53 (96%) больных. Потливость беспокоила 44 (80%) человек (11 в группе контроля, 16 – в группе БЛ и 17 – в группе АБ, $p = 0,69$); одышку при обычных физических нагрузках отмечали 43 (78%) пациента (11 – в группе контроля, 15 – в группе БЛ и 17 – в группе АБ, $p = 0,65$); боли в грудной клетке беспокоили 32 (58%) человек; головная боль – 21 (38%) человека; сердцебиение – 14 (25%), озноб встречался у 18 (33%) больных. Кашель (синдром бронхита) со слизисто-гнойной и гнойной мокротой отмечался у 22 (40%) пациентов (8 в группе контроля, 8 в группе БЛ и 7 в группе АБ, $p = 0,91$). Наблюдался синдром уплотнения легочной ткани, дискомфорт при дыхании, чувство нехватки воздуха.

Анализ периферической крови у исследуемых больных выявил характерные для воспалительного процесса статистически значимые изменения: умеренный лейкоцитоз со сдвигом лейкоцитарной формулы влево, моноцитоз, увеличение СОЭ: лейкоциты $\times 10^9 - 10,3$ (8,8–11,7) против 5,2 (4–6,4), $p < 0,001$; моноциты % – 5,4 (4,4–6,1) про-

ТАБЛИЦА 1. КЛИНИЧЕСКАЯ И ЛАБОРАТОРНО-ИНСТРУМЕНТАЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА БОЛЬНЫХ С ВНЕБОЛЬНИЧНОЙ ПНЕВМОНИЕЙ

TABLE 1. CLINICAL LABORATORY-INSTRUMENTAL CHARACTERISTICS OF PATIENTS WITH COMMUNITY-ACQUIRED PNEUMONIA

Показатель Index	Всего All	Группы исследования Study groups			p ¹
		Контроль Control (n = 15)	БЛ BL (n = 20)	АБ AzB (n = 20)	
Возраст, годы Age, years	41 (31-48)	41 (31-48)	41 (31-49)	40 (31-48)	p = 0,88
Муж/жен M/F	33/22	10/4	12/8	11/10	p = 0,38
ИК, пачка/лет IR	10 (10-15)	10 (10-15)	10 (10-14)	11 (9-14)	p = 0,80
СРВ-65, баллы CRB-65, points	0,15 (0,1-1,0)	0,15 (0-1)	0,16 (0-1)	0,14 (0-1)	p = 0,78
ИМТ, кг/м ² BMI	21 (19-22)	21 (19-22)	21 (20-22)	21 (18-22)	p = 0,74
ЧДД, мин NPV	18 (17-18)	18 (17-18)	18 (17-18)	18 (17-18)	p = 1,00
SpO ₂ , %	96 (96-97)	96 (95-97)	96 (96-97)	96 (96-98)	p = 0,49
ЧСС, мин HR	74 (70-76)	74 (70-82)	74 (70-76)	72 (71-82)	p = 1,00
САД, мм рт. ст. SBP	120 (110-128)	120 (100-130)	120 (112-128)	118 (100-130)	p = 0,96
ДАД, мм рт. ст. DBP	78 (76-82)	80 (78-84)	78 (72-82)	78 (76-83)	p = 0,13
Лейкоциты, × 10 ⁹ /л Leukocytes, × 10 ⁹ /L	10,3 (8,8-11,7)	10,0 (8,9-10,6)	10,8 (8,7-11,6)	11,3 (8,8-11,9)	p = 0,49
Общий белок, г/л Total protein, g/L	63 (59-65)	63 (59-65)	63 (61-65)	63 (59-65)	p = 0,77
Креатинин, мкмоль/л Creatinine, mmol/L	78 (73-84)	78 (71-83)	81 (73-85)	78 (72-84)	p = 0,37
Холестерин, ммоль/л Cholesterol, mmol/L	4,7 (4,3-5,7)	4,6 (4,3-5,3)	4,9 (4,2-6,2)	5,1 (4,3-6,2)	p = 0,57
Глюкоза, ммоль/л Glucose, mmol/L	5,2 (4,8-5,9)	4,9 (4,5-5,9)	5,6 (4,8-5,9)	5,2 (4,8-6,1)	p = 0,55
СРБ, мг/мл CRP	23 (9-36)	16 (6-33)	27 (12-37)	23 (7-35)	p = 0,36
Длительность заболевания от начала исследования, дни Duration of the disease from the beginning of the study, days	4 (3-6)	4 (3: 6)	4,5 (3-6)	4 (3-6)	p = 0,89

Примечание. БЛ – бактериальный лизат, АБ – азоксимера бромид, ИК – индекс курения, ИМТ – индекс массы тела, ЧДД – частота дыхательных движений, SpO₂ – сатурация крови кислородом, ЧСС – частота сердечных сокращений, САД – систолическое артериальное давление, ДАД – систолическое артериальное давление, СРБ – С-реактивный белок. ¹ – применялся критерий Краскела–Уоллиса.

Note. BL, bacterial lysate; AB, azoximer bromide; IR, smoking index; BMI, body mass index; NPV, respiratory rate; SpO₂, blood oxygen saturation; HR, heart rate; SBP, systolic blood pressure; DBP, systolic blood pressure; CRP, C-reactive protein;

¹, the Kruskal–Wallis test was applied.

тив 4,8 (3,6-5,8), $p = 0,03$; СОЭ – 27,4 (22,3-34,6) против 5,6 (4,2-7,1), $p < 0,001$.

Для оценки влияния иммуномодулирующей терапии на продолжительность отдельных симптомов и в целом длительности ВП применялся метод Каплана–Мейера. Было выявлено, что общая продолжительность всех симптомов (длительность заболевания) была ниже в группах иммуномодуляторов, по сравнению с группой контроля (где она составляла 14 (13-15) дней): 12 (11-13) дней в группе БЛ (разница медиан по сравнению с контролем составила 2 (1-3) дня, $p < 0,001$) и 12 (11-12) дней в группе АБ (разница медиан 2 (1-3) дня, $p < 0,001$), между собой группы вмешательства статистически значимо не различались ($p = 0,36$) (рис. 1А, см. 2-ю стр. обложки). Продолжительность одышки ($p = 0,59$), крепитации ($p = 0,07$), потливости ($p = 0,11$) статистически значимо не различались в группах исследования.

Продолжительность такого симптома, как астения (общая слабость), была статистически значимо ниже в группе иммуномодуляторов, по сравнению с группой контроля: 13 (12-14) дней против 10 (9-11) дней в группе БЛ (разница медиан 3 (1-4) дня, $p = 0,004$) и 10 (9-11) дней в группе АБ (разница медиан 3 (1-4) дня, $p = 0,001$ по сравнению с контролем), между собой группы иммуномодуляторов статистически значимо не различались ($p = 0,69$) (рис. 1Б, см. 2-ю стр. обложки).

Отдельно стоит отметить такой симптом, как кашель с мокротой, в обеих группах иммуномо-

дуляторов продолжительность данного симптома была ниже, чем в группе контроля (разница медиан с контролем составляла 1 (0-3) день в группе БЛ ($p = 0,03$) и 2 (1-4) дня в группе АБ ($p = 0,002$)), но также было выявлено, что продолжительность кашля с мокрой в группе АБ была ниже, чем в группе БЛ – 11 (10-12) дней против 12 (11-13) дней (разница медиан составила 1 (0-2) день, $p = 0,05$) (рис. 1В, см. 2-ю стр. обложки). Аналогичная ситуация наблюдалась и для такого симптома, как лихорадка: в группе БЛ продолжительность симптома была ниже, чем в группе контроля (3 (2-4) дня против 4 (3-5) дней, разница медиан 1 (0-2) день, $p = 0,02$), но наименьшая продолжительность лихорадки наблюдалась в группе АВЗ – 2 (1-3) дня (разница медиан составляла 2 (1-2) дня по сравнению с контролем ($p < 0,001$) и 1 (0-1) день по сравнению с группой БЛ ($p = 0,05$)) (рис. 1Г, см. 2-ю стр. обложки).

На следующем этапе исследования был проведен анализ влияния иммуномодуляторов на маркеры острой фазы воспаления (TNF α и IL-6). В первый день наблюдения показатели TNF α и IL-6 (табл. 2) в группах исследуемых пациентов были сопоставимы между собой и статистически значимо превышали концентрацию TNF α и IL-6 в группе здоровых доноров ($2,2 \pm 0,24$ пг/мл и $1,4 \pm 0,19$ пг/мл, соответственно, $p < 0,001$ в обоих случаях).

На 13-й день лечения было выявлено статистически значимое снижение уровня TNF α и IL-6 во всех группах, по сравнению с их исходным

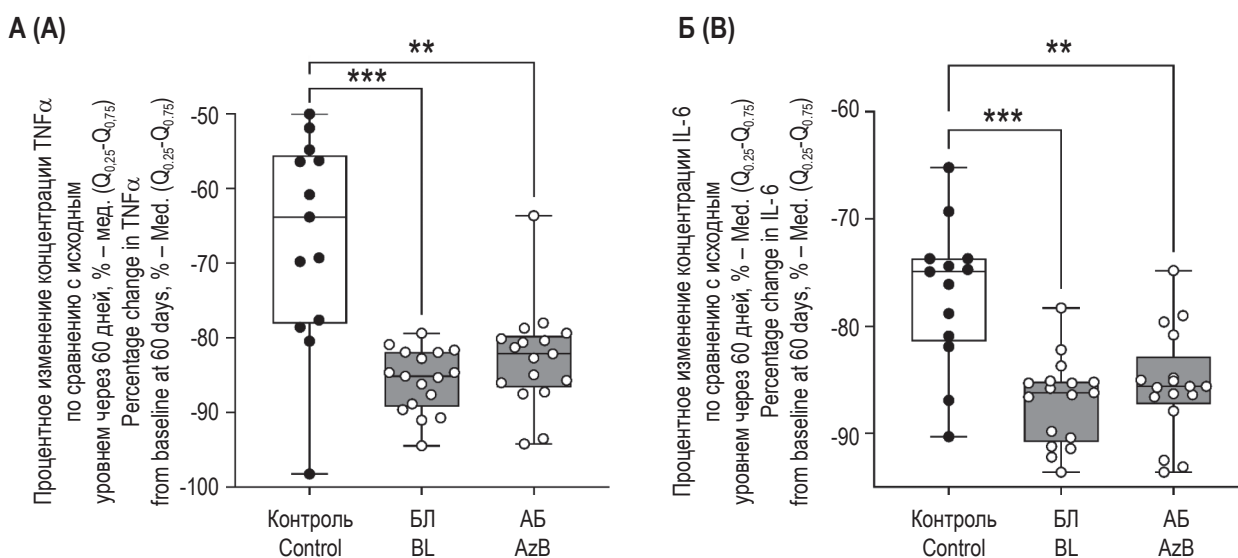


Рисунок 2. Процентное изменение концентрации TNF α (А) и IL-6 (Б) на фоне лечения в группах сравнения через 60 дней относительно исходных значений

Примечание. ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$ применялся критерий Стила–Двассса.

Figure 2. Percent Change in TNF α (A) and IL-6 (B) concentrations during treatment in the comparison groups at 60 days relative to baseline values

Note. **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$ the Steele–Dvass test was applied.

ТАБЛИЦА 2. КОНЦЕНТРАЦИЯ $TNF\alpha$, IL-6 ИСХОДНО И В ДИНАМИКЕ НА ФОНЕ ЛЕЧЕНИЯ В ГРУППАХ СРАВНЕНИЯ, $M\pm\sigma$
TABLE 1. CONCENTRATION OF $TNF\alpha$, IL-6 AT BASELINE AND OVER THE COURSE OF TREATMENT IN THE COMPARISON GROUPS, $M\pm\sigma$

Группы исследования Study groups	Динамика показателей, M±σ Dynamics of indicators, M±σ			Сравнение в динамике¹ Comparison over time
	1 день 1 day	13 дней 13 days	60 дней 60 days	
TNFα, пг/мл TNFα, pg/ml				
1. Контроль (n = 20) 1. Control (n = 20)	26,0±5,1	19,5±2,3	8,0±2,9	p < 0,001: p¹³ = 0,03, p⁶⁰ < 0,001
2. БЛ (n = 20) 2. BL (n = 20)	26,5±3,7	13,7±3,4	3,8±1,2	p < 0,001: p¹³ = 0,01, p⁶⁰ < 0,001
3. АБ (гр. 3, n = 20) 3. AzB (n = 20)	26,6±4,7	14,8±2,9	4,4±1,2	p < 0,001: p¹³ = 0,01, p⁶⁰ < 0,001
Сравнение групп² Comparison of groups²	p = 0,71	p < 0,001: p¹/² < 0,001, p¹/³ < 0,001, p²/³ = 0,65	p < 0,001: p¹/² = 0,001, p¹/³ = 0,001, p²/³ = 0,33	
IL-6, пг/мл IL-6, pg/ml				
1. Контроль (n = 20) 1. Control (n = 20)	32,7±6,4	28,3±3,2	7,2±1,5	p < 0,001: p¹³ = 0,04, p⁶⁰ < 0,001
2. БЛ (n = 20) 2. BL (n = 20)	32,7±4,1	22,8±3,6	4,2±1,2	p < 0,001: p¹³ = 0,01, p⁶⁰ < 0,001
3. АВЗ (гр. 3, n = 20) 3. AzB (n = 20)	33,2±3,4	23,5±3,8	4,8±1,6	p < 0,001: p¹³ = 0,01, p⁶⁰ < 0,001
Сравнение групп² Comparison of groups²	p = 0,77	p = 0,001: p¹/² = 0,001, p¹/³ = 0,006, p²/³ = 0,85	p < 0,001: p¹/² < 0,001, p¹/³ = 0,001, p²/³ = 0,56	

Примечание. БЛ – бактериальный лизат, АБ – азоксимера бромид. ¹ – применялся критерий Фридмана, в случае его статистической значимости на уровне $p \leq 0,05$ проводились парные сравнения апостериорным критерием Немени, где: p^{13} , p^{60} – статистическая значимость изменений на 13-й и 60-й день исследования соответственно по сравнению с исходным уровнем (1-м днем исследования). ² – применялся критерий Краскела–Уоллиса, в случае его статистической значимости на уровне $p \leq 0,05$ проводились парные сравнения апостериорным критерием Стила–Двасса, где: $p^{1/2}$, $p^{1/3}$, $p^{2/3}$ – статистическая значимость различий между группами БЛ и контроль, АБ и контроль, БЛ и АБ соответственно

Note. BL, bacterial lysate; AB, azoximer bromide; ¹, the Friedman test was used, in case of its statistical significance at the level of $p \leq 0.05$, pairwise comparisons were made using the posteriori Nemeny test, where: p^{13} , p^{60} – statistical significance of changes on the 13th and 60th day of the study, respectively, compared to the baseline (1st day of the study); ², the Kruskal–Wallis test was used, in case of its statistical significance at the level of $p \leq 0.05$, pairwise comparisons were made using the Steele–Dwass aposterior test, where: $p^{1/2}$, $p^{1/3}$, $p^{2/3}$ – statistical significance of the differences between the groups of BC and control, AB and control, BC and AB, respectively.

уровнем (в группе контроля $p = 0,03$ для $TNF\alpha$ и $p = 0,04$ для IL-6, в группах исследования $p = 0,01$ в каждом случае) Снижение уровня $TNF\alpha$ и IL-6 было статистически значимо более выражено (по сравнению с группой пациентов без иммуномодуляторов) в группах больных, получавших как бактериальный лизат: до 13,7 \pm 3,4 пг/мл – на 44 (-64 – -32) % относительно исходного уров-

ня ($p = 0,004$) для $TNF\alpha$ и 22,8 \pm 3,6 пг/мл – на 32 (-40 – -18) % ($p = 0,007$) для IL-6, так и Азоксимера бромид: до 14,8 \pm 2,9 пг/мл – на 45 (-53 – -38) % ($p = 0,02$) для $TNF\alpha$ и 23,5 \pm 3,8 пг/мл – на 28 (-40 – -20) % ($p = 0,004$) для IL-6. В группе контроля концентрация $TNF\alpha$ снизилась на 18 (-32 – -8) %, (до 19,5 \pm 2,3 пг/мл), IL-6 – на 11 (-20 – -1) % (до 28,3 \pm 3,2 пг/мл).

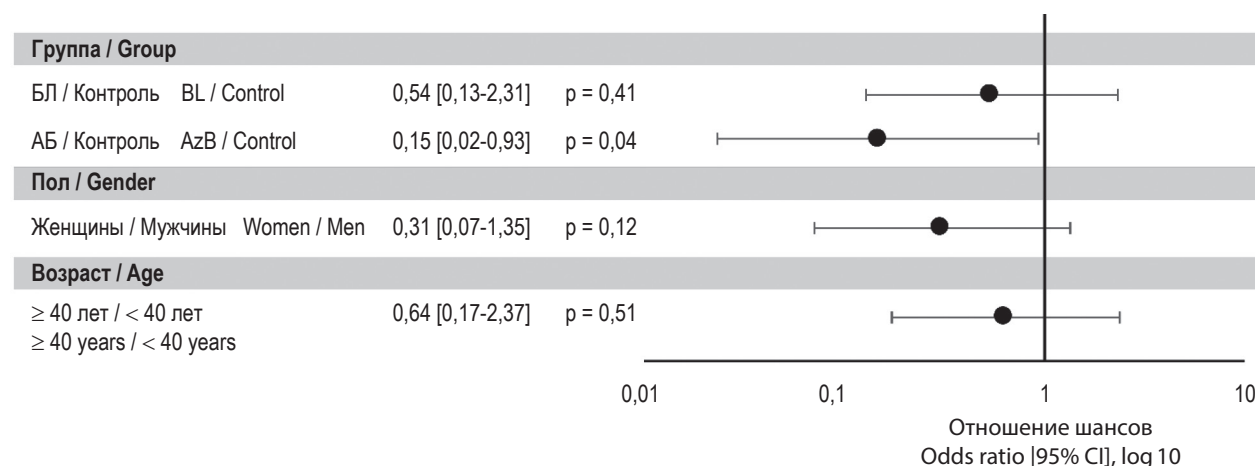


Рисунок 3. Отношения шансов развития инфекции нижних дыхательных путей в течение 2 лет после перенесенной ВП, применялась многофакторная логистическая регрессия модель: group + gender + age

Figure 3. Ratios of odds of developing lower respiratory tract infection within 2 years after the CAP variable, multivariate logistic regression model was used: group + gender + age

На 60-й день исследования было выявлено дальнейшее статистически значимое снижение уровня TNFα и IL-6 во всех группах. Максимально низкие и статистически значимо отличавшиеся от контроля показатели определяемых биомаркеров выявлены у пациентов, получавших БЛ и АБ (p = 0,001 в обоих случаях).

Сравнение динамики снижения TNFα и IL-6 в группах на 60-й день исследования по сравнению с исходным уровнем показало интенсивность снижения их содержания в группе БЛ на 85 (-89 – -82) % и 86 (-90 – -85) %; в группе АБ на 82 (-86 – -80) % и 86 (-88 – -84) %, соответственно. В группе контроля зарегистрировано снижение концентрации TNFα и IL-6 на 64 (-78 – -56) % и 75 (-81 – -74) %, что статистически значимо отличается от группы БЛ (p < 0,001 для TNF и p = 0,001 для IL-6) и группы АБ (p = 0,002 для TNF и p = 0,007 для IL-6). В группе БЛ на 60-й день наблюдения динамика снижения концентрации TNFα была несколько выше, но без статистически значимых различий, чем в группе АБ (p = 0,24) (рис. 2А). Интенсивность снижения концентрации IL-6 на 60-й день в группах БЛ и АБ не различалась (p = 0,72) (рис. 2Б).

На следующем этапе было проанализировано отдаленное влияние иммуномодулирующей терапии на частоту возникновения инфекций нижних дыхательных путей (острый бронхит, обострения хронического бронхита, внебольничная пневмония) у перенесших ВП пациентов. Длительность наблюдения составила 2 года. Частота встречаемости таких заболеваний за 2 года наблюдения составила 47% (n = 7) в группе контроля, 30% (n = 6) в группе БЛ (p = 0,31 по

сравнению с контролем) и 10% (n = 2) в группе АБ (p = 0,02 по сравнению с контролем). Скорректированное на пол и возраст отношение шансов развития заболевания нижних дыхательных путей (в течение 2 лет после перенесенной ВП) в группе АБ составило 0,15 (0,02-0,93) (p = 0,04), что свидетельствует о его протективном эффекте (рис. 3).

Обсуждение

В нашем исследовании у пациентов внебольничная пневмония соответствовала критериям нетяжелого течения. Сопутствующая патология была представлена артериальной гипертензией, гастроэзофагеальной рефлюксной болезнью (ГЭРБ), хроническим бронхитом. Большинство пациентов не имели анамнеза курения. У всех исследуемых пациентов отмечались клинические проявления нетяжелой внебольничной пневмонии в виде кашля, синдрома интоксикации и общевоспалительных изменений.

Для оценки влияния иммуномодулирующей терапии на продолжительность отдельных симптомов и в целом длительности ВП применялся метод Каплана–Мейера. Было выявлено, что общая продолжительность всех симптомов (длительность сохранения симптомов) была ниже в группах иммуномодуляторов, по сравнению с группой контроля. Между собой группы АБ и БЛ статистически значимо не различались: продолжительность одышки, крепитации, потливости статистически значимо не различалось в группах исследования.

Отдельно стоит отметить такой симптом, как кашель с мокротой, в обеих группах иммуномодуляторов продолжительность данного симпто-

ма была ниже, чем в группе контроля, но также было выявлено, что продолжительность кашля с мокрой в группе АБ была ниже, чем в группе БЛ. Аналогичная ситуация наблюдалась и для такого симптома, как лихорадка: в группе БЛ продолжительность симптома была ниже, чем в группе контроля, но наименьшая продолжительность лихорадки наблюдалась в группе АБ.

На следующем этапе исследования был проведен анализ влияния иммуномодуляторов на маркеры острой фазы воспаления (TNF α и IL-6). Концентрация TNF α , IL-6 в исследуемых нами группах больных с нетяжелой внебольничной пневмонией была исходно статистически высокозначимо повышена по сравнению с группой здоровых лиц. На фоне терапии на 13-й и 60-й день выявлено снижение концентрации TNF α , IL-6 у всех больных, при этом у пациентов, получавших иммуномодуляторы, указанные показатели достоверно были ниже по сравнению с таковыми у лиц со стандартной схемой лечения нетяжелой ВП.

Анализ отдаленных результатов влияния проведенной иммуномодулирующей терапии у исследуемых пациентов на частоту возникновения инфекций нижних дыхательных путей за 2 года наблюдения показал, что встречаемость ИНДП была статистически значимо меньшей в группе пациентов, получивших АБ. Скорректированное на пол и возраст отношение шансов развития инфекций нижних дыхательных путей (в течение 2 лет после перенесенной ВП) в группе АБ составило 0,15 (0,02-0,93) ($p = 0,04$), что свидетельствует о его протективном эффекте.

Главным возбудителем ВП независимо от тяжести течения по-прежнему является пневмококк (*Streptococcus pneumoniae*). Значительное число случаев ВП обусловлено ассоциацией пневмококка с *Chlamydomphila pneumoniae* и *Mycoplasma pneumoniae*. В зависимости от использованных методик верификации возбудителей частота случаев смешанной инфекции варьирует от 18% до 50%. При этом *S. pneumoniae* и *M. pneumoniae* сами по себе редко вызывают пневмонию тяжелого течения. Большинство случаев заболевания хламидийной и микоплазменной этиологии протекают легко и не требуют госпитализации. *Haemophilus influenzae* вызывают ВП у лиц старших возрастных групп, отягощенных сопутствующей патологией, а также у пациентов, страдающих ХОБЛ. *Staphylococcus aureus* — один из редких возбудителей ВП, однако в последнее время он привлекает повышенное внимание, что обусловлено распространением во внебольничных условиях метициллин-резистентных штаммов (methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* — MRSA) [4, 21].

Основанием для диагностики пневмонии в амбулаторных условиях являются следующие симптомы или, по крайней мере, два из ниже перечисленных: острое начало, повышение температуры тела $\geq 38,0^{\circ}\text{C}$; кашель с мокротой, возможно, малопродуктивный; физикальные признаки инфильтрации в легочной ткани (крепитация, хрипы, бронхиальное дыхание, притупление при перкуссии) [13]. Больные, переносящие пневмонию, часто жалуются на немотивированную слабость, утомляемость, сильное потоотделение по ночам [4, 6, 12].

Воспаление, в том числе и при внебольничной пневмонии, развивается в ответ на повреждение и проникновение в ткани патогенов при участии провоспалительных цитокинов, к которым относятся IL-1, TNF α , IL-6, хемокины и некоторые другие цитокины [7].

Регуляция воспалительного ответа при бактериальной пневмонии зависит от сложных взаимодействий между иммунными клетками и провоспалительными и противовоспалительными цитокинами. IL-1 β и TNF α являются важными провоспалительными цитокинами и медиаторами раннего ответа, которые регулируют ряд клеточных функций и диктуют события, ведущие к инициации, поддержанию и восстановлению повреждения ткани [5, 7].

В исследованиях показано, что у больных с легким и очаговым течением заболевания отмечается равноценная активация оппозиционных пулов цитокинов в начале заболевания (IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, TNF α) с повышением IL-2, IL-4 и снижением IL-6, IL-8 и TNF α в динамике [13, 24, 25]. В другом исследовании на основании иммунологического обследования больных с ВП при среднетяжелом и тяжелом течении заболевания на фоне выраженной активации провоспалительных механизмов межклеточного взаимодействия (цитокинов) выявлена недостаточная активность факторов естественной резистентности, дисбаланс клеточных и гуморальных механизмов защиты [7].

В связи с этим в последние годы большое внимание уделяется противовоспалительным и иммуномодулирующим препаратам. Иммунологический мониторинг группы больных с ВП, получавших базисную терапию в сочетании с иммуномодуляторами, показал уменьшение содержания циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК), С-реактивного белка (СРБ), повышение относительного содержания CD3 $^{+}$ лимфоцитов, фагоцитарного индекса (ФИ), иммунорегуляторного индекса, значимый рост CD16 $^{+}$ NK-клеток, что значительно опережало таковые показатели пациентов в группе контроля (без иммунокоррекции). Активнее снижались показатели воспа-

лительных интерлейкинов (IL-6, IL-4), фактора некроза опухоли α (TNF α). Назначение вышеуказанных препаратов сопровождалось уменьшением длительности интоксикационного периода, сокращением времени регрессирования очага пневмонии и числа возможных осложнений, что отражалось на процессе выздоровления, уменьшалось количество проведенных в больнице койко-дней [3, 8].

В исследовании по изучению эффективности традиционного лечения (без иммуномодуляторов) больных с ВП на показатели сывороточных цитокинов, показано достоверное снижение IL-6, TNF α , IL-4 по сравнению с исходными значениями, хотя уровни их оставались выше показателей здоровых лиц. Однако в случае применения иммуномодуляторов (гексапептида и АБ), динамика снижения провоспалительных цитокинов была более выраженной у пациентов, получавших иммунотропный препарат, в сравнении с группой контроля, получавшей традиционную терапию [8]. Также есть данные, что БЛ способствуют благоприятному действию для организма изменению состава цитокинов, содержащихся в

сыворотке крови, предотвращая повторные инфекции дыхательных путей [20, 25].

Использование иммуномодулирующих препаратов приводит к благоприятному клиническому исходу, но качество некоторых клинических испытаний по профилактике острых инфекций дыхательных путей (ОРДП) должно быть улучшено. Вероятнее, использование ИМ для профилактики ОРДП у взрослых оно должно быть показано пациентам с хроническими обструктивными заболеваниями легких (ХОБЛ) с высоким риском обострения [11].

Заключение

Таким образом, включение иммуномодуляторов в базисное лечение нетяжелой внебольничной пневмонии приводит к сокращению длительности симптомов, сопровождается улучшением профиля провоспалительных цитокинов. Отдаленные эффекты проведенной иммуномодулирующей терапии за 2 года наблюдения показали статистически значимо меньшую частоту инфекций нижних дыхательных путей в группе пациентов, получивших АБ.

Список литературы / References

1. Авдеев С.Н., Нуралиева Г.С., Гайнитдинова В.В., Баймаканова Г.Е., Со А.К., Мержоева З.М. Клиническая эффективность механического бактериального лизата в профилактике инфекционных обострений хронической обструктивной болезни легких // Терапевтический архив, 2020. Т. 92, № 4. С. 57-63. [Avdeev S.N., Nuralieva G.S., Gaynitdinova V.V., Baymakanova G.E., So A.K., Merjoeva Z.M. Clinical efficacy of mechanical bacterial lysate in the prevention of infectious exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *Terapevticheskiy arkhiv = Therapeutic Archive*, 2020, Vol. 92, no. 4, pp. 57-63. (In Russ.)]
2. Бурместер Г.Р., Пецутто А. Наглядная иммунология: Пер. с англ. М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2007. 321 с. [Burmester G.R., Petsutto A. Visual immunology: Translated in English]. Moscow: BINOM. Laboratoriya znaniy, 2007. 321 p.
3. Караулов А.В. Иммунология внебольничных пневмоний. Под ред. Чучалина А.Г., Синопальникова А.И., Чернеховской Н.Е. Пневмония. М.: Экономика и информатика, 2002. С. 67-93. [Karaulov A.V. Immunology of community-acquired pneumonia. Ed. Chuchalin A.G., Sinopalnikov A.I., Chernehovskaya N.E. Pneumonia. Moscow: Ekonomika i informatika, 2002. pp. 67-93.
4. Клинические рекомендации. Внебольничная пневмония у взрослых. Российское респираторное общество (РРО), Межрегиональная ассоциация по клинической микробиологии и антимикробной химиотерапии (МАКМАХ). 2021. [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://diseases.medelement.com/disease/внебольничная-пневмония-у-взрослых-кп-рф-2021/16909>. [Clinical guidelines for community-acquired pneumonia in adults. Russian Respiratory Society (RRS), Interregional Association for Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy (IACMAC)]. 2021. [Electronic resource]. Access mode: <https://diseases.medelement.com/disease/внебольничная-пневмония-у-взрослых-кп-рф-2021/16909>.
5. Костинов М.П., Гайнитдинова В.В., Кажарова С.В., Зорина В.Н., Полищук В.Б., Власенко А.Е. Влияние иммуномодуляторов на различные маркеры острой фазы воспаления у больных с нетяжелой внебольничной пневмонией // Туберкулез и болезни легких, 2021. Т. 99, № 4. С. 36-43. [Kostinov M.P., Gaynitdinova V.V., Kazharova S.V., Zorina V.N., Polishchuk V.B., Vlasenko A.E. Effect of immunomodulators on various markers of the acute phase of inflammation in patients with nonsevere community-acquired pneumonia. *Tuberkulez i bolezni legkikh = Tuberculosis and Pulmonary Diseases*, 2021, Vol. 99, no. 4, pp. 36-43.

6. Лещенко И.В. Внебольничная пневмония у взрослых: возможности лечения в амбулаторных условиях // Медицинский совет, 2017. № 18. С. 108-114. [Leshchenko I.V. Community-acquired pneumonia in adults: treatment options in outpatient settings. *Meditsinskiy sovet = Medical Council*, 2017, no. 18, pp. 108-114. (In Russ.)]
7. Мавзютова Г.А., Фазлыева Р.М., Тюрина Е.Б., Хайруллина Р.М., Бикметова Н.Р. Особенности иммунных нарушений при внебольничных пневмониях // Медицинская иммунология, 2007. Т. 9, № 6. С. 605-612. [Mavzyutova G.A., Fazlyeva R.M., Tyurina E.B., Hairullina R.M., Bickmetova N.R. Features of immune disorders in community-acquired pneumonia. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2007, Vol. 9, no. 6, pp. 605-612. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2007-6-605-612.
8. Мухамадиева Л.Р., Мавзютова Г.А., Фазлыева Р.М., Бикметова Н.Р. Клинико-иммунологическая эффективность имунофана и полиоксидония в комплексной терапии внебольничной пневмонии // Медицинская иммунология, 2009. Т. 11, № 1. С. 57-62. [Mukhamadieva L.R., Mavzyutova G.A., Fazlyeva R.M., Bikmetova N.R. Clinical and immunological efficiency of Imunophan and Polioxidonium in complex therapy of community-acquired pneumonia. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2009, Vol. 11, no. 1, pp. 57-62. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2009-1-57-62.
9. Никулин Б.А. Оценка и коррекция иммунного статуса. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2007. 376 с. [Nikulin B.A. Evaluation and correction of immune status]. Moscow: GEOTAR-Media, 2007. 376 p.
10. Пинегин Б.В., Варфоломеева М.И. Влияние иммуномодулятора на синтез интерферона // Лечащий врач, 2010. № 10. С. 2-5. [Pinegin B.V., Varfolomeeva M.I. Immunomodulator effect on interferon synthesis. *Lechashchiy vrach = Attending Physician*, 2010, no. 10, pp. 2-5. (In Russ.)]
11. Пинегин Б.В., Некрасов А.В., Хаитов Р.М. Иммуномодулятор Полиоксидоний: механизмы действия и аспекты клинического применения // Цитокины и воспаление, 2004. Т. 3, № 3. С. 41-47. [Pinegin B.V., Nekrasov A.V., Khaitov R.M. Immunomodulator Polioxidonium: mechanisms of action and aspects of clinical application. *Tsitokiny i vospaleniye = Cytokines and Inflammation*, 2004, Vol. 3, no. 3, pp. 41-47. (In Russ.)]
12. Синопальников А.И., Фесенко О.В. Внебольничная пневмония. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2017. 112 с. [Sinopalnikov A.I., Fesenko O.V. Out-of-hospital pneumonia]. Moscow: GEOTAR-Media, 2017. 112 p.
13. Чучалин А.Г., Синопальников А.И., Козлов Р.С., Тюрин И.Е., Рачина С.А. Внебольничная пневмония у взрослых. Практические рекомендации по диагностике, лечению и профилактике (пособие для врачей) // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия, 2010, Т. 12, № 3. С. 186-225. [Chuchalin A.G., Sinopalnikov A.I., Kozlov R.S., Tyurin I.E., Rachina S.A. Community-acquired pneumonia in adults. Practical recommendations for diagnosis, treatment and prevention (handbook for physicians). *Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya khimioterapiya = Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy*, 2010, Vol. 12, no. 3, pp. 186-225. (In Russ.)]
14. Bousquet J., Oliveri D. Role of ribomunyl(r) in the prevention of recurrent respiratory tract infections in adults : overview of clinical results. *Treat. Respir. Med.*, 2006, Vol. 5, no. 5, pp. 317-324.
15. Cohen J. Statistical power analysis for the behavioral sciences. Routledge, 2013. Available at: <https://www.taylorfrancis.com/books/mono/10.4324/9780203771587/statistical-power-analysis-behavioral-sciences-jacob-cohen>.
16. File T.M.Jr, Marrie T.J. Burden of community-acquired pneumonia in North American adults. *Postgrad. Med.*, 2010, Vol. 122, no. 2, pp. 130-141.
17. Higgins J.P.T., Thomas J., Chandler J., Cumpston M., Li T., Page M.J., Welch V.A. (editors). Cochrane Handbook for Systematic Reviews of Interventions. 2nd Edition. Chichester (UK): John Wiley & Sons, 2019.
18. Johansson N., Kalin M., Tiveljung-Lindell A., Giske C.G., Hedlund J. Etiology of community-acquired pneumonia: increased microbiological yield with new diagnostic methods. *Clin. Infect. Dis.*, 2010, Vol. 50, pp. 202-209.
19. Liang A., Zhang Y., Wang F. Clinical observation on 73 cases of repeated respiratory tract infections treated by Broncho-Vaxom. *J. Clin. Pulm. Med.*, 2011, Vol. 16, no. 2, pp. 284-285.
20. Nascimento-Carvalho E.C., Vasconcellos Â.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.
21. Ramirez J.A., Wiemken T.L., Peyrani P., Arnold F.W., Kelley R., Mattingly W.A., Nakamatsu R., Pena S., Guinn B.E., Furmanek S.P., Persaud A.K., Raghuram A., Fernandez F., Beavin L., Bosson R., Fernandez-Botran R., Cavallazzi R., Bordon J., Valdivieso C., Schulte J., Carrico R.M.; University of Louisville Pneumonia Study Group. Adults hospitalized with pneumonia in the United States: incidence, epidemiology, and mortality. *Clin. Infect. Dis.*, 2017, Vol. 65, no. 11, pp. 1806-1812.

22. Torres A., Blasi F., Peetermans W.E., Viegi G., Welte T. The aetiology and antibiotic management of community-acquired pneumonia in adults in Europe: a literature review. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 2014, Vol. 33, no. 7, pp. 1065-1079.
23. Welte T., Torres A., Nathwani D. Clinical and economic burden of community-acquired pneumonia among adults in Europe. *Thorax*, 2012, Vol. 67, no. 1, pp. 71-79.
24. Yin J., Xu B., Zeng X., Shen K. Broncho-Vaxom in pediatric recurrent respiratory tract infections: a systematic review and meta-analysis. *Int. Immunopharmacol.*, 2018, Vol. 54, pp. 198-209.
25. Zielnik-Jurkiewicz B., Jurkiewicz D., Stankiewicz W. Effectiveness of Broncho-Vaxom in prevention of recurrent upper respiratory tract infection in children. *Pol. Merkur. Lekarski*, 2005, Vol. 19, no. 113, pp. 625-629.

Авторы:

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

Гайнитдинова В.В. — д.м.н., профессор кафедры пульмонологии Института клинической медицины имени Н.В. Склифосовского ФГАОУ «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Министерства здравоохранения РФ (Сеченовский университет); старший научный сотрудник лаборатории вакцинопрофилактики и иммунотерапии аллергических заболеваний ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова», Москва, Россия

Authors:

Kostinov M.P., PhD, MD (Medicine), Professor, Corresponding Member, Russian Academy of Sciences, Head, Laboratory of Vaccine Prevention and Immunotherapy of Allergic Diseases, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera; Head, Department of Epidemiology and Modern Vaccination Technologies, Institute of Professional Education, I. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russian Federation

Gainitdinova V.V., PhD, MD (Medicine), Professor, N. Sklifosovsky Department of Pulmonology, Institute of Clinical Medicine, I. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University); Senior Research Associate, Laboratory of Vaccine Prevention and Immunotherapy of Allergic Diseases, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation

Кажарова С.В. — аспирант ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова», Москва, Россия

Власенко А.Е. — к.т.н., преподаватель кафедры медицинской кибернетики и информатики, Новокузнецкий государственный институт усовершенствования врачей — филиал ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Министерства здравоохранения РФ, г. Новокузнецк, Россия

Полищук В.Б. — к.м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории вакцинопрофилактики и иммунотерапии аллергических заболеваний ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова», Москва, Россия

Аллабердина Д.У. — доцент ФГБОУ ВО «Башкирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Уфа, Республика Башкортостан, Россия

Kazharova S.V., Postgraduate Student, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation

Vlasenko A.E., PhD (Engineering), Lecturer, Department of Medical Cybernetics and Informatics, Novokuznetsk State Institute of Advanced Training of Doctors, Branch of the Russian Medical Academy of Continuing Professional Education, Novokuznetsk, Russian Federation

Polishchuk V.B., PhD (Medicine), Leading Research Associate, Laboratory of Vaccine Prevention and Immunotherapy of Allergic Diseases, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation

Allaberdina D.U., Associate Professor, Bashkir State Medical University, Ufa, Republic of Bashkortostan, Russian Federation

Поступила 17.05.2024
Принята к печати 28.08.2024

Received 17.05.2024
Accepted 28.08.2024

РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ ОЧИСТКИ, БИОХИМИЧЕСКАЯ И ИММУНОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РЕКОМБИНАНТНОГО ХИМЕРНОГО АНТИГЕНА ДЛЯ ОЦЕНКИ Т-КЛЕТОЧНОГО ИММУНИТЕТА ПРОТИВ КОРОНАВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ

Копать В.В.¹, Рябченкова А.А.¹, Чирак Е.Л.¹, Чирак Е.Р.¹,
Саенко А.И.¹, Кудрявцев И.В.^{2,4}, Трулев А.С.², Савин Т.В.^{3,4},
Зуева Е.В.³, Симбирцев А.С.^{3,4}, Тотолян Арег А.^{3,4}, Духовлинов И.В.¹

¹ ООО «АТГ Сервис Ген», Санкт-Петербург, Россия

² ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

³ ФБУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера», Санкт-Петербург, Россия

⁴ ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Резюме. Диагностика специфического Т-клеточного иммунитета к антигенным детерминантам SARS-CoV-2 у пациентов представляется все более важной задачей ввиду накопления данных о роли Т-клеточного иммунного ответа в протекании коронавирусной инфекции и клиренсе SARS-CoV-2 в случае вторичной инфекции. Ранее нами был разработан рекомбинантный антиген CorD_PS для оценки Т-клеточного противовирусного иммунитета, содержащий консервативные и иммуногенные последовательности структурных белков коронавируса SARS-CoV-2. Был получен его штамм-продуцент *E. coli* CorD_PS со стабильной экспрессией рекомбинантного антигена CorD_PS. Целью настоящей работы является разработка лабораторной технологии получения рекомбинантного антигена CorD_PS, проведение контроля качества полученного химерного белка и изучение его иммунологической активности. Оработку условий культивирования клеток *E. coli* CorD_PS проводили в конических колбах в среде LB-M_Km при 37 °C, затем масштабировали в ферментере объемом 30 л. Экспрессию индуцировали добавлением ИПТГ. Контроль экспрессии осуществляли в лизатах культур в 12% ПААГ в денатурирующих условиях. Полученную биомассу лизировали с помощью ультразвуку-

Адрес для переписки:

Рябченкова Анастасия Андреевна
ООО «АТГ Сервис Ген»
199178, Россия, Санкт-Петербург, Малый пр. В.О.,
57, корп. 4, лит. Ж, пом. 5-Н, офис 1.2.5.
Тел.: 8 (981) 160-63-15.
E-mail: riabchenkova@service-gene.ru

Address for correspondence:

Anastasia A. Ryabchenkova
ATG Service Gene LLC
57 Maly Ave V. O., Bldg 4, Letter Zh,
Room 5-N, Office 1.2.5
St. Petersburg
199178 Russian Federation
Phone: +7 (981) 160-63-15.
E-mail: riabchenkova@service-gene.ru

Образец цитирования:

В.В. Копать, А.А. Рябченкова, Е.Л. Чирак, Е.Р. Чирак,
А.И. Саенко, И.В. Кудрявцев, А.С. Трулев, Т.В. Савин,
Е.В. Зуева, А.С. Симбирцев, Арег А. Тотолян,
И.В. Духовлинов «Разработка технологии очистки,
биохимическая и иммунологическая характеристика
рекомбинантного химерного антигена для оценки
Т-клеточного иммунитета против коронавирусной
инфекции» // Медицинская иммунология, 2024. Т. 26,
№ 3. С. 591-606. doi: 10.15789/1563-0625-PTD-2942

© Копать В.В. и соавт., 2024

Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

V.V. Kopat, A.A. Riabchenkova, E.L. Chirak, E.R. Chirak,
A.I. Saenko, I.V. Kudryavtsev, A.S. Trulioff, T.V. Savin,
E.V. Zuyeva, A.S. Simbirtsev, Areg A. Totolian,
I.V. Dukhovlinov "Purification technology design, biochemical
and immunological characteristics of the recombinant chimeric
antigen for evaluation of T cell immunity against coronavirus
infection", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya
Immunologiya, 2024, Vol. 26, no. 3, pp. 591-606.
doi: 10.15789/1563-0625-PTD-2942

© Kopat V.V. et al., 2024

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

DOI: 10.15789/1563-0625-PTD-2942

кового дезинтегратора с последующим центрифугированием. Были подобраны составы лизирующего и солюбилизирующего буферов, а также условия рефолдинга рекомбинантного белка. Для очистки растворенного белка использовали последовательно катионообменную (SP-сефароза), гидрофобную (Butyl-сефароза) и эксклюзионную (Sephacryl S-200 HR) хроматографии. Белковые примеси в препарате определяли методами обращенно-фазовой ВЭЖХ и электрофореза в 12% ПААГ, остаточные липополисахариды определяли с помощью гель-тромб варианта ЛАЛ-теста, остаточные белки штамма-продуцента — методом иммуноферментного анализа, остаточную ДНК штамма-продуцента — методом связывания с красителем PicoGreen. Контроль специфичности осуществляли методом непрямого иммуноферментного анализа. Оценку продукции цитокинов CD4⁺T-лимфоцитами в ответ на их стимуляцию рекомбинантным антигеном *ex vivo* проводили на проточном цитофлуориметре. Выход биомассы при культивировании *E. coli* CorD_PS в 30 л ферментере составил до 20 г/л за 4 часа индукции 0,1 мМ ИПТГ. Последовательная отмывка телец включения от бактериальных клеточных компонентов и их последующая солюбилизация в буфере, содержащем 8 М мочевины, позволил получить раствор денатурированного антигена с концентрацией 10 мг/мл. Эффективность рефолдинга разведением составила 75%. После трех этапов хроматографической очистки были получены образцы белка с концентрацией 1,2–1,4 мг/мл, чистотой по ВЭЖХ 98,43%, соответствующие ключевым параметрам качества согласно ОФС.1.7.1.0007.15. Рекомбинантный антиген показал специфическое связывание с образцом Первого международного стандарта ВОЗ и образца СОП № 3 анти-SARS-CoV-2 иммуноглобулинов человека в установленном диапазоне концентраций. CD4⁺T-лимфоциты эффективно отвечали на обработку рекомбинантным антигеном увеличением продукции IFN γ . Оптимальная концентрация рекомбинантного коронавирусного антигена составила 5 мкг/мл. Разработанный технологический процесс позволяет получать 5–7 грамм антигена коронавирусного рекомбинантного CorD_PS за один цикл культивирования в 30 л ферментационной среды с ключевыми параметрами качества согласно ОФС.1.7.1.0007.15. В результате исследований специфической иммунологической активности рекомбинантного коронавирусного антигена CorD_PS была подтверждена концепция возможности его использования в качестве диагностикума для определения формирования Т-клеточного иммунного ответа.

Ключевые слова: SARS-CoV-2, COVID-19, коронавирусный антиген CorD_PS, хроматография, иммуноферментный анализ, CD4⁺T-клетки, CD8⁺T-клетки, IFN γ , Т-клеточный иммунный ответ, диагностикум

PURIFICATION TECHNOLOGY DESIGN, BIOCHEMICAL AND IMMUNOLOGICAL CHARACTERISTICS OF THE RECOMBINANT CHIMERIC ANTIGEN FOR EVALUATION OF T CELL IMMUNITY AGAINST CORONAVIRUS INFECTION

Kopat V.V.^a, Riabchenkova A.A.^a, Chirak E.L.^a, Chirak E.R.^a,
Saenko A.I.^a, Kudryavtsev I.V.^{b,d}, Trulioff A.S.^b, Savin T.V.^{c,d},
Zuyeva E.V.^c, Simbirtsev A.S.^{c,d}, Totolian Areg A.^{c,d}, Dukhovlinov I.V.^a

^a ATG Service Gene LLC, St. Petersburg, Russian Federation

^b Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

^c Saint Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation

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

Abstract. Diagnosis of specific T cell immunity to the antigenic determinants of SARS-CoV-2 in patients seems to be an increasingly important task due to accumulation of data about the role of T cell immune response in course of coronavirus infection and clearance of SARS-CoV-2 in case of secondary infection. Previously, we designed the recombinant CorD_PS antigen for evaluation of T cell antiviral immunity, containing conservative and immunogenic sequences of structural proteins of the SARS-CoV-2 coronavirus. *E. coli* CorD_PS producing strain with stable expression of the recombinant CorD_PS antigen was obtained. Aim of the present work is to

design a laboratory technology for the production of recombinant antigen CorD_PS, to control the quality of the obtained chimeric protein and to study its immunological activity. Development of the cultivation conditions for *E. coli* CorD_PS cells was carried out in conical flasks in LB-M_Km medium at 37 °C, then scaled in a fermenter with a volume of 30 liters. Expression was induced by the addition of IPTG. Expression was controlled in culture lysates in 12% SDS-PAGE. The resulting biomass was lysed using an ultrasonic disintegrator with followed by centrifugation. The compositions of lysing and solubilizing buffers were selected, as well as conditions for refolding of the recombinant protein. Cation exchange (SP-sepharose), hydrophobic (Butyl-sepharose) and exclusive (Sephacryl S-200 HR) chromatography were used sequentially to purify the dissolved protein. Protein impurities in the preparation were determined by reverse-phase HPLC and electrophoresis in 12% SDS-PAGE, residual lipopolysaccharides were determined using a gel-thrombin variant of the LAL test, residual proteins of the producer strain were determined by enzyme immunoassay, residual DNA of the producer strain was determined by binding with PicoGreen dye. Specificity was controlled by indirect enzyme immunoassay. The evaluation of cytokine production by CD4⁺T lymphocytes in response to their stimulation by recombinant antigen *ex vivo* was performed on a flow cytofluorimeter. The biomass yield during cultivation of *E. coli* CorD_PS in a 30L fermenter was up to 20 g/L for 4 hours of 0.1 mM IPTG induction. Sequential washing of inclusion bodies from bacterial cellular components and their subsequent solubilization in a buffer containing 8 M urea allowed to obtain a solution of denatured antigen with a concentration of 10 mg/mL. The efficiency of refolding by dilution was 75%. After three stages of chromatographic purification, protein samples with a concentration of 1.2-1.4 mg/mL, HPLC purity of 98.43%, corresponding to key quality parameters according to the OFS.1.7.1.0007.15, were obtained. The recombinant antigen showed specific binding to a sample of the First WHO International Standard and sample Company Reference Standard No. 3 of anti-SARS-CoV-2 human immunoglobulins in a specified concentration range. CD4⁺T lymphocytes effectively responded to recombinant antigen treatment by increasing IFN γ production. The optimal concentration of recombinant coronavirus antigen was 5 μ g/mL. The developed technological process makes it possible to obtain 5-7 grams of coronavirus recombinant CorD_PS antigen in one cultivation cycle in 30 liters of fermentation medium with key quality parameters according to the OFS.1.7.1.0007.15. As a result of specific immunological activity studies of the recombinant coronavirus antigen CorD_PS, the concept of its possible use as a diagnostic tool for determining the formation of a T cell immune response was confirmed.

Keywords: SARS-CoV-2, COVID-19, coronavirus antigen Cord_PS, chromatography, enzyme-linked immunosorbent assay, CD4⁺T cells, CD8⁺T cells, IFN γ , T cell immune response, diagnosticum

Введение

Оценка формирования специфического Т-клеточного иммунитета к антигенным детерминантам SARS-CoV-2 может стать вариантом диагностической тест-системы, основанной на определяющей роли Т-клеточного иммунного ответа в протекании коронавирусной инфекции и клиренсе SARS-CoV-2 в случае вторичной инфекции [4, 10, 21]. Для качественной оценки специфической иммунной защиты против коронавирусной инфекции, вызываемой SARS-CoV-2, необходим оптимальный диагностический антиген, который может быть повсеместно использован для оценки формирования Т-клеточной реакции против антигенных детерминант SARS-CoV-2. Разработанный нами в предыдущем исследовании химерный белок [1], содержащий иммуногенные CD4⁺T-клеточные эпитопы S-, E-, M- и N-структурных белков SARS-CoV-2, может использоваться как диагностикум для качественной оценки специфической иммунной защиты против коронавирусной инфекции и/или оценки иммуногенности кандидатных вакцин в их клинических испытаниях.

Фармацевтическая разработка диагностической системы в первую очередь опирается на основной компонент – рекомбинантный антиген. Рекомбинантный коронавирусный антиген CorD_PS представляет собой химерный белок на основе полноразмерного белка нуклеокапсида N SARS-CoV-2, к которому искусственно добавлены консервативные и иммуногенные последовательности структурных белков коронавируса S, M, E. Отобранные для слияния фрагменты структурных белков включают высококонсервативные эпитопы внутри мутированных штаммов, вызывающих наибольшую обеспокоенность: варианты B.1.1.7, B.1.351, P.1, B.1.429, B.1.526, B.1.617, B.1.617.1, B.1.617.2, AY.1, B.1.618, C.37, B.1.621 и B.1.1.52, а включенные эпитопы S-белка соответствуют RBD-домену [18]. В предыдущем исследовании нами была показана стабильность штамма-продуцента антигена *E. coli* CorD_PS [1].

С технологической точки зрения субстанция рекомбинантного белка должна соответствовать требованиям Государственной фармакопеи Российской Федерации, являющейся основным нормативным документом, регулирующим качество лекарственных субстанций [2]. Общая

фармакопейная статья ОФС.1.7.1.0007.15 (Лекарственные средства, получаемые методами рекомбинантной ДНК) описывает широкий ряд требований, предъявляемых к белок-содержащим препаратам, касающихся количественных и качественных характеристик. Ключевыми параметрами чистоты целевого белка являются содержание бактериальных эндотоксинов, остаточных белков и ДНК штамма-продуцента. Их количество не должно превышать значений, установленных в нормативной документации. Строгие критерии качества, применяемые к субстанциям лекарственных препаратов на всех этапах производства, обеспечивают их безопасность для пациентов.

Целью настоящего исследования является разработка лабораторной технологии получения очищенной субстанции рекомбинантного антигена CorD_PS с последующим тестированием специфической активности и оценкой продукции цитокинов CD4⁺T-лимфоцитами в ответ на специфическую стимуляцию антигеном *ex vivo*.

Материалы и методы

Бактериальный штамм и экспрессионный вектор

Последовательность гена, кодирующего рекомбинантный коронавиральный антиген CorD_PS, синтезировали и клонировали в вектор pET24a(+) как было показано нами в предыдущем исследовании, с получением вектора pCorD_PS. Для разработки рекомбинантного антигена использовали бактериальный штамм-продуцент *Escherichia coli* CorD_PS, полученный трансформированием вектором pCorD_PS компетентных клеток Rosetta (DE3) с генотипом F⁻ ompT hsdSB(rB⁻mB⁻) gal dcm (DE3) [1].

Культивирование клеток штамма *E. coli* CorD_PS

Анализ экспрессии рекомбинантного коронавирального антигена CorD_PS проводили в колбах с использованием среды LB-M с добавлением канамицина до конечной концентрации 50 мкг/мл (LB-M_Km). В колбы, содержащие 20 мл среды, добавляли по 500 мкл ночной культуры клеток штамма *E. coli* CorD_PS. Культуру инкубировали в течение 2 часов в шейкере-инкубаторе при 37 °C и 180 об/мин, затем при достижении оптической плотности ОП₆₀₀ значения 0,6–0,8 опт. ед. добавляли ИПТГ до конечной концентрации 0,1 мМ. Образцы для анализа экспрессии отбирали через 4 и 15 часов после добавления ИПТГ. Экспрессию коронавирального рекомбинантного антигена анализировали с помощью электрофореза в денатурирующих условиях в 12% полиакриламидном геле (ПААГ) с окраской кумасси бриллиантовым синим R-250 (Sigma-Aldrich, #27816) [1].

Культивирование штамма *E. coli* CorD_PS в 30-литровом ферментере проводили в среде LB

с канамицином с подпиткой глицерином и добавлением минеральных солей (мясной пептон, дрожжевой экстракт, NaCl, KН₂РO₄, NH₄Cl, MgSO₄, Na₂HPO₄). В колбах выращивали 3 л ночной культуры клеток *E. coli* CorD_PS. Инокулят вносили в ферментер, содержащий 27 литров среды, и инкубировали при 32 °C, рO₂ 35–40%, pH 6,9. При достижении оптической плотности ОП₆₀₀ значения 8 опт. ед, температуру повышали до 37 °C и добавляли ИПТГ до конечной концентрации 0,1 мМ. В течение всей ферментации проводили почасовой контроль оптической плотности и контроль накопления рекомбинантного коронавирального антигена в виде телец включения с помощью фазово-контрастной микроскопии. Ферментацию завершали при истощении субстрата, которое определяли по резкому увеличению значения показаний кислородного датчика (рO₂). По окончании ферментации клетки из культуральной жидкости сепарировали центрифугированием.

Выделение нерастворимой формы антигена коронавирального рекомбинантного из клеточной биомассы штамма *E. coli* CorD_PS

Для получения фракции телец включения (ТВ) осажденные клетки ресуспендировали в растворе 20 мМ Трис-НСl, 2% Тритон X-100, 0,5 М NaCl, 1 мМ ЭДТА, pH 8,0 из расчета 15 мл раствора на 1 г клеток. Суспензию клеток гомогенизировали ультразвуковой дезинтеграцией в течение 2 мин на ледяной бане, без допуска перегрева раствора. ТВ осаждали центрифугированием при 14000 g, 10 мин, 4 °C. Отмывка ТВ производилась 3 раза, полученные после осаждения ТВ супернатанты были проанализированы в 12% ПААГ. Осадок ресуспендировали в 20%-ном этаноле из расчета 15 мл раствора на 1 г исходной биомассы, дезинтегрировали и центрифугировали при тех же условиях. Полученный осадок телец включения взвешивали и солибилизировали в растворе 20 мМ Трис-НСl, 8 М мочевины, 40 мМ дитиотреитол (ДТТ), 1 мМ ЭДТА pH 8,0 из расчета 10–20 мл раствора на 1 г ТВ в зависимости от вязкости раствора с получением денатурационной смеси.

Рефолдинг денатурированного белка

Предварительно осуществляли подбор pH, температуры, вспомогательных компонентов для рефолдирующего буфера, оценивая влияние мочевины, ЭДТА, глицерина, NaCl, сахарозы, тритона X-100, твина 20, аргинина, пролина и ДТТ в буферной системе на основе 20 мМ Трис-НСl, pH 9,0 на выходы рекомбинантного антигена методом обращенно-фазовой ВЭЖХ. Денатурационную смесь центрифугировали (10 мин, 20000 g), фильтровали через капсульный фильтр (полиэфирсульфон, диаметр пор 0,22 мкм), рефолдировали разведением в 40 раз раствором 20 мМ Трис-

HCl, 1 мМ ЭДТА, pH 9,0 и инкубировали 20 ч при 4–8 °С при перемешивании. Конечные концентрации вспомогательных компонентов в рефолдинге составили 200 мМ мочевины, 1 мМ ДТТ. Раствор ренатурированных белков фильтровали через капсульный фильтр (полиэфирсульфон, 0,22 мкм) перед нанесением на хроматографическую колонну.

Хроматографическая очистка антигена корона-вирусного рекомбинантного

Хроматографическую очистку проводили с использованием хроматографа АКТА Purifier 100 (GE Healthcare, США). Для рекомбинантного коронавируса антигена расчетная молекулярная масса составила 53 кДа, изоэлектрическая точка 9,56 [1].

Для обогащения по целевому белку на первой стадии хроматографической очистки использовали катионообменную хроматографию и колонну HiTrap SP FF 5 мл (Cytiva, США). Поглощение детектировали при длине волны 280 нм. Буфер А: 20 мМ Трис-HCl, pH 9,0, Буфер В: 20 мМ Трис-HCl, 0,5М NaCl, pH 9,0. Перед нанесением на колонну раствора с рефолдированным белком, колонну предварительно уравнивали 10 объемами (CV) буфера В при скорости потока 5 мл/мин, затем промывали 5 CV буфера А. Не связавшуюся с сорбентом фракцию отбирали для количественного определения целевого белка. Далее колонну промывали 5 CV буфера А. Элюцию антигена осуществляли линейным градиентом 0-100% буфера В за 10 CV при скорости потока 5 мл/мин.

На второй стадии хроматографической очистки использовали гидрофобную хроматографию и колонну HiTrap Butyl FF 16/10 20мл (Cytiva, США). К раствору белка, полученному после первого этапа очистки, добавляли сульфат аммония до конечной концентрации 1М. Буфер А: 20 мМ Трис-HCl, 1,2 М сульфата аммония, pH 9,0, Буфер В: 20 мМ Трис-HCl, pH 9,0. Колонну уравнивали 10 CV буфера А при скорости потока 8 мл/мин, затем наносили образец. Не связавшуюся с сорбентом фракцию проверяли на содержание целевого белка. После нанесения образца колонну промывали 5 CV буфера А. Элюцию антигена осуществляли линейным градиентом 0-100% буфера В за 10 CV при скорости потока 8 мл/мин.

На финальной стадии хроматографической очистки очищенный рекомбинантный корона-вирусный антиген отделяли от остаточных белков, агрегатов и вспомогательных веществ с помощью эксклюзионной колонны HiPrep 16/60 Sephacryl S-200 HR (Cytiva, США). Для этого колонну уравнивали буфером А: 20мМ Трис-HCl, pH 7,4, 0,15М NaCl, 1% твин 20 при скоро-

сти потока 1 мл/мин. Образец, полученный после второй стадии хроматографической очистки и последующего концентрирования до 10 мг/мл с помощью Amicon Ultra-4 Centrifugal Filter 30 kDa MWCO Millipore (Sigma-Aldrich, США), наносили при скорости потока 0,8 мл/мин в объеме не более 4% от объема сорбента колонны. Элюирование осуществляли 1 CV буфера А. Количество антигена и чистоту во всех отобранных фракциях определяли методами обращенно-фазовой ВЭЖХ и электрофорезом в 12% ПААГ.

Измерение концентрации белка

Концентрацию белка в растворах определяли колориметрическим методом с использованием набора для анализа ВСА (Pierce, Германия) согласно протоколу производителя, методом обращенно-фазовой ВЭЖХ и спектрофотометрическим методом при длине волны 280 нм (теоретическая оптическая плотность белка с концентрацией 1 мг/мл составляет 1,02 опт. ед.).

Обращенно-фазовая ВЭЖХ

Для количественного определения содержания рекомбинантного белка и его чистоты применяли метод обращенно-фазовой ВЭЖХ с использованием хроматографа Agilent 1100 и аналитической колонки Jupiter 300 C18, 5 мкм, 300Å, 4,6 × 250 мм (Phenomenex, США). Элюирование проводили линейным градиентом 10-90% буфера В за 30 мин, скорость потока: 1 мл/мин, где буфер А — 0,1%-ная трифторуксусная кислота (ТФУ) в воде, буфер В — 0,1% ТФУ в ацетонитриле, температура колонки 50 °С. Поглощение детектировали при длине волны 214 нм. Время удержания основного пика рекомбинантного антигена составило 14±0,2 мин.

Определение содержания бактериальных эндотоксинов в конечном растворе субстанции белка

Полуколичественное определение содержания бактериальных эндотоксинов проводили с помощью геле-тромб варианта ЛАЛ-теста (Pyrotell Multi-test 0,03 EU/мл, США) согласно инструкции производителя.

Определение содержания остаточных белков штамма-продуцента в конечном растворе субстанции белка

Определение содержания остаточных белков *E. coli* в растворе очищенного белка осуществляли методом твердофазного ИФА с помощью набора *E. coli* HCP ELISA Kit (Cugnus, США) согласно инструкции производителя.

Определение содержания остаточной ДНК штамма-продуцента в конечном растворе субстанции белка

Определение содержания остаточной ДНК *E. coli* в растворе очищенного белка осуществляли с помощью набора *E. coli* Host Cell DNA Detection

Kit in Wells (Cygnus, США) согласно инструкции производителя.

Контроль специфичности связывания рекомбинантного коронавирусного антигена с Первым международным стандартом ВОЗ анти-SARS-CoV-2 иммуноглобулинов человека

Проверку специфической активности антигена осуществляли методом непрямого иммуноферментного анализа с применением Первого международного стандарта ВОЗ анти-SARS-CoV-2 иммуноглобулинов человека NIBSC code: 20/136 (MC). В основе проведения анализа лежит взаимодействие образца MC, содержащего анти-SARS-CoV-2 иммуноглобулины человека в единицах концентрации BAU/мл (Binding Antibody Units — Единицы Связывающих Антител), с сорбированным в лунках полистиролового планшета рекомбинантным коронавирусным антигеном и последующим образованием иммунного комплекса с конъюгатом моноклональных антител к тяжелой цепи иммуноглобулинов человека IgG-класса с пероксидазой хрена.

Для проверки специфической активности антигена на твердую фазу 96-луночного микропланшета иммобилизовали антиген в объеме 100 мкл в концентрации 2,5 мкг/мл в 0,067 М фосфатном буфере, планшет инкубировали в течение ночи при 40 °С. При добавлении в лунки планшета проб MC с последующей инкубацией происходило связывание антител MC с белками препарата антигена и образование в лунке иммобилизованного комплекса. MC разводили в 5 раз 1% БСА в 0,01 М фосфатносолевом буфере с 0,1%-ным твином 20 (общее разведение 1:100, что составляло концентрацию 10 BAU/мл), далее проводили двукратные разведения и вносили в лунки планшета по 100 мкл. После отмывки от несвязанных веществ в лунки добавляли конъюгат специфичных к IgG человека моноклональных антител с пероксидазой хрена. После инкубации с субстратом реакцию останавливали добавлением 0,1М H₂SO₄. Измерение оптической плотности производили при длине волны 450 нм.

Помимо оценки связывания антител международного стандарта с иммобилизованным антигеном CorD_PS, с помощью данного метода проводили оценку связывания антител образца пулированной сыворотки переболевших COVID-19 людей, предоставленного Санкт-Петербургским научно-исследовательским институтом эпидемиологии и микробиологии имени Пастера (образец СОП № 3).

Оценка продукции цитокинов CD4⁺Т-лимфоцитами в ответ на специфическую стимуляцию ex vivo с помощью проточной цитометрии

Исследование проводилось в соответствии с Хельсинкской декларацией Всемирной ме-

дицинской ассоциации «Этические принципы проведения научных медицинских исследований с участием человека» (WMA Declaration of Helsinki — Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects, 2013). В установленном порядке пациенты подписывали информированное согласие и согласие на обработку персональных данных, после чего производился забор крови.

Анализ уровня продукции цитокинов проводили по общепринятой методике, как это было описано ранее [19]. Из гепаринизированной периферической крови выделяли фракцию мононуклеарных клеток, которые в полной культуральной среде (приготовленной на основе RPMI-1640 (ООО «БиолоТ», Россия) с добавлением 10% инактивированной эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС, ООО «БиолоТ», Россия), 50 мкг/мл гентамицина (ООО «БиолоТ», Россия) и 2 мМ L-глутамин (ООО «БиолоТ», Россия) вносили по 200 мкл клеточной суспензии ($1-2 \times 10^7$ клеток в мл) в лунки 96-луночного планшета. В качестве «положительного» контроля протекания реакции использовали SEB (*Staphylococcus Enterotoxin B*) в конечной концентрации 1 мкг/мл. «Биологическим» контролем служило внесение PPD (purified protein derivative) в финальной концентрации 5 мкг/мл. Для стимуляции клеток использовали изучаемый антиген (пер) в финальной концентрации 25, 5 и 1 мкг/мл. Для блокады секреции цитокинов клетками во все образцы вносили блокатор аппарата Гольджи брэфелдин-А в конечной концентрации 10 мкг/мл. Далее образцы инкубировали при 37 °С в атмосфере 5% CO₂ в течение 18 часов. По завершении инкубации проводили окраску на поверхностные антигены, с использованием антител CD45RA-ECD, CD4-PC7, CD3-APC-Cy7 (все антитела производства Biolegend Inc., США), а также красителем Zombie Aqua (производства Biolegend Inc., США), позволяющим исключить из анализа погибшие клетки. Для фиксации и пермеабиллизации клеток использовали набор IntraPrep Permeabilization Reagent (Beckman Coulter Inc., США). Для выявления клеток, накопивших IFN γ , применяли антитела против IFN γ -FITC (Beckman Coulter Inc., США). Анализ образцов проводили на проточном цитофлуориметре Navios (Beckman Coulter Inc., США), оснащенном тремя диодными лазерами 405, 488 и 638 нм. В каждом из образцов оценивали относительное содержание IFN γ ⁺ клеток с фенотипом CD3⁺CD4⁺CD45RA⁻, результаты выражали в виде % IFN γ ⁺ лимфоцитов от общего числа Т-хелперов памяти (CD3⁺CD4⁺CD45RA⁻).

Результаты

Культивирование клеток *E. coli* CorD_PS в колбах с подбором оптимальных параметров экспрессии и наработкой аналитических количеств антигена производили в среде LB-M_Km при 37 °С, скорости перемешивания 180 об/мин, индукции экспрессии 0,1 мМ ИПТГ, pH 7,0. Выход биомассы в данных условиях составлял до 7 г/л за 15 часов индукции. При таких условиях эффективность экспрессии составляла до 30% от общего белка, оценка производилась денситометрически (Syngene Bio Imaging Systems, GB). Электрофорез лизатов культур в 12% ПААГ в денатурирующих условиях показал, что накопление белка в культуре присутствовало через 4 и 15 часов, молекулярная масса рекомбинантного антигена соответствовала ожидаемым 53 кДа. Экспрессия белка до добавления ИПТГ в культуру отсутствовала (рис. 1, 1-3).

Для культивирования *E. coli* CorD_PS в ферментере объемом 30 л состав культуральной среды был дополнен подпиткой глицерином и добавлением минеральных солей (мясной пептон, дрожжевой экстракт, NaCl, KH_2PO_4 , NH_4Cl , MgSO_4 , Na_2HPO_4). Инкубация происходила при 32 °С, pO_2 35-40%, pH 6,9. При достижении оптической плотности ОП_{600} значения 8 опт. ед., температуру

повышали до 37 °С и добавляли ИПТГ до конечной концентрации 0,1 мМ. Эффективнее всего антиген CorD_PS экспрессировался в течение 4 ч при поддержании постоянного pH, pO_2 . Ферментацию завершали при истощении субстрата, которое определяли по резкому увеличению показаний pO_2 . При таких условиях концентрация биомассы составила 20 г/л, содержание белка в ней составляло порядка 30% общего белка.

При анализе растворимости рекомбинантного антигена было показано, что он находится в нерастворимой фракции ТВ. Последовательные 3 стадии отмывок ТВ раствором 20 мМ Трис-НСl, 2% Тритон X-100, 0,5 М NaCl, 1 мМ ЭДТА, pH 8,0 позволили очистить ТВ от части балластных компонентов дезинтегрированных клеток *E. coli*. Раствор 20 мМ Трис-НСl, 8 М мочевины, 40 мМ ДТТ, 1 мМ ЭДТА pH 8,0, добавленный из расчета 20 мл на 1 г ТВ полностью растворял тельца включения (рис. 1, 4-8). Раствор солюбилизованных ТВ имел концентрацию рекомбинантного коронавирусного антигена ~ 10 мг/мл.

Подбор вспомогательных компонентов рефолдирующего буфера осуществляли в два этапа после определения значения оптимального pH 9,0. На первом этапе выбирали оптимальную концентрацию аддитива (вспомогательного ком-

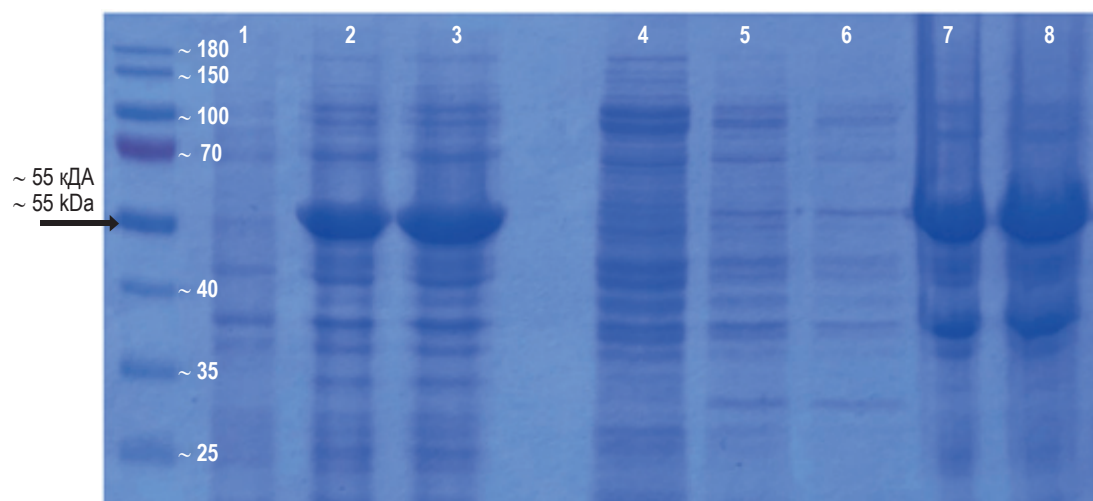


Рисунок 1. Электрофореграмма экспрессии CorD_PS через 4 ч и 15 ч после индукции 0,1 мМ ИПТГ в колбах; отмывка и солюбилизация ТВ CorD_PS

Примечание. 1. pCorD_PS до индукции; 2. CorD_PS, индукция 4 ч; 3. CorD_PS, индукция 15 ч; 4. CorD_PS отмывка ТВ, супернатант 1; 5. CorD_PS отмывка ТВ, супернатант 2; 6. CorD_PS отмывка ТВ, супернатант 3; 7. Солюбилизованные ТВ, 3 мкл; 8. Солюбилизованные ТВ, 5 мкл; Маркер молекулярного веса белков PageRuler™ Prestained Protein Ladder, 10 to 180 kDa (Thermo Scientific, кат. ном. 26616).

Figure 1. Electrophoregram of CorD_PS expression at 4 h and 15 h after 0.1mM IPTG induction in flasks; washing and solubilization of IB CorD_PS

Note. 1. pCorD_PS before induction; 2. CorD_PS, induction 4 h; 3. CorD_PS, induction 15 h; 4. CorD_PS washing IB, supernatant 1; 5. CorD_PS washing IB, supernatant 2; 6. CorD_PS washing IB, supernatant 3; 7. Solubilized IB, 3 mcl; 8. Solubilized IB, 5 mcl; PageRuler™ proteins Prestained Protein Ladder, 10 to 180 kDa (Thermo Scientific, cat. nom. 26616).

понента), на втором этапе — оценивали взаимное влияние компонентов (табл. 1, 2).

В результате солюбилизованный коронавирусный антиген рефолдировали разведением в 40 раз до конечной концентрации компонентов рефолдирующего буфера 200 мМ мочевины, 1 мМ ДТТ. Эффективность рефолдинга была оценена методом обращенно-фазовой ВЭЖХ и составила 75%.

В ходе ионообменной хроматографии на хроматографическую колонну HiTrap SP FF 5 мл нанесли 1600 мл рефолдирующей смеси (300 мг) с концентрацией целевого антигена около 0,188 мг/мл. Элюирование целевого белка происходило при кондуктивности 12 мСм/см. В ходе первой стадии хроматографической очистки было получено 37 мл целевой фракции белка с концентрацией с 7,05 мг/мл. Выход целевого белка на первой стадии хроматографической очистки составил 87%. Чистота элюата, проанализированная с помощью обращенно-фазовой ВЭЖХ и

электрофореза в 12% ПААГ в денатурирующих условиях, составила 85%.

В ходе гидрофобной хроматографии на колонну HiTrap Butyl FF 16/10 20 мл нанесли 40 мл полученного в ходе первой стадии хроматографической очистки элюата. Элюирование целевого белка происходило при кондуктивности 28 мСм/см. Было получено 120 мл целевой фракции антигена, концентрация элюированного белка составила 1,86 мг/мл, выход целевого белка на первой стадии хроматографической очистки составил 86%. Чистота элюата составила 93%.

На финальном этапе очистки и смены буфера путем эксклюзионной хроматографии на колонну HiPrep 16/60 Sephacryl S-200 HR внесли 5 мл сконцентрированной до 10 мг/мл фракции антигена, полученной с помощью гидрофобной хроматографии. Концентрация элюированного белка составила 1,4 мг/мл, выход целевого белка составил 95%. Данные по выходам антигена представлены в таблице 3. Чистота белка, оцененная с помощью ВЭЖХ, составила 98,43% (рис. 2).

ТАБЛИЦА 1. ИССЛЕДУЕМЫЕ ДИАПАЗОНЫ КОНЦЕНТРАЦИИ ВСПОМОГАТЕЛЬНЫХ КОМПОНЕНТОВ РЕФОЛДИРУЮЩЕГО БУФЕРА

TABLE 1. STUDIED CONCENTRATION RANGES OF THE REFOLDING BUFFER SUPPLEMENTARY COMPONENTS

Аdditивы Additives	Диапазон исследуемых концентраций Concentration ranges	Функция Function	Выбранная концентрация аддитива Selected additive concentration	Выход, % Yield, %
Мочевина Urea	0,1-2,0 М	Хаотроп Chaotrope	0,2 М	70%
ЭДТА EDTA	1-5 мМ	Хелатор Chelator	1 мМ	65%
Глицерин Glycerol	5-50%	Стабилизатор Stabilizer	5%	67%
NaCl	50 мМ-1 М	Стабилизатор Stabilizer	150 мМ	65%
Сахароза Sucrose	1-10%	Стабилизатор Stabilizer	3%	67%
Трис Tris	10 мМ-1 М	Буферная система Buffer system	20 мМ	62%
Тритон X-100 Triton X-100	0,1-1,0%	Неионный детергент Nonionic detergent	0,1%	64%
Твин 20 Tween 20	0,1-1,0%	Неионный детергент Nonionic detergent	1%	67%
Аргинин Arginine	0,2-1,0 М	Стабилизатор Stabilizer	1 М	36%
Глицин Glycine	0,2-1,0 М	Стабилизатор Stabilizer	—	—
Пролин Proline	0,2-1,0 М	Стабилизатор Stabilizer	—	—
ДТТ DTT	1-40 мМ	Восстанавливающий агент Reducing agent	1 мМ	65%

ТАБЛИЦА 2. ОЦЕНКА КОМПЛЕКСНОГО ВЛИЯНИЯ ОТОБРАННЫХ ВСПОМОГАТЕЛЬНЫХ ВЕЩЕСТВ РЕФОЛДИРУЮЩЕГО БУФЕРА НА ВЫХОДЫ РЕФОЛДИНГА АНТИГЕНА CorD_PS

TABLE 2. ASSESSMENT OF THE COMPLEX EFFECT OF THE SELECTED REFOLDING BUFFER SUPPLEMENTARY COMPONENTS ON THE CorD_PS ANTIGEN REFOLDING YIELDS

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Мочевина Urea	+	+	+	+	+	+	+	+	–
ЭДТА EDTA	+	+	+	+	+	+	+	–	+
Глицерин Glycerol	–	–	–	–	+	–	–	–	–
NaCl	–	–	–	+	–	–	–	–	–
Сахароза Sucrose	–	–	+	–	–	–	–	–	–
Тритон X-100 Triton X-100	–	+	–	–	–	–	–	–	–
Твин 20 Tween 20	+	–	–	–	–	–	–	–	–
ДТТ DTT	+	+	+	+	+	+	–	+	+
Выход, % Yield, %	73%	69%	71%	70%	72%	75%	72%	71%	64%

Конечный белок был проверен на ряд примесей рекомбинантных белков, указанных в Государственной фармакопее РФ XIV [2]. Содержание липополисахаридов в образцах не превышало 800 ЕЭ/мг белка. Содержание ДНК штамма-продуцента в образцах не превышало 200 нг/мг белка. Содержание белков штамма-продуцента не превышало 10 мкг/мг белка.

Описанный процесс позволяет получать 5–7 грамм антигена коронавируса рекомбинантного CorD_PS чистотой более 95%, соответствующего необходимым параметрам качества,

за один цикл культивирования в 30 л ферментационной среды.

Контроль специфичности рекомбинантного коронавируса антигена осуществляли относительно МС, содержащего анти-SARS-CoV-2 IgG-антитела человека к белкам коронавируса SARS-CoV-2 в единицах концентрации ВАУ/мл, а также относительно образца СОП № 3, предоставленного НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера. Учет результатов испытания проводили при условии, что значения ОП в лунках МС не должны быть меньше 0,25 опт. ед. Результаты анализа представлены в таблице 4.

ТАБЛИЦА 3. ПАРАМЕТРЫ ЧИСТОТЫ ФРАКЦИИ АНТИГЕНА CorD_PS НА РАЗЛИЧНЫХ СТАДИЯХ ПРОЦЕССА ПОЛУЧЕНИЯ ВЫСОКООЧИЩЕННОГО ПРЕПАРАТА

TABLE 3. PURITY PARAMETERS OF THE CorD_PS ANTIGEN FRACTION AT VARIOUS STAGES OF THE PROCESS OF OBTAINING A HIGHLY PURIFIED SUBSTANCE

Стадия очистки Purification stage	Концентрация антигена, мг/мл Antigen concentration, mg/mL	Количество, мг Amount, mg	Выход, % Yield, %	Чистота, % Purity, %	Эндотоксины, ЕЭ/мг Endotoxins, EU/mg
Тельца включения Inclusion bodies	10	400	–	40%	–
Рефолдинг Refolding	0,188	300	75%	–	–
SP sepharose	7,05	260	87%	85%	> 1000
Butyl sepharose	1,86	223	86%	93%	< 800
Sephacryl	1,4	50	95%	98,43%	< 800

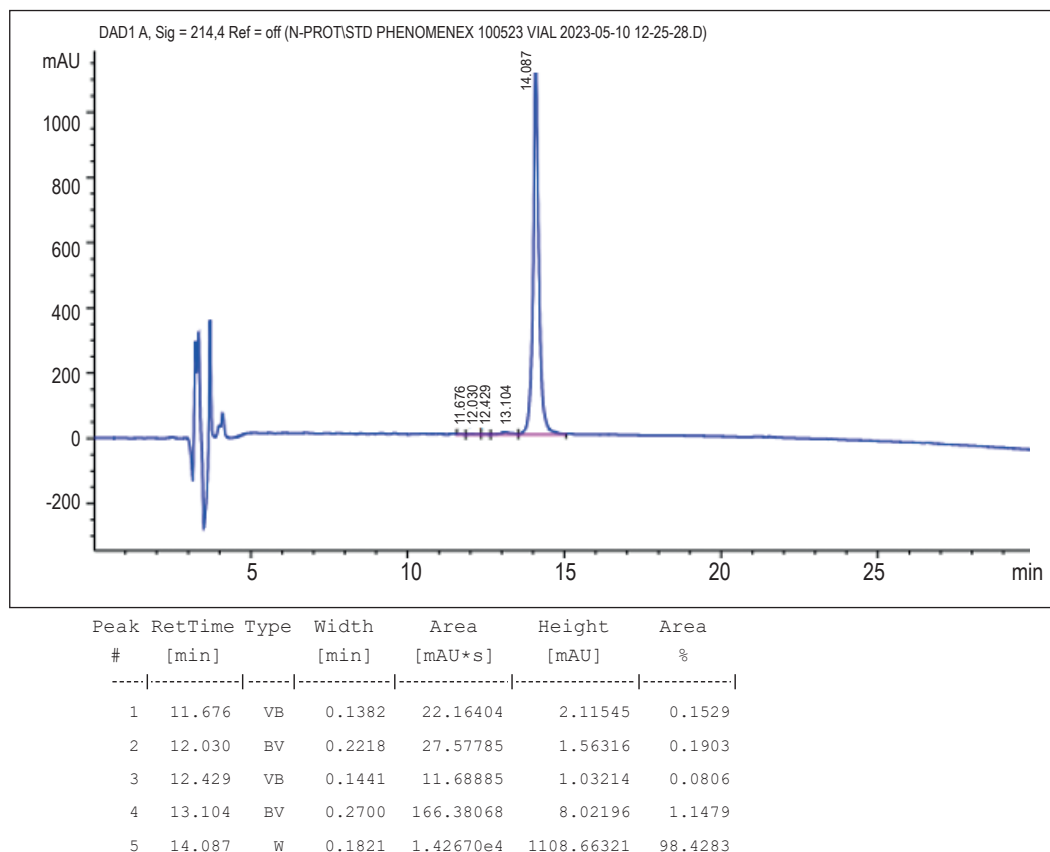


Рисунок 2. ВЭЖХ-анализ образца антигена коронавирусного рекомбинантного CorD_PS на хроматографе Agilent 1100 с использованием аналитической колонки Jupiter C18, 5 мкм, 300 А°, 4,6 × 250 мм (Phenomenex, США)

Figure 2. HPLC-analysis of the coronavirus recombinant CorD_PS antigen sample using Agilent 1100 chromatograph with a Jupiter C18. 5 μ m, 300 A°, 4.6 \times 250 mm analytical column (Phenomenex, USA)

В результате была показана корреляция между оптическими плотностями СОП № 3 и Международного стандарта (рис. 3). Коэффициент регрессии $R^2 = 0,9796$.

Таким образом, была подтверждена специфичность рекомбинантного коронавирусного антигена CorD_PS в отношении анти-SARS-

CoV-2 IgG-антител человека к белкам коронавируса SARS-CoV-2.

Оценка продукции цитокинов CD4⁺T-лимфоцитами в ответ на специфическую стимуляцию *ex vivo* с помощью проточной цитометрии

На рисунке 4 приведены результаты изучения продукции IFN γ Т-лимфоцитами перифериче-

ТАБЛИЦА 4. ЗНАЧЕНИЯ ОП (450 нм) 2-КРАТНЫХ РАЗВЕДЕНИЙ ОБРАЗЦА СОП № 3 И МЕЖДУНАРОДНОГО СТАНДАРТА

TABLE 4. OBTAINED VALUES OF OD (450 nm) OF THE SAMPLE SOP No. 3 AND THE INTERNATIONAL STANDARD

	ОП МС OD IS	ОП СОП № 3 OD SOP No. 3
A	3,0743	2,1852
B	2,0223	1,4554
C	1,0166	1,0028
D	0,5097	0,6551
E	0,2211	0,3667
F	0,1154	0,2100
G	0,0630	0,1141
H	0,0349	0,0632

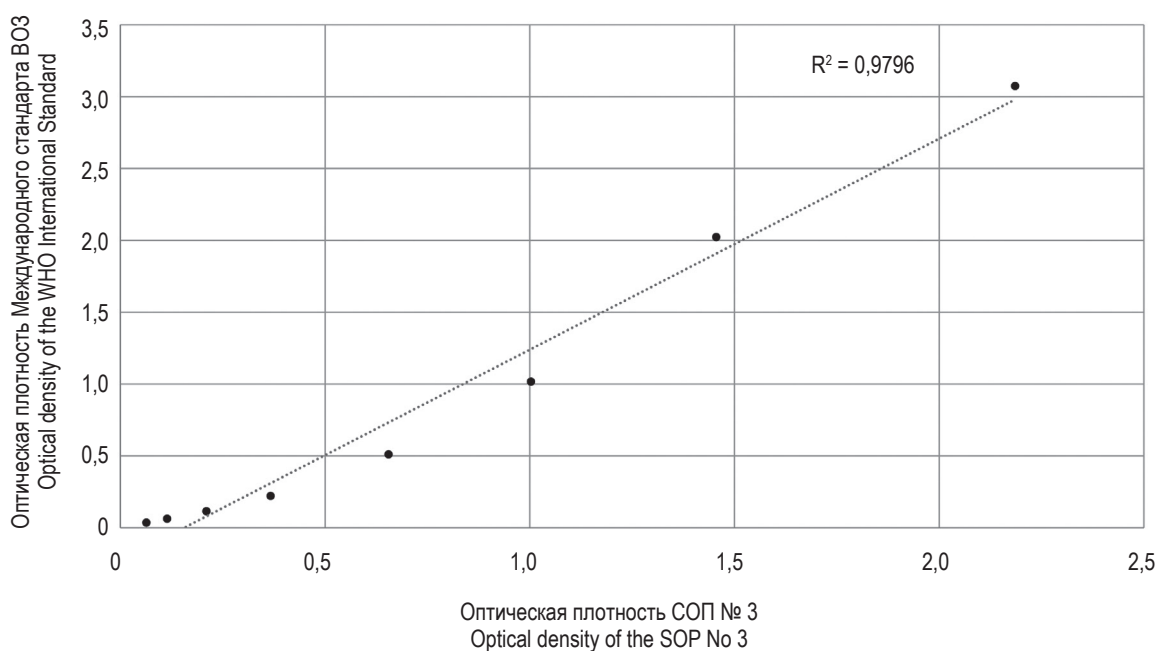


Рисунок 3. График корреляции между значениями оптической плотности ОП (450 нм) 2-кратных разведений образца СОП № 3 и Международного стандарта

Figure 3. Correlation graph between the optical density values OD (450 nm) of 2-fold dilutions of the sample SOP No. 3 and the International Standard

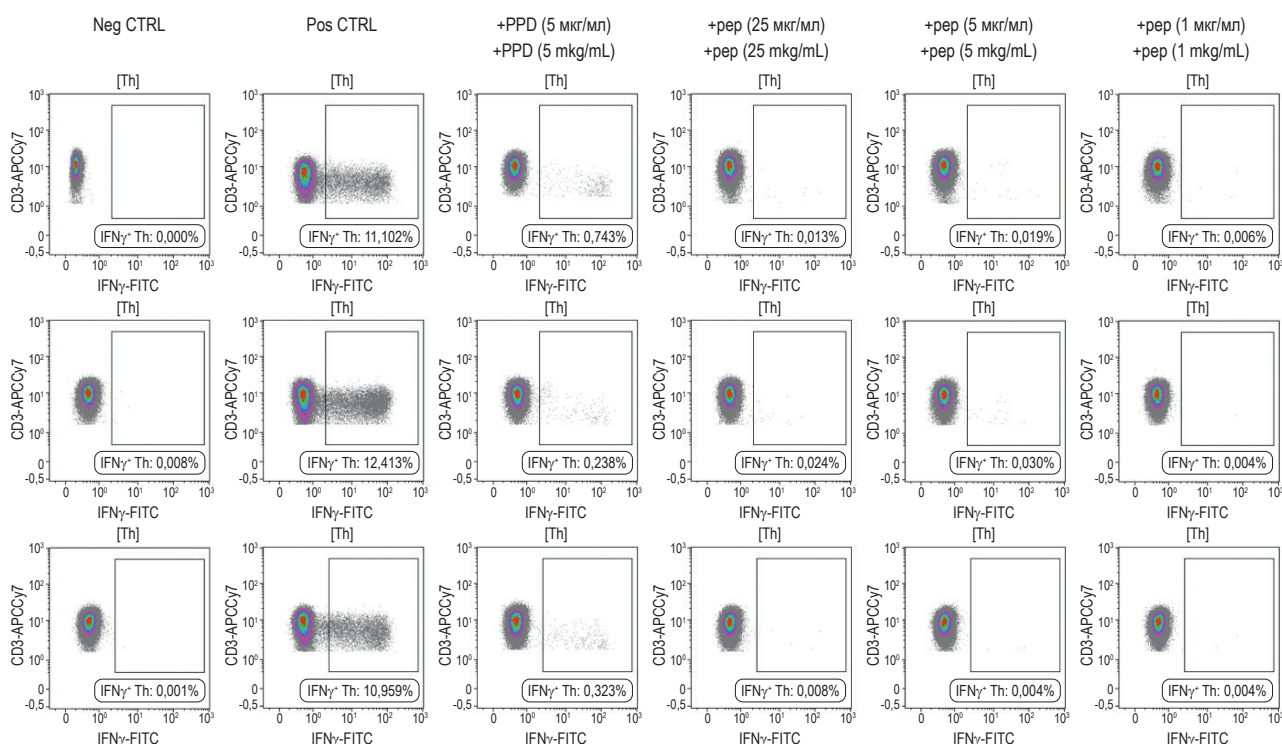


Рисунок 4. Результаты изучения продукции IFNγ лимфоцитами Т-хелперами периферической крови добровольцев ex vivo методом проточной цитометрии

Figure 4. Results of ex vivo studying IFNγ production by T helper lymphocytes from volunteers' peripheral blood by flow cytometry

ской крови добровольцев в культуре при стимуляции различными антигенами.

Слева направо — спонтанная продукция $IFN\gamma$ (отрицательный контроль); положительный контроль (стимуляция SEB, 5 мкг/мл), биологический контроль (стимуляция антигенами *Mycobacterium tuberculosis*, PPD, 5 мкг/мл), стимуляция рекомбинантным коронавиральным антигеном (финальная концентрация пер — 25, 5 и 1 мкг/мл). По оси абсцисс — уровень экспрессии $IFN\gamma$, по оси ординат — уровень экспрессии CD3; область « $IFN\gamma^+$ Th» содержит $CD4^+$ Т-лимфоциты, которые ответили продукцией $IFN\gamma$ на стимуляцию в условиях *in vitro*. Результаты приведены в виде % $IFN\gamma^+$ клеток от общей популяции Т-хелперов памяти с фенотипом $CD3^+CD4^+CD45RA^-$. Первый и второй ряды гистограмм — добровольцы, перенесшие COVID-19; третий ряд гистограмм — доброволец, не болевший COVID-19.

Было показано, что подобранные нами условия *in vitro*, в которых осуществлялась инкубация клеток, не сопровождались спонтанной активацией клеток (гистограммы негативного контроля на рисунке 4). Более того, подобранные условия были весьма физиологичными, так как в пробах «позитивного» контроля имело место увеличение продукции $IFN\gamma$ $CD4^+$ Т-лимфоцитами, а также $CD4^+$ Т-клетки эффективно отвечали на стимуляцию антигенами *Mycobacterium tuberculosis*, что указывает на высокую эффективность нашей тест-системы для *in vitro* определения антиген-специфических Т-клеток. Далее нами было показано, что то у здорового оказался % маленький и везде одинаковый, а у болевших большой, и максимальный от 5 мкг.

Обсуждение

Таким образом, оптимальной концентрацией препарата рекомбинантного коронавирального антигена является 5 мкг/мл.

При оценке динамики иммунного ответа, сформированного против новой коронавиральной инфекции, большая часть усилий ученых была направлена на изучение роли антител, вырабатываемых после естественной инфекции или вакцинации, без учета оценки влияния клеточного иммунного ответа, который, как было показано, определяет течение инфекции SARS-CoV-2 [3, 14, 24]. Циркулирующие Т-клетки, специфичные к SARS-CoV-2, были обнаружены у выздоравливающих лиц с бессимптомной и легкой формой COVID-19, серонегативных по антителам, что позволяет предположить, что в отсутствие антител сильный и широко специфичный Т-клеточный ответ может быть достаточным для обеспечения иммунной защиты от SARS-CoV-2 [11]. Формирование Т-клеточной иммунологической памя-

ти после заражения и/или вакцинации и последующая реакция распознавания при повторной встрече с антигеном могут использоваться в разработке диагностической тест-системы для качественного определения Т-клеточного иммунного ответа.

Мы разработали рекомбинантный коронавиральный антиген на основе полноразмерного белка нуклеокапсида SARS-CoV-2, дополнительно содержащего Т-клеточные антигенные детерминанты структурных белков (S, E, M), который может быть использован в качестве эффективного инструмента для определения Т-клеточных реакций у пациентов с COVID-19 с различной степенью тяжести заболевания и/или оценки иммуногенности кандидатных вакцин в их клинических испытаниях [1]. В текущей работе мы представили методики получения очищенного препарата антигена и контроля его специфической активности методом оценки продукции цитокинов $CD4^+$ Т-лимфоцитами с помощью проточной цитометрии в ответ на специфическую стимуляцию *ex vivo*. Получение высокоочищенного белка включает в себя сверхэкспрессию гена, кодируемого плазмидой pCorD_PS в *E. coli*, отмывку и солиubilизацию телец включения, рефолдинг денатурированного белка и очистку препарата антигена с помощью последовательных стадий ионообменной, гидрофобной и эксклюзионной хроматографии.

Разработка условий культивирования штамма *E. coli CorD_PS* заключалась в подготовке двух стадий: подбор подходящего состава среды для микробиологического биосинтеза и условий микробиологического биосинтеза для экспрессии рекомбинантного белка и получения оптимальных выходов. Подбор штамма, экспрессионного вектора и параметров культивирования определили получение высоких выходов рекомбинантного белка в *E. coli*.

В большинстве случаев экспрессия рекомбинантных белков в *E. coli* приводит к образованию нерастворимых агрегатов, известных как ТВ [9, 13, 20]. Процент рефолдированных биоактивных белков из ТВ *E. coli*, как правило, очень низок и вносит вклад в основные затраты на производство рекомбинантных белков [8]. Тем не менее в нерастворимой фракции накапливается большее количество белка, который также устойчив к расщеплению протеазами за счет депонирования в ТВ. Если для белка удастся разработать подходящие высокопроизводительные процедуры рефолдинга и хроматографической очистки, образование ТВ будет выгодным в производстве рекомбинантного белка [5, 22, 23]. Стратегия, используемая для извлечения биоактивного белка из ТВ, в основном заключается в последовательных этапах: выделение ТВ из клетки *E. coli* и от-

мывка; солюбилизация агрегатов ТВ; рефолдинг и очистка рефолдированных белков с помощью различных хроматографических методов [6]. Денатурация и рефолдинг являются критическими этапами, оптимизация которых часто требуется для обеспечения правильной ренатурации белка, депонированного в тельцах включения, и оптимальных выходов [25].

ТВ, содержащие CorD_PS, солюбилизировали с использованием хаотропного реагента — 8 М мочевины. Мочевина разрушает гидрофобные взаимодействия образующихся агрегатов, но не дестабилизирует общую белковую структуру, влияя на структуру воды, окружающую белковые молекулы. Белок разворачивается за счет снижения диэлектрической проницаемости постоянной среды [15]. При денатурации и сворачивании белка в присутствии мочевины часто происходит карбамирование аминокрупп [7, 17, 27], это связано с тем, что образованный в процессе разложения мочевины цианат [12] реагирует с аминокруппами белка с образованием стабильного карбамированного продукта [26, 28]. Разложение мочевины ускоряется при щелочном pH и при повышении температуры. Таким образом, рекомендуется готовить свежие растворы мочевины из сверхчистого (> 99%) твердого реагента и выполнять этапы рефолдинга/диализа при низкой температуре (4 °C) [12, 26], чтобы уменьшить образование цианата. Буферные растворы, содержащие первичные амины, такие как Трис, глицин или бикарбонат аммония, обеспечивают возможность удаления образующегося цианата [16, 27]. Буфер для денатурации рекомбинантного коронавируса антигена также содержал 40 мМ ДТТ для восстановления дисульфидных связей, тогда как в буфере для рефолдинга концентрация ДТТ резко снижалась, что способствовало спонтанному их образованию [15]. Хелатирующий агент ЭДТА использовался для предотвращения катализируемого металлами окисления воздухом цистеинов нецелевых белков.

Процесс рефолдинга — важный этап для получения высоких выходов белка, так как солюбилизованный белок агрегирует во время процесса сворачивания. Агрегация белков — реакция нулевого порядка, в то время как рефолдинг является реакцией первого порядка. Так, скорость агрегации выше, чем скорость фолдинга при высокой исходной концентрации белка. Эффективность процесса рефолдинга выше при низкой конечной концентрации белка во время рефолдинга. Из-за этой кинетической конкуренции обычно используют концентрации белка порядка 10–15 мкг/мл в рефолдирующей смеси. Однако в нашем случае оптимальной оказалась концентрация антигена CorD_PS 250 мкг/мл. Рефолдинг разбавлением позволил снизить остаточную концентрацию мо-

чевины до 0,2М, данная концентрация увеличивала растворимость белка и предотвращала его агрегацию.

Для подавления процессов агрегации и увеличения выхода белка мы пробовали использовать аминокислоты глицин, пролин и L-аргинин, которые за счет подавления агрегации промежуточных продуктов сворачивания могут увеличивать выход целевого белка. Однако при их использовании нам не удавалось достичь высоких выходов белка. При очистке от аргинина рекомбинантный антиген выпадал в осадок, вероятно, из-за неполного рефолдинга рекомбинантной молекулы. Также добавление поверхностно-активного вещества Triton-X100 отрицательно влияло на выход рефолдинга.

Изучение специфической активности созданного химерного антигена исследовано в тесте активации Т-лимфоцитов, оцененного по способности продуцировать интерферон-гамма при анализе методом цитофлюориметрии. Оказалось, что CD4⁺Т-лимфоциты с фенотипом CD3⁺CD4⁺CD45RA⁺ (Т-хелперы памяти), выделенные у добровольцев, перенесших COVID-19, ответили продукцией IFN γ на стимуляцию химерным антигеном в условиях *in vitro*. При этом лимфоциты добровольцев, не болевших COVID-19, не отвечали при тех же условиях постановки опыта. Продукция IFN γ Т-хелперами памяти (CD3⁺CD4⁺CD45RA⁺) из фракции мононуклеарных клеток периферической крови в ответ на специфическую стимуляцию антигеном CorD_PS *ex vivo* в концентрациях 25, 5 и 1 мкг/мл показала высокую эффективность нашей тест-системы для *in vitro* определения антиген-специфических Т-клеток. Данные свидетельствуют, что диагностикум может оценивать формирование ответа Th1-клеток, о чем свидетельствуют повышенные уровни IFN γ . Важность ответов Th1-клеток для долгосрочной защиты от COVID-19 была ранее подчеркнута исследованием лиц с бессимптомным и легким течением COVID-19 в анамнезе [24].

Безусловно, разработанный комбинированный антиген имеет ряд эпитопов не только для взаимодействия с Т-клеточным рецептором, но и для связывания антител. Во всяком случае это касается значительного участка, представленного N-белком. Действительно, оказалось, что разработанный антиген взаимодействует с антителами при оценке с помощью непрямого ИФА с использованием Первого международного стандарта ВОЗ анти-SARS-CoV-2 иммуноглобулинов (First WHO International Standard for anti-SARS-CoV-2 Immunoglobulin), представляющего собой стандартизированный препарат пулированных образцов сыворотки крови людей, переболевших COVID-19, содержащий антитела

к различным эпитопам структурных белков коронавируса SARS-CoV-2 в высоком титре. Титрование Международного стандарта в интервале от 5 до 0,078 ВАУ/мл показало абсолютную линейную зависимость между концентрацией антител и уровнем иммуноферментной реакции ($r = 0,9999$) с белковым химерным антигеном.

Выводы

1. Разработанный протокол хроматографической очистки рекомбинантного коронавирусного антигена из рефолдирующей смеси для получения субстанции антигена с необходимыми параметрами качества включает три этапа: ионообменная, гидрофобная и эксклюзионная

хроматографии. Описанный процесс позволяет получать 5-7 грамм антигена коронавирусного рекомбинантного CorD_PS чистотой более 95%, остаточными ЛПС менее 800 ЕЭ/мг, ДНК штамма-продуцента — не более 200,0 нг/мг белка, БШП — не более 10 мкг/мг белка (не более 1% от содержания белка) за один цикл культивирования в 30 л ферментационной среды.

2. В результате исследований специфической иммунологической активности рекомбинантного коронавирусного антигена CorD_PS была подтверждена концепция возможности его использования в качестве диагностикума для определения формирования Т-клеточного иммунного ответа.

Список литературы / References

1. Копать В.В., Рябченкова А.А., Чирак Е.Л., Чирак Е.Р., Саенко А.И., Колмаков Н.Н., Симбирцев А.С., Духовлинов И.В., Тотолян А.А. Разработка структуры и штамма-продуцента *E. coli* для антигена, содержащего последовательности белков N, S, М, Е коронавируса SARS-CoV-2 // Инфекция и иммунитет, 2023. Т. 13, № 4, С. 653-662. [Kopat V.V., Riabchenkova A.A., Chirak E.L., Chirak E.R., Saenko A.I., Kolmakov N.N., Simbirtsev A.S., Dukhovlinov I.V., Totolian A.A. Designing structure and *E. coli* strain-producer bearing SARS-CoV-2 N, S, М, Е protein-related sequence antigen. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2023, Vol. 13, no. 4, pp. 653-662. (In Russ.)] doi: 10.15789/2220-7619-DSA-15624.
2. ОФС. 1.7.1.0007.15. Лекарственные средства, получаемые методами рекомбинантных ДНК. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIII изд. 2016. С. 521-541. [OFS. 1.7.1.0007.15. Medicines obtained by recombinant DNA methods. State Pharmacopoeia of the Russian Federation. 13th ed., 2016, pp. 521-541].
3. Bertoletti A., le Bert N., Qui M., Tan A.T. SARS-CoV-2-specific T cells in infection and vaccination. *Cell. Mol. Immunol.*, 2021, Vol. 18, no. 10, pp. 2307-2312.
4. Bertoletti A., le Bert N., Tan A.T. SARS-CoV-2-specific T cells in the changing landscape of the COVID-19 pandemic. *Immunity*, 2022, Vol. 55, no. 10, pp. 1764-1778.
5. Burgess R.R. Refolding solubilized inclusion body proteins. *Methods Enzymol.*, 2009, Vol. 463, pp. 259-282.
6. Clark E.D.B. Protein refolding for industrial processes. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 2001, Vol. 12, no. 2, pp. 202-207.
7. Čejka J., Vodrázka Z., Salák J. Carbamylation of globin in electrophoresis and chromatography in the presence of urea. *Biochim. Biophys. Acta*, 1968, Vol. 154, no. 3, pp. 589-591.
8. Datar R.V., Cartwright T., Rosen C.G. Process economics of animal cell and bacterial fermentations: a case study analysis of tissue plasminogen activator. *Biotechnology*, 1993, Vol. 11, no. 3, pp. 349-357.
9. Fahnert B., Lilie H., Neubauer P. Inclusion bodies: formation and utilization. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.*, 2004, Vol. 89, pp. 93-142.
10. Fallet B., Foglierini M., Porret R., Alcaraz-Serna A., Sauvage C., Jenelten R., Caplanusi T., Gilliet M., Perez L., Fenwick C., Genolet R., Harari A., Bobisse S., Gottardo R., Pantaleo G., Muller Y.D. Intradermal skin test with mRNA vaccines as a surrogate marker of T cell immunity in immunocompromised patients. *J. Infect.*, 2023, Vol. 87, no. 2, pp. 111-119.
11. GeurtsvanKessel C.H., Geers D., Schmitz K.S., Mykityn A.Z., Lamers M.M., Bogers S., Scherbeijn S., Gommers L., Sablerolles R.S.G., Nieuwkoop N.N., Rijsbergen L.C., van Dijk L.L.A., de Wilde J., Alblas K., Breugem T.I., Rijnders B.J.A., de Jager H., Weiskopf D., van der Kuy P.H.M., Sette A., de Vries R.D. Divergent SARS-CoV-2 Omicron-reactive T and B cell responses in COVID-19 vaccine recipients. *Sci. Immunol.*, 2022, Vol. 7, no. 69, eabo2202. doi: 10.1126/sciimmunol.abo2202.
12. Hagel P., Gerding J.J., Fiegggen W., Bloemendal H. Cyanate formation in solutions of urea: I. Calculation of cyanate concentrations at different temperature and pH. *Biochim. Biophys. Acta*, 1971, Vol. 243, no. 3, pp. 366-373.
13. Hartley D.L., Kane J.F. Properties of inclusion bodies from recombinant *Escherichia coli*. *Biochem. Soc. Trans.*, 1988, Vol. 16, no. 2, pp. 101-102.
14. Kalimuddin S., Tham C.Y.L., Qui M., de Alwis R., Sim J.X.Y., Lim J.M.E., Tan H.C., Syenina A., Zhang S.L., le Bert N., Tan A.T., Leong Y.S., Yee J.X., Ong E.Z., Ooi E.E., Bertoletti A., Low J.G. Early T cell and binding antibody responses are associated with COVID-19 RNA vaccine efficacy onset. *Med*, 2021, Vol. 2, no. 6, pp. 682-688.

15. Laslo A.C., Ganea E., Obinger C. Refolding of hexameric porcine leucine aminopeptidase using a cationic detergent and dextrin-10 as artificial chaperones. *J. Biotechnol.*, 2009, Vol. 140, no. 3-4, pp. 162-168.
16. Lin M.F., Williams C., Murray M.V., Conn G., Ropp P.A. Ion chromatographic quantification of cyanate in urea solutions: estimation of the efficiency of cyanate scavengers for use in recombinant protein manufacturing. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, 2004, Vol. 803, no. 2, pp. 353-362.
17. Lippincott J., Apostol I. Carbamylation of cysteine: a potential artifact in peptide mapping of hemoglobins in the presence of urea. *Analyt. Biochem.*, 1999, Vol. 267, no. 1, pp. 57-64.
18. Liu L., Wang P., Nair M.S., Yu J., Rapp M., Wang Q., Luo Y., Chan J.F., Sahi V., Figueroa A., Guo X.V., Cerutti G., Bimela J., Gorman J., Zhou T., Chen Z., Yuen K.Y., Kwong P.D., Sodroski J.G., Yin M.T., Ho D.D. Potent neutralizing antibodies against multiple epitopes on SARS-CoV-2 spike. *Nature*, 2020, Vol. 584, no. 7821, pp. 450-456.
19. Matyushenko V., Isakova-Sivak I., Kudryavtsev I., Goshina A., Chistyakova A., Stepanova E., Prokopenko P., Sychev I., Rudenko L. Detection of IFN γ -secreting CD4⁺ and CD8⁺ memory T cells in COVID-19 convalescents after stimulation of peripheral blood mononuclear cells with live SARS-CoV-2. *Viruses*, 2021, Vol. 13, no. 8, 1490. doi: 10.3390/v13081490.
20. Mitraki A., Fane B., Haase-Pettingell C., Sturtevant J., King J. Global suppression of protein folding defects and inclusion body formation. *Science*, 1991, Vol. 253, no. 5015, pp. 54-58.
21. Moga E., Lynton-Pons E., Domingo P. The robustness of cellular immunity determines the fate of SARS-CoV-2 infection. *Front. Immunol.*, 2022, Vol. 13, 904686. doi: 10.3389/fimmu.2022.904686.
22. Patra A.K., Mukhopadhyay R., Mukhija R., Krishnan A., Garg L.C., Panda A.K. Optimization of inclusion body solubilization and renaturation of recombinant human growth hormone from *Escherichia coli*. *Protein Expr. Purif.*, 2000, Vol. 18, no. 2, pp. 182-192.
23. Rudolph R., Lilie H. *In vitro* folding of inclusion body proteins. *FASEB J.*, 1996, Vol. 10, no. 1, pp. 49-56.
24. Sekine T., Perez-Potti A., Rivera-Ballesteros O., Strålin K., Gorin J.B., Olsson A., Llewellyn-Lacey S., Kamal H., Bogdanovic G., Muschiol S., Wullmann D.J., Kammann T., Emgård J., Parrot T., Folkesson E., Karolinska COVID-19 Study Group, Rooyackers O., Eriksson L.I., Henter J.I., Sönnnerborg A., Buggert M. Robust T cell immunity in convalescent individuals with asymptomatic or mild COVID-19. *Cell*, 2020, Vol. 183, no. 1, pp. 158-168.
25. Singh S.M., Panda A.K. Solubilization and refolding of bacterial inclusion body proteins. *J. Biosci. Bioeng.*, 2005, Vol. 99, no. 4, pp. 303-310.
26. Stark G.R. Reactions of cyanate with functional groups of proteins. III. Reactions with amino and carboxyl groups. *Biochemistry*, 1965, Vol. 4, no. 6, pp. 1030-1036.
27. Sun S., Zhou J.Y., Yang W., Zhang H. Inhibition of protein carbamylation in urea solution using ammonium-containing buffers. *Analyt. Biochem.*, 2014, Vol. 446, pp. 76-81.
28. Volkin D.B., Mach H., Middaugh C.R. Degradative covalent reactions important to protein stability. *Mol. Biotechnol.*, 1997, Vol. 8, pp. 105-122.

Авторы:

Копать В.В. — директор по развитию ООО «АТГ Сервис Ген», Санкт-Петербург, Россия

Рябченкова А.А. — научный сотрудник ООО «АТГ Сервис Ген», Санкт-Петербург, Россия

Чирак Е.Л. — научный сотрудник ООО «АТГ Сервис Ген», Санкт-Петербург, Россия

Чирак Е.Р. — научный сотрудник ООО «АТГ Сервис Ген», Санкт-Петербург, Россия

Саенко А.И. — главный технолог ООО «АТГ Сервис Ген», Санкт-Петербург, Россия

Кудрявцев И.В. — к.б.н., заведующий лабораторией клеточной иммунологии отдела иммунологии ФГБНУ Институт экспериментальной медицины; доцент кафедры иммунологии ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Трулев А.С. — к.б.н., научный сотрудник отдела иммунологии ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

Authors:

Kopat V.V., Development Director, ATG Service Gene LLC, St. Petersburg, Russian Federation

Riabchenkova A.A., Research Associate, ATG Service Gene LLC, St. Petersburg, Russian Federation

Chirak E.L., Research Associate, ATG Service Gene LLC, St. Petersburg, Russian Federation

Chirak E.R., Research Associate, ATG Service Gene LLC, St. Petersburg, Russian Federation

Saenko A.I., Chief Process Engineer, ATG Service Gene LLC, St. Petersburg, Russian Federation

Kudryavtsev I.V., PhD (Biology), Head, Laboratory of Cellular Immunology, Department of Immunology, Institute of Experimental Medicine; Associate Professor, Department of Immunology, First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Trulioff A.S., PhD (Biology), Research Associate, Department of Immunology, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

Савин Т.В. — иммунолог ФБУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера»; научный сотрудник кафедры иммунологии ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Savin T.V., Immunologist, Saint Petersburg Pasteur Institute; Research Associate, Department of Immunology, First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Зуева Е.В. — к.б.н., старший научный сотрудник ФБУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера», Санкт-Петербург, Россия

Zueva E.V., PhD (Biology), Senior Research Associate, Saint Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation

Симбирцев А.С. — д.м.н., член-корр. РАН, профессор ФБУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера»; профессор кафедры иммунологии ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Simbirtsev A.S., PhD, MD (Medicine), Corresponding Member, Russian Academy of Sciences, Professor, Saint Petersburg Pasteur Institute; Professor, Department of Immunology, First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Тотolian Арег А. — д.м.н., профессор, академик РАН, заведующий лабораторией молекулярной иммунологии, директор ФБУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера»; заведующий кафедрой иммунологии ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Totolian Areg A., PhD, MD (Medicine), Professor, Full Member, Russian Academy of Sciences, Head, Laboratory of Molecular Immunology, Director of Saint Petersburg Pasteur Institute; Head, Department of Immunology, First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Духовлинов И.В. — к.б.н., директор по науке ООО «АТГ Сервис Ген», Санкт-Петербург, Россия

Dukhovlinov I.V., PhD (Biology), Director of Research, ATG Service Gene LLC, St. Petersburg, Russian Federation

Поступила 26.12.2023
Принята к печати 20.02.2024

Received 26.12.2023
Accepted 20.02.2024

МИКРОРНК КАК МАРКЕРЫ ФИБРОЗИРОВАНИЯ У ПАЦИЕНТОВ С ГИПЕРЧУВСТВИТЕЛЬНЫМ ПНЕВМОНИТОМ

Шепелькова Г.С., Зайцева А.С., Евстифеев В.В., Адамовская Е.Н., Шмелев Е.И., Еремеев В.В.

ФГБНУ «Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза», Москва, Россия

Резюме. Гиперчувствительный пневмонит (ГП) представляет собой сложный интерстициальный синдром легких. Данная нозология характеризуется сенсибилизацией к специфическому антигену, ранняя идентификация которого связана с повышением вероятности благоприятного исхода. Рост уровня смертности при гиперчувствительном пневмоните связан с развитием фиброза легочной ткани. В то же время из-за недостаточной степени изученности механизмов, лежащих в основе развития данного типа фиброза, клинические вмешательства не позволяют добиться значительного улучшения прогноза течения заболевания. Применение надежных биомаркеров, объективно отражающих биологические процессы, происходящие в процессе фиброзирования легочной ткани, способно повысить вероятность принятия верных клинических решений. В настоящее время разнообразные биомаркеры стали играть решающую роль в диагностике и лечении широкого спектра заболеваний человека. К сожалению, гиперчувствительный пневмонит является исключением из этой общей тенденции. В данной области все еще есть большие возможности для исследований на пути поиска диагностических биомаркеров. Целью настоящего исследования стал поиск биомаркеров развития фиброза легочной ткани у пациентов с гиперчувствительным пневмонитом. В качестве таких диагностических маркеров мы использовали зрелые сывороточные микроРНК, потенциально способные регулировать процессы воспаления и фиброзообразования.

В исследование были включены пациенты с диагнозом гиперчувствительный пневмонит (с фиброзом и без фиброза в ткани легкого), а также здоровые лица без хронических заболеваний (группа контроля). У всех пробандов, вошедших в исследование, было получено письменное информированное согласие до момента включения в исследование. У всех пациентов проводилась оценка клинических и лабораторных показателей. Анализ профиля экспрессии генов зрелых сывороточных микроРНК проводили с использованием набора miScript miRNA PCR Array (QIAGEN). Верификацию полученных данных проводили методом полимеразной цепной реакции в реальном времени.

В результате проведенного нами исследования был определен набор зрелых микроРНК, вероятно, участвующих в процессах образования фиброза и развития воспаления в легких (miR-22, miR-150 и miR-106b). После проведения расширенного исследования, включающего наблюдение за развитием заболевания в динамике, данный набор может быть использован в клинической практике для определения активности заболевания и развития процессов формирования фиброза в тканях легкого у пациентов с различными вариантами течения гиперчувствительного пневмонита.

Ключевые слова: интерстициальные болезни легких, гиперчувствительный пневмонит, фиброз, микроРНК, диагностический маркер, воспаление

Адрес для переписки:

Шепелькова Галина Сергеевна
ФГБНУ «Центральный научно-исследовательский
институт туберкулеза»
107564, Россия, Москва, Яузская аллея, 2.
Тел.: 8 (499) 785-90-35.
Факс: 8 (499) 785-91-08.
E-mail: shepelkovag@yahoo.com

Address for correspondence:

Galina S. Shepelkova
Central Tuberculosis Research Institute
2 Yauza Alley
Moscow
107564 Russian Federation
Phone: +7 (499) 785-90-35.
Fax: +7 (499) 785-91-08.
E-mail: shepelkovag@yahoo.com

Образец цитирования:

Г.С. Шепелькова, А.С. Зайцева, В.В. Евстифеев,
Е.Н. Адамовская, Е.И. Шмелев, В.В. Еремеев
«МикроРНК как маркеры фиброзирования у пациентов
с гиперчувствительным пневмонитом» // Медицинская
иммунология, 2024. Т. 26, № 3. С. 607-612.
doi: 10.15789/1563-0625-MAF-2913

© Шепелькова Г.С. и соавт., 2024

Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

G.S. Shepelkova, A.S. Zaytseva, V.V. Evstifeev,
E.N. Adamovskaya, E.I. Shmelev, V.V. Yermeev "MicroRNAs
as fibrosis markers in patients with hypersensitivity
pneumonitis", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya
Immunologiya, 2024, Vol. 26, no. 3, pp. 607-612.
doi: 10.15789/1563-0625-MAF-2913

© Shepelkova G.S. et al., 2024

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

DOI: 10.15789/1563-0625-MAF-2913

MICRORNAs AS FIBROSIS MARKERS IN PATIENTS WITH HYPERSENSITIVITY PNEUMONITIS

Shepelkova G.S., Zaytseva A.S., Evstifeev V.V., Adamovskaya E.N., Shmelev E.I., Yeremeev V.V.

Central Tuberculosis Research Institute, Moscow, Russian Federation

Abstract. Hypersensitivity pneumonitis (HP) is a complex interstitial pulmonary syndrome. This clinical entity is characterized by sensitization to a specific antigen. Early detection of this antigen is associated with an increased likelihood of a favorable outcome. Increased mortality in hypersensitivity pneumonitis is associated with the development of lung fibrosis. At the same time, clinical interventions do not significantly improve the prognosis of the disease due to a lack of understanding the mechanisms underlying the development of this type of fibrosis. Using reliable biomarkers that objectively reflect biological processes in lung fibrosis may improve clinical decisionmaking. Various biomarkers are now beginning to play a critical role in diagnosing and treating a variety of human diseases. Unfortunately, hypersensitivity pneumonitis is an exception to this general trend. There is still a great deal of research to be done in this area in the search for diagnostic biomarkers. The aim of this study was to identify biomarkers of lung fibrosis development in patients with hypersensitivity pneumonitis. We used mature serum microRNAs, which may regulate inflammation and fibrosis, as such diagnostic markers.

Patients with a diagnosis of hypersensitivity pneumonitis (with and without lung fibrosis) as well as healthy individuals without chronic diseases (control group) were included into the study. Clinical and laboratory parameters were assessed in all patients. The miScript miRNA PCR Array Kit (QIAGEN) was used for gene expression profiling of mature serum miRNAs. The data obtained were verified using real-time PCR.

Our research has identified a number of mature microRNAs that are likely to be involved in lung fibrosis and inflammation (miR-22, miR-150 and miR-106b). Following an extended study, including monitoring of disease progression over time, the applied diagnostic kit may be used in clinical practice to determine disease activity and development of fibrosis formation in lung tissue in patients with different variants of hypersensitivity pneumonitis.

Keywords: interstitial lung diseases, hypersensitivity pneumonitis, fibrosis, miRNA, diagnostic marker, inflammation

Работа выполнена в рамках темы НИР FURE-2022-010.

Введение

К интерстициальным болезням легких (ИБЛ) относят неинфекционные заболевания, характеризующиеся развитием диффузного воспаления и фиброза легких. В группу ИБЛ входят интерстициальные пневмонии, идиопатические и ассоциированные с системными заболеваниями соединительной ткани, гиперчувствительный пневмонит (ГП) и саркоидоз. ГП расположен на третьем месте по частоте встречаемости. ГП представляет собой сложный интерстициальный синдром легких, связанный со значительной летальностью, особенно при фиброзной болезни. Это воспалительное и/или фиброзирующее заболевание легких, вызванное повторными и длительными контактами восприимчивых людей с органическими и низкомолекулярными неорганическими частицами [11, 12]. Распространенность заболевания варьируется в зависимости от географических, сезонных и климатических факторов. Данная нозология встречается у пациентов любого возраста, включая детей [2]. В сравнении с интерстициальным легочным фиброзом для пациентов с ГП характерен более благопри-

ятный прогноз течения заболевания. Однако в случае развития легочного фиброза у пациентов с данной нозологией продолжительность и качество жизни значительно снижаются. Так, для пациентов с фиброзирующим ГП характерна более низкая жизненная емкость легких, а также диффузионная способность и процент лимфоцитов в ЖБАЛ, чем для пациентов с безфиброзным вариантом [8, 14]. Несмотря на большое количество исследований, посвященных развитию и течению ГП, до сих пор нет четкого понимания того, почему некоторые пациенты выздоравливают, а у других прогрессирует фиброз, даже без дальнейшего воздействия антигена. В настоящее время многочисленные исследования направлены на выявление возможных маркеров развития легочного фиброза у таких пациентов. Раннее выявление маркеров фиброза позволит своевременно начать антифибротическую терапию, что может способствовать увеличению продолжительности жизни и улучшению качества жизни пациентов.

МикроРНК — небольшие молекулы некодирующей РНК, регулирующие широкий спектр биологических процессов, в том числе и дифференцировку, клеточный рост, иммунный ответ и воспаление [6, 9]. Показано, что отдельные микроРНК играют роль в индукции иммунной защиты и поддержании иммунного гомеостаза. На-

капливаются данные, свидетельствующие о том, что микроРНК способны регулировать клеточные процессы при различных патологиях легких [5, 13].

В нашем исследовании изучалась возможность использования полуколичественного определения содержания ряда микроРНК в сыворотке крови больных ГП для характеристики степени развития фиброза легких.

Материалы и методы

Пациенты

В исследование было включено 50 мужчин и женщин в возрасте от 35 до 65 лет. 30 человек с диагнозом «ГП», находившихся на лечении в ФГБНУ «ЦНИИТ» в период с 2017 по 2022 г. 20 человек — здоровые лица без хронических заболеваний. Постановка диагноза «ГП» проводилась на основании клинко-рентгенологических критериев в соответствии с международными рекомендациями ERS/ATS/JRS/ALAT [10] и White Paper общества Fleischner 2020 г. [4]. Изменения в легких оценивались по КТ ОГК. У всех пробандов, вошедших в исследование, было получено письменное информированное согласие до момента включения в исследование. Основываясь на данных КТ ОГК, пациенты были поделены на группы: (1) — 19 пациентов с признаками фиброза. Длительность заболевания $5,9 \pm 1,4$ года (от 5 до 10 лет); (2) — 11 пациентов без признаков фиброза. Длительность заболевания $1,3 \pm 0,5$ лет (от 2 месяцев до 1,5 лет); (3) — 20 человек (здоровые лица).

Все пациенты с ГП, включенные в исследование, получали терапию низкими дозами системных ГКС, средняя продолжительность лечения составила $3,8 \pm 1,2$ года. Критериями включения в исследование являлось наличие у пациента ГП; критериями исключения — наличие активного инфекционного заболевания, наличие хронического заболевания в стадии декомпенсации, а также тяжелая инфекция COVID-19 в анамнезе. У всех испытуемых на момент начала исследования получали 5 мл цельной венозной крови. Кровь центрифугировали при 1500 g в течение 15 мин при 4 °C. Полученные сыворотки крови хранили при -80 °C до момента использования.

Выделение суммарной РНК сыворотки крови у пациентов с диагнозом «ГП» и здоровых лиц проводили по ранее описанному протоколу [13]. Вкратце, к каждому образцу сыворотки крови перед выделением РНК добавляли miRNeasy Serum/Plasma Spike-in Control (миметик микроРНК *C. elegans* miR-39) (QI-AGEN GmbH, Hilden, Германия) для мониторинга очистки и амплификации микроРНК. Экстракцию суммарной РНК из образцов сыворотки крови проводили с использованием TRIzol LS (Thermo Fisher Scientific (Invitrogen), Уолтем, Массачусетс, США) в соответствии с инструкциями производителя. Впоследствии полученные образцы РНК использо-

вали для постановки аррея miScript miRNA PCR Arrays (QI-AGEN GmbH, Hilden, Германия) и ПЦР в реальном времени (qRT-PCR).

Определение профиля экспрессии зрелых сывороточных микроРНК проводили с использованием набора miScript miRNA PCR Arrays (QIAGEN GmbH, Хиден, Германия) [13]. Для постановки исследования препараты РНК были скомбинированы в 6 пулов — 2 пула больных ГП с фиброзом, 2 пула больных ГП без фиброза и 2 пула здоровых доноров. Для комбинирования использовали равные объемы суммарной РНК. Каждый пул содержал по 6 образцов РНК.

Обратную транскрипцию проводили с помощью набора miScript II RT Kit (QIAGEN, Массачусетс, США) в соответствии с инструкциями производителя. Полученную кДНК использовали для постановки аррея. Данные аррея анализировали при помощи специального пакета программ GeneGlobe (QIAGEN, Массачусетс, США)

ПЦР в реальном времени

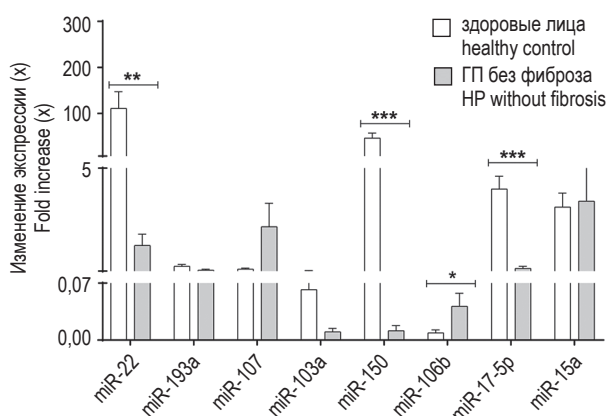
кДНК получали с помощью набора TaqMan® Advanced miRNA cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific (Applied Biosystems), Массачусетс, США). Синтезированные кДНК в дальнейшем использовали в качестве матриц в реакциях qRT-PCR. TaqMan miRNA Assays (Thermo Fisher Scientific (Applied Biosystems), Массачусетс, США) использовали для анализа экспрессии miR-22, miR-193a, miR-107, miR-103a, miR-106b, miR-17, miR-150, miR-15a в соответствии с рекомендациями производителя. miR-186 была выбрана в качестве референса для анализа и нормирования полученных данных в соответствии с рекомендациями TaqMan® Advanced miRNA Assays User Guide (Thermo Fisher Scientific (Applied Biosystems), Массачусетс, США).

Статистическая обработка результатов. В качестве статистического инструмента для анализа данных экспрессии микроРНК использовали GraphPad Prism версии 7.0. Дисперсионный анализ (ANOVA) с множественным сравнением применялся для сравнения кратности изменения между группами; достоверно значимыми считали значения при $p \leq 0,05$. Данные представлены в виде $M \pm SEM$, где M — число пробандов в группе.

Результаты и обсуждение

Пациентов с диагнозом «ГП», вошедших в исследование, делили на группы (с легочным фиброзом и без фиброза), основываясь на данных КТ ОГК. Так, для типичной картины ГП без фиброза было характерно: наличие интерстициальных изменений по типу «матового стекла», мозаичная плотность легочной ткани; плохо очерченные центрилобулярные очаги, воздушные ловушки; наличие диффузных изменений, менее выраженное в базальных сегментах.

А (А)



Б (Б)

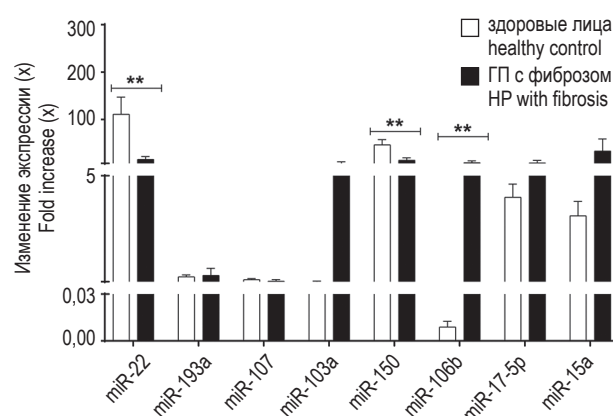


Рисунок 2. Экспрессия генов, кодирующих зрелые микроРНК, в сыворотке крови больных с диагнозом ГП и контрольной группы. ГП без фиброза по сравнению со здоровым контролем (А), ГП с фиброзом по сравнению со здоровым контролем (Б)

Примечание. Показаны средние значения \pm SEM. * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$.

Figure 2. Expression of genes encoding mature miRNAs in the serum of HP patients and control group. HP without fibrosis versus health control (A), HP with fibrosis versus health control (B)

Note. Mean \pm SEM are shown. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$.

Типичная картина фибротического ГП включала в себя характерные признаки ГП и признаки фиброза легочной ткани, такие как: ретикулярные изменения, нарушающие легочную архитектуру (нормальное расположение сосудов и видимых бронхов) и/или тракционные бронхоэктазы; сотовое легкое; хаотичное распределение фиброзных изменений (без отчетливого преобладания) или преобладание в средней легочной зоне (на уровне корней); повышенную воздушность нижних легочных зон.

Все пациенты, включенные в исследование, предъявляли жалобы на одышку при физической нагрузке. По шкале MRC у пациентов с фиброзом легочной ткани выраженность одышки составила $3,5 \pm 0,6$ балла, у пациентов без фиброза – $1,6 \pm 0,6$ балла.

У всех пациентов и здоровых лиц, вошедших в исследование, определяли профиль экспрессии зрелых сывороточных микроРНК. Сравнение профилей экспрессии зрелых сывороточных микроРНК у пациентов с диагнозом ГП (с фиброзом и без) проводили при помощи ПЦР аррея. Аррей данного типа позволяет определить уровень экспрессии 84 наиболее распространенных зрелых микроРНК сыворотки крови человека. Анализ показал различия в экспрессии микроРНК как в группах больных с диагнозом ГП в сравнении с контролем, так, соответственно, и между двумя группами пациентов с ГП (с фиброзом и без фиброза) (рис. 1, см. 3-ю стр. обложки).

В первую очередь обращает на себя внимание тенденция к снижению уровня экспрессии микроРНК в сыворотке крови больных с фибротической формой ГП сравнении с группой здоровых лиц (рис. 1Б), что может служить отражением воспалительных реакций, сопровождающих заболевание. Ослабление регулирующего влияния микроРНК способствует активизации продукции провоспалительных факторов и, как следствие, приводит к образованию фиброза.

Основываясь на результатах аррея, miR-22, miR-193a, miR-107, miR-103a, miR-106b, miR-17, miR-150, miR-15a были выбраны для дальнейшего исследования методом ПЦР в реальном времени. Верификация данных методом ПЦР в

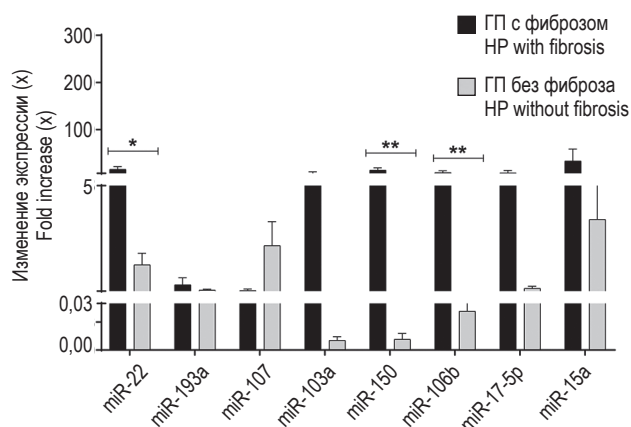


Рисунок 3. Экспрессия генов, кодирующих зрелые микроРНК, в сыворотке крови больных с диагнозом ГП (с фиброзом и без)

Примечание. Показаны средние значения \pm SEM. * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$.

Figure 3. Expression of genes encoding mature miRNAs in the serum of HP patients (with and without fibrosis)

Note. Mean \pm SEM are shown. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$.

реальном времени проводилась индивидуально у каждого пробанда, включенного в исследование.

Было показано, что для пациентов с диагнозом «ГП» без фиброза в сравнении со здоровым контролем характерно снижение экспрессии miR-22 ($p = 0,01$), miR-150 ($p = 0,001$), miR-17 ($p < 0,0001$) и увеличение экспрессии miR-106b ($p = 0,05$) (рис. 2А). Для пациентов с фибротическим ГП в сравнении с контролем характерно снижение экспрессии miR-22 ($p = 0,01$), miR-150 ($p = 0,01$) и увеличение экспрессии miR-106b ($p = 0,02$) (рис. 2Б).

Сравнение экспрессии микроРНК в группах пациентов с диагнозом ГП (с фиброзом и без фиброза) показало повышенный уровень экспрессии в группе пациентов с фиброзом для miR-22 ($p = 0,05$), miR-150 ($p = 0,03$) и miR-106b ($p = 0,01$) (рис. 3).

Анализ данных литературы позволяет предположить, что выявленные в нашем исследовании микроРНК вовлечены в процесс фиброобразования и развития воспаления. Так, miR-22 участвует в модуляции дифференцировки фибробла-

стов в миофибробласты [7]. miR-106b является прямой мишенью для длинной, некодирующей РНК, предотвращающей развитие фиброза. С другой стороны, miR-106b является модулятором передачи сигналов TGF/SMAD, т. е. участвует в непосредственной индукции фиброза [3]. Показано, что miR-150 участвует в эпителиально-мезенхимальном переходе, т. е. непосредственно в развитии фиброза [1].

Выводы

В результате проведенного нами исследования был определен набор из трех зрелых сывороточных miRs участвующих в фиброобразовании и свидетельствующих о развитии воспаления (miR-22, miR-150, miR-106b) в легочной ткани больных ГП. Включенные в данный набор микроРНК могут быть использованы в клинической практике в качестве диагностических маркеров активности заболевания и прогрессирования процесса фиброобразования в легочной ткани больных ГП.

Список литературы / References

1. Chen M.L., Fan L., Huang G., Sun Z. Knockdown of miR-150-5p reduces hypoxia-induced autophagy and epithelial-mesenchymal transition of endometriotic cells via regulating the PDCD4/NF- κ B signaling pathway. *Cytokine*, 2023, Vol. 162, 156086. doi: 10.1016/j.cyto.2022.156086.
2. Costabel U., Bonella F., Guzman J. Chronic hypersensitivity pneumonitis. *Clin. Chest Med.*, 2012, Vol. 33, pp. 151-163.
3. Gong L., Zhu L., Yang T. Fendrr involves in the pathogenesis of cardiac fibrosis via regulating miR-106b/SMAD3 axis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2020, Vol. 524, no. 1, pp. 169-177.
4. Hatabu H., Hunninghake G.M., Richeldi L., Brown K.K., Wells A.U., Remy-Jardin M., Verschakelen J., Nicholson A.G., Beasley M.B., Christiani D.C., Estépar R.S.J., Seo J.B., Johkoh T., Sverzellati N., Ryerson C.J., Barr R.G., Goo J.M., Austin J.H.M., Powell C.A., Lee K.S., Inoue Y., Lynch D.A. Interstitial lung abnormalities detected incidentally on CT: a Position Paper from the Fleischner Society. *Lancet Respir. Med.*, 2020, Vol. 8, no. 7, pp. 726-737.
5. Jiao P., Wang X.P., Luoreng Z.M., Yang J., Jia L., Ma Y., Wei D.W. miR-223: An effective regulator of immune cell differentiation and inflammation. *Int. J. Biol. Sci.*, 2021, Vol. 17, no. 9, pp. 2308-2322.
6. Krol J., Loedige I., Filipowicz W. The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. *Nat. Rev. Genet.*, 2010, Vol. 11, no. 9, pp. 597-610.
7. Kuse N., Kamio K., Azuma A., Matsuda K., Inomata M., Usuki J., Morinaga A., Tanaka T., Kashiwada T., Atsumi K., Hayashi H., Saito Y., Seike M., Gemma A. Exosome-derived microRNA-22 ameliorates pulmonary fibrosis by regulating fibroblast-to-myofibroblast differentiation *in vitro* and *in vivo*. *J. Nippon Med. Sch.*, 2020, Vol. 87, no. 3, pp. 118-128.
8. Pereira J.O., Fernandes V., Alfaro T.M., Freitas S., Cordeiro C.R. Diagnosis of fibrotic hypersensitivity pneumonitis: is there a role for biomarkers? *Life*, 2023, Vol. 13, 565. doi: 10.3390/life13020565.
9. Pillai R.S., Bhattacharyya S.N., Filipowicz W. Repression of protein synthesis by miRNAs: How many mechanisms? *Trends Cell. Biol.*, 2007, Vol. 17, pp. 118-126.
10. Raghu G., Remy-Jardin M., Ryerson C.J., Myers J.L., Kreuter M., Vasakova M., Bargagli E., Chung J.H., Collins B.F., Bendstrup E., Chami H.A., Chua A.T., Corte T.J., Dalphin J.-C., Danoff S.K., Diaz-Mendoza J., Duggal A., Egashira R., Ewing T., Gulati M., Inoue Y., Jenkins A.R., Johansson K.A., Johkoh T., Tamae-Kakazu M., Kitaichi M., Knight S.L., Koschel D., Lederer D.J., Mageto Y., Maier L.A., Matiz C., Morell F., Nicholson A.G., Patolia S., Pereira C.A., Renzoni E.A., Salisbury M.L., Selman M., Walsh S.L.F., Wuyts W.A., Wilson K.C. Diagnosis of hypersensitivity pneumonitis in adults. An official ATS/JRS/ALAT clinical practice guideline. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 2020, Vol. 202, no. 3, pp. e36-e69.

11. Riario Sforza G.G., Marinou A. Hypersensitivity pneumonitis: A complex lung disease. *Clin. Mol. Allergy*, 2017, Vol. 15, 6. doi: 10.1186/s12948-017-0062-7.
12. Selman M., Pardo A., Jr. King T.E., Hypersensitivity pneumonitis: Insights in diagnosis and pathobiology. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 2012, Vol. 186, no. 4, pp. 314-324.
13. Shepelkova G.S., Evstifeev V.V., Tarasov R.V., Ergeshova A.E., Bagirov M.A., Yeremeev V.V. MicroRNAs as Biomarkers of Active Pulmonary TB Course. *Microorganisms*, 2023, Vol. 11, no. 3, 626. doi: 10.3390/microorganisms11030626.
14. Varone F., Iovene B., Sgalla G., Calvello M., Calabrese A., Larici A.R., Richeldi L. Fibrotic Hypersensitivity Pneumonitis: Diagnosis and Management. *Lung*, 2020, Vol. 198, pp. 429-440.

Авторы:

Шепелькова Г.С. — к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории биотехнологии, отдел иммунологии ФГБНУ «Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза», Москва, Россия

Зайцева А.С. — к.м.н., старший научный сотрудник Центра диагностики и лечения микобактериозов легких ФГБНУ «Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза», Москва, Россия

Евстифеев В.В. — к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории биотехнологии, отдел иммунологии ФГБНУ «Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза», Москва, Россия

Адамовская Е.Н. — лаборант-исследователь Центра диагностики и лечения микобактериозов легких ФГБНУ «Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза», Москва, Россия

Шмелев Е.И. — д.м.н., профессор, главный научный сотрудник отдела дифференциальной диагностики туберкулеза и экстракорпоральных методов лечения ФГБНУ «Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза», Москва, Россия

Еремеев В.В. — д.м.н., главный научный сотрудник, заведующий отделом иммунологии ФГБНУ «Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза», Москва, Россия

Authors:

Shepelkova G.S., PhD (Biology), Senior Research Associate, Laboratory for Biotechnologies, Central Tuberculosis Research Institute, Moscow, Russian Federation

Zaytseva A.S., PhD (Medicine), Senior Research Associate, Center for Diagnosis and Treatment of Pulmonary Mycobacterioses, Central Tuberculosis Research Institute, Moscow, Russian Federation

Evstifeev V.V., PhD (Biology), Senior Research Associate, Laboratory for Biotechnologies, Central Tuberculosis Research Institute, Moscow, Russian Federation

Adamovskaya E.N., Research Assistant, Center for diagnosis and treatment of pulmonary mycobacteriosis Diagnosis and Treatment of Pulmonary Mycobacterioses, Central Tuberculosis Research Institute, Moscow, Russian Federation

Shmelev E.I., PhD, MD (Medicine), Professor, Chief Research Associate, Department of Differential Diagnostics of Tuberculosis and Extracorporeal Treatment, Diagnosis and Treatment of Pulmonary Mycobacterioses, Central Tuberculosis Research Institute, Moscow, Russian Federation

Eremeev V.V., PhD, MD (Medicine), Chief Research Associate, Department of Immunology, Diagnosis and Treatment of Pulmonary Mycobacterioses, Central Tuberculosis Research Institute, Moscow, Russian Federation

Поступила 26.09.2023
Принята к печати 08.10.2023

Received 26.09.2023
Accepted 08.10.2023

УРОВЕНЬ ЦИТОКИНОВ IL-6, IL-10, IL-18, TNF α В УСЛОВИЯХ ТАБАЧНОЙ ИНТОКСИКАЦИИ И ПОСЛЕ ВВЕДЕНИЯ АМИНОФТАЛГИДРАЗИДА

Альпидовская О.В.

ФГБОУ ВО «Чувашский государственный университет имени И.Н. Ульянова», г. Чебоксары, Чувашская Республика, Россия

Резюме. В ответ на повреждающие факторы высвобождается каскад цитокинов, запускающих процессы воспаления, фиброгенеза. Цель исследования — изучить уровень цитокинов — IL-6, IL-10, IL-18, TNF α в плазме крови в условиях табачной интоксикации и при внутримышечном введении аминифталгидразида.

В опыте использовано 40 беспородных белых крыс-самцов. Интактная группа (n = 10) — находилась в затравочной камере без табачного дыма. Опытные группы (1, 2, 3) — n = 30, по 10 животных в каждой группе. Первая и вторая группы животных находились в условиях табачного дыма один и два месяца. Третьей опытной группе внутримышечно вводили аминидигидрофталазиндион натрия в течение 3, 7, 14 дней. Содержание IL-6, IL-10, IL-18, TNF α в плазме крови определяли методом иммуноферментного анализа.

В 1-й группе уровень TNF α в плазме крови повысился до $452,14 \pm 176,18$ пг/мл (у интактных — $15,23 \pm 3,13$ пг/мл), во 2-й группе снизился показатель до 9,8, в 3-й группе — цифры резко увеличились до $167,44 \pm 5,93$ пг/мл. Уровень IL-6 был самым высоким после 4-месячной табачной интоксикации (3-я группа). Цитокин IL-10: в 1-й группе цифры увеличились в 1,2 раза, во 2-й отмечалось резкое снижение показателя в 13,7 раза, в 3-й группе — уменьшение содержания цитокина в плазме крови в 28,8 раза по сравнению с интактными животными. После введения аминидигидрофталазиндиона натрия в течение 3 и 7 дней содержание TNF α резко увеличилось в 14,8 раза и в 7,6 раза; через 14 дней применения препарата уровень TNF α уменьшился в 1,3 раза по сравнению с интактными животными. Отмечены колебания показателей провоспалительных цитокинов — IL-6 и IL-18. Уровень IL-10 в плазме крови имел статистически значимое повышение показателя в 5,3 раза через 3 дня после введения препарата; в 8,2 раза через 7 дней после применения аминидигидрофталазиндиона натрия и в 23 раза после 14 дней эксперимента (сравнение показателей с 3-й группой).

В условиях табачной интоксикации изменяется концентрация TNF α , IL-6, IL-10, IL-18. Иммунный ответ обусловлен повышением уровня провоспалительных цитокинов в плазме крови. В условиях коррекции аминидигидрофталазиндиона натрия происходит увеличение противовоспалительного цитокина — IL-10 при системном снижении содержания TNF α , IL-6, IL-18.

Ключевые слова: IL-6, IL-10, IL-18, TNF α , табачная интоксикация, аминифталгидразид

Адрес для переписки:

Альпидовская Ольга Васильевна
ФГБОУ ВО «Чувашский государственный университет
имени И.Н. Ульянова»
428015, Россия, Чувашская Республика, г. Чебоксары,
Московский пр., 45.
Тел.: 8 (927) 858-05-18
E-mail: olavorobeva@mail.ru

Address for correspondence:

Olga V. Alpidovskaya
I. Ulyanov Chuvash State University
45 Moskovskiy Ave
Cheboksary, Chuvash Republic
428015 Russian Federation
Phone: +7 (927) 858-05-18
E-mail: olavorobeva@mail.ru

Образец цитирования:

О.В. Альпидовская «Уровень цитокинов IL-6, IL-10, IL-18, TNF α в условиях табачной интоксикации и после введения аминифталгидразида» // Медицинская иммунология, 2024. Т. 26, № 3. С. 613-616.
doi: 10.15789/1563-0625-PLO-2907

© Альпидовская О.В., 2024

Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

O.V. Alpidovskaya "Plasma levels of IL-6, IL-10, IL-18, TNF α under the conditions of tobacco intoxication and after treatment with aminophthalhydrazide", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2024, Vol. 26, no. 3, pp. 613-616.
doi: 10.15789/1563-0625-PLO-2907

© Alpidovskaya O.V., 2024
The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License

DOI: 10.15789/1563-0625-PLO-2907

PLASMA LEVELS OF IL-6, IL-10, IL-18, TNF α UNDER THE CONDITIONS OF TOBACCO INTOXICATION AND AFTER TREATMENT WITH AMINOPHTHALHYDRAZIDE

Alpidovskaya O.V.

I. Ulyanov Chuvash State University, Cheboksary, Chuvash Republic, Russian Federation

Abstract. In response to damaging factors, a cascade of cytokines is released, triggering the processes of inflammation and fibrogenesis. The purpose of our study was to evaluate the levels of cytokines (IL-6, IL-10, IL-18, TNF α) in blood plasma under conditions of tobacco intoxication and with intramuscular administration of aminophthalhydrazide.

The experiment was performed with 40 outbred white male rats. Intact group (n = 10) were in a priming chamber in absence of tobacco smoke. Experimental groups (1, 2, and 3) – n = 30, 10 animals in each group. The first and second groups of animals were exposed to tobacco smoke for one and two months. The third experimental group underwent intramuscular injections with sodium aminodihydrophthalazindione for 3, 7, 14 days. The content of IL-6, IL-10, IL-18, TNF α in blood plasma was determined by enzyme immunoassay technique.

In 1st group, the TNF α level in blood plasma increased to 452.14 \pm 176.18 pg/mL (in intact animals, 15.23 \pm 3.13 pg/mL); in the 2nd group, this index decreased to 9.8; in group 3, these values showed a sharp increase (to 167.44 \pm 5.93 pg/mL). The level of IL-6 showed maximal values after 4 months of tobacco intoxication (group 3). The following IL-10 changes were observed: in the 1st group, its amounts increased by 1.2-fold; in the 2nd group a sharp decrease in the index was noted (13.7 times); in the 3rd group a decreased content of the cytokine was found (28.8 times) as compared with intact animals. After administration of aminodihydrophthalazindione for 3 and 7 days, the content of TNF α showed sharp increase (14.8 times and 7.6 times, respectively); after 14 days of treatment, the level of TNF α decreased by 1.3 times compared to intact animals. We noted fluctuations in the levels of pro-inflammatory cytokines (IL-6 and IL-18). The level of IL-10 in blood plasma had a statistically significant increase (5.3-fold at 3 days after drug administration); 8.2-fold 7 days after administration of the drug, and 23-fold after 14 days of treatment, as compared with the 3rd group.

The plasma concentrations of TNF α , IL-6, IL-10, IL-18 showed sufficient changes under the conditions of tobacco intoxication. The immune response is characterized by increased levels of pro-inflammatory cytokines in blood plasma. Upon corrective therapy with sodium aminodihydrophthalazindione, an increase in the anti-inflammatory IL-10 cytokine occurs, along with systemic decrease in the TNF α , IL-6, and IL-18 contents.

Keywords: IL-6, IL-10, IL-18, TNF α , tobacco intoxication, aminophthalhydrazide

Введение

Прогрессирующие повреждения печени и формирование фиброза неразрывно связано с иммунными механизмами и хроническим воспалением, включая активацию Т-лимфоцитов, моноцитов/макрофагов [1, 2, 3, 4, 5]. В ряде работ было доказано, что нарушение структуры печени при вирусных и токсических поражениях зачастую связаны с изменением концентрации цитокинов [6, 7, 8]. Известно, что провоспалительный цитокин – IL-6 является медиатором острого воспаления, активирует белки острой фазы, клетки иммунной системы и макрофаги, способствуя пролиферации клеток печени и фиброзу [3]. TNF α – синтезируется моноцитами и макрофагами, стимулирует продукцию IL-1, IL-6, IL-8. Цитокин IL-10 является противовоспалительным, образуется в моноцитах и макрофагах, в меньшей степени – в лимфоцитах.

Особая функция этого белка заключается в предотвращении чрезмерной воспалительной реакции, которая имеет патологический эффект, так как при избыточном воспалении происходит повреждение здоровых клеток. **Цель исследования** – оценить уровень цитокинов – IL-6, IL-10, IL-18, TNF α в условиях табачной интоксикации и при внутримышечном введении аминоталгидразида в течение 3, 7 и 14 суток.

Материалы и методы

В опыте использовано 50 беспородных белых крыс-самцов, которых разделили на следующие группы: интактная (n = 10) – находились в затравочной камере без табачного дыма. Опытные группы (1, 2, 3) (n = 30, по 10 животных в каждой группе) – находились в табачном дыме на протяжении – 1, 2, 4 месяцев (два раза в день). Для опытов применялась камера – V = 0,3 м³, в

которой происходило задымление при сгорании сигарет. Третьей опытной группе (животные находились в затравочной камере 4 месяца) вводили внутримышечно аминодигидрофталазиндион натрия в течение 3, 7, 14 дней.

Содержание IL-6, IL-10, IL-18, TNF α в плазме крови опытных животных определяли методом иммуноферментного анализа с помощью прибора Lazurite Automated Elisa System (Dy nex Technologies Inc., США) согласно инструкции производителя.

Этическая экспертиза

Эксперименты основывали на принципах гуманности, изложенных в Директиве Совета Европейского Союза (86/609/ЕЭС), а также в ГОСТ Р 53434-2009 от 1 марта 2010 г. «Принципы надлежащей лабораторной практики» (идентичен GLP OECD). Проведение эксперимента одобрено этическим комитетом Марийского государственного университета (протокол № 1 от 28.04.2023 г.).

Статистическая обработка проводилась в программе Statistica 10 (StatSoft Inc., США). Результаты оценивались непараметрическим методом Манна–Уитни.

Результаты и обсуждение

В условиях табачной интоксикации отмечалось изменение цитокинового профиля: у опыт-

ных животных происходило повышение концентрации TNF α в плазме крови в 1-ой группе показатель составил — 452,14 \pm 176,18 пг/мл (у интактных — 15,23 \pm 3,13 пг/мл), во 2-й группы — снизился показатель до 9,8, в 3-й группе — резко цифры увеличились до 167,44 \pm 5,93 пг/мл. Уровень IL-6 был самым высоким после 4-месячной табачной интоксикации (3-я группа) [6], гистологически в печени определялись признаки фиброза II–III. Противовоспалительный цитокин IL-10 имел значимые изменения: в 1-й группе цифры увеличились в 1,2 раза, во 2-й отмечалось резкое снижение показателя в 13,7 раза, в 3-й группе — дальнейшее уменьшение содержания цитокина в плазме крови в 28,8 раза по сравнению с интактными животными (табл. 1). Можно отметить, что табачная интоксикация вызывает статистически значимое уменьшение IL-10 в плазме крови через 2 и 4 месяца эксперимента в сравнении с показателями интактной группы. Наименьшие изменения коснулись IL-18 (табл. 1).

После введения аминодигидрофталазиндиона натрия в течение 3 и 7 дней содержание цитокинов статистически значимо изменилось: TNF α резко увеличился в 14,8 раза и в 7,6 раза соответственно; через 14 дней применения препарата уровень TNF α уменьшился в 1,3 раза по сравнению с интактными животными. Отмечены колебания показателей провоспалительных цитокинов — IL-6 и IL-18 (табл. 1). Уровень IL-10 в

ТАБЛИЦА 1. УРОВЕНЬ ЦИТОКИНОВ В ПЛАЗМЕ КРОВИ ОПЫТНЫХ ЖИВОТНЫХ

TABLE 1. LEVEL OF CYTOKINES IN THE BLOOD PLASMA OF EXPERIMENTAL ANIMALS

Опытные животные Experienced animals	TNF α , пг/мл TNF α , pg/mL	IL-6, пг/мл IL-6, pg/mL	IL-10, пг/мл IL-10, pg/mL	IL-18, пг/мл IL-18, pg/mL
Интактная группа Intact group	15,23 \pm 3,13	38,07 \pm 6,71	3489,04 \pm 146,09	5,89 \pm 1,63
1-я группа / 1st group	452,14 \pm 176,18*	56,33 \pm 15,73*	4531,32 \pm 122,15*	7,65 \pm 0,21*
2-я группа / 2nd group	9,80 \pm 1,15*	47,88 \pm 7,84*	254,87 \pm 9,79*	8,89 \pm 0,76*
3-я группа / 3rd group	167,44 \pm 5,93*	96,18 \pm 3,57*	121,11 \pm 38,22*	6,98 \pm 0,52*
Введение аминодигидрофталазиндиона натрия в течение 3 дней Administration of aminodihydrophthalazinedione sodium for 3 days	224,80 \pm 24,78*	58,22 \pm 2,31*	652,13 \pm 321,21*	6,13 \pm 0,44*
Введение аминодигидрофталазиндиона натрия в течение 7 дней Administration of aminodihydrophthalazinedione sodium for 7 days	113,22 \pm 10,67*	102,32 \pm 7,23*	987,22 \pm 98,12*	9,34 \pm 2,76*
Введение аминодигидрофталазиндиона натрия в течение 14 дней Administration of aminodihydrophthalazinedione sodium for 14 days	11,35 \pm 0,33*	134,45 \pm 5,71*	2786,70 \pm 36,15*	6,97 \pm 1,89*

Примечание. * — статистически значимые различия с интактной группой (p < 0,05).

Note. *, statistically significant differences with the intact group (p < 0.05).

плазме крови имел статистически значимое повышение показателя в 5,3 раза через 3 дня после введения препарата; в 8,2 раза через 7 дней после применения аминодигидрофалазиндиона натрия и в 23 раза после 14 дней эксперимента (сравнение показателей с 3-й группой).

Исходя из полученных данных можно отметить, что в ответ на табачную интоксикацию происходило повышение в плазме крови уровня провоспалительных цитокинов: TNF α , IL-6 и IL-18 при одновременном снижении противовоспалительного — IL-10. Значимо повысился цитокин — TNF α . Известно, что избыточный уровень TNF α после 90% гепатэктомии приводил к нарушению микроциркуляции в ткани печени и угнетал регенераторный потенциал [4, 5]. TNF α способствует также гиперпродукции провоспалительных цитокинов (IL-1, IL-6, IL-18), усиливающие некроз гепатоцитов, апоптоз и фиброгенез [10, 11]. Одновременное повышение содержания провоспалительных цитокинов TNF α и IL-6, очевидно, свидетельствует о сопряженности прогрессии фиброза с активацией гуморального звена иммунной системы [6, 7, 8]. Высокий уровень TNF α и IL-18

при хронических заболеваниях способствует полиорганной недостаточности, стимулируя продукцию активных форм кислорода и оксида азота, которые повреждают клетки органов. Высокое содержание IL-18 в плазме крови усиливает провоспалительный иммунный ответ, повышая выработку TNF α и IL-1 α .

После введения аминодигидрофалазиндиона натрия произошли значимые изменения: понизилось содержание — TNF α , IL-6 и IL-18, а уровень IL-10 статистически значимо повысился.

Заключение

Таким образом, выявлено, что в условиях табачной интоксикации отмечаются нарушения в цитокиновом профиле — изменяется концентрация следующих цитокинов: TNF α , IL-6, IL-10, IL-18. Иммунный ответ обусловлен повышением уровня провоспалительных цитокинов в плазме крови. В условиях коррекции аминодигидрофалазиндиона натрия происходит увеличение противовоспалительного цитокина — IL-10 при системном снижении содержания TNF α , IL-6, IL-18.

Список литературы / References

1. Булатова И.А., Щёкотова А.П., Третьякова Ю.И., Насибуллина Н.И., Суздальцева К.Н., Падучева С.В. Взаимосвязь цитокинового статуса с тяжестью поражения печени и кишечника // Новости «Вектор-Бест», 2014. № 2 (72). С. 8-13. [Bulatova I.A., Shchekotova A.P., Tretyakova Yu.I., Nasibullina N.I., Suzdaltseva K.N., Paducheva S.V. Correlation between cytokine status and the severity of liver and intestinal damage. *Novosti "Vector-Best" = News "Vector-Best"*, 2014, no. 2 (72), pp. 8-13. (In Russ.)]
2. Каплина Н.А., Жукова Е.А., Романова С.В., Маянская И.В. Изменения клинических показателей и цитокинового статуса у детей с хроническими вирусными гепатитами В и С на фоне противовирусной терапии // Цитокины и воспаление, 2011. Т. 10, № 3. С. 130-134. [Kaplina N.A., Zhukova E.A., Romanova S.V., Mayanskaya I.V. Changes in clinical parameters and cytokine status in children with chronic viral hepatitis B and C during antiviral therapy. *Tsitokiny i vospaleniye = Cytokines and Inflammation*, 2011, Vol. 10, no. 3, pp. 130-134. (In Russ.)]
3. Малышев И.И., Воробьева О.В., Романова Л.П. Влияние пассивного курения на структуру гепатоцитов и состояние микроциркуляторного русла в печени крыс // Морфология, 2022. Т. 160, № 1. С. 57-63. [Malyshev I.I., Vorobeva O.V., Romanova L.P. The effect of passive smoking on the structure of hepatocytes and the state of the microcirculatory bed in the liver in rats. *Morfologiya = Morphology*, 2022, Vol. 160, no. 1, pp. 57-63. (In Russ.)]
4. Симбирцев А.У. Цитокины – новая система, регулирующая защитные реакции организма // Цитокины и воспаление, 2002. № 1. С. 9-16. [Simbirtsev A.U. Cytokines – a new system that regulates the body's defense reactions. *Tsitokiny i vospaleniye = Cytokines and Inflammation*, 2002, no. 1, pp. 9-16. (In Russ.)]
5. Finotto H., Siebler J., Hausding M. Severe hepatic injury in interleukin 18 (IL-18) transgenic mice: a key role for IL-18 in regulating hepatocyte apoptosis *in vivo*. *Gut*, 2004, Vol. 53, no. 3, pp. 392-400.
6. Ilangumaran S., Moriggl R., Kalvakolanu D.V. Editorial: Cytokines in liver diseases. *Cytokine*, 2019, Vol. 124, 154608. doi: 10.1016/j.cyt.2018.12.001.
7. Neuman MG. Cytokines and inflamed liver. *Clin. Biochem.*, 1999, no. 33, pp. 601-605.
8. Tsutsumi R., Kamohara Y., Eguchi S. Selective suppression of initial cytokine response facilitates liver regeneration after extensive hepatectomy in rats. *Hepatogastroenterology*, 2004, Vol. 51, pp. 701-704.

Автор:

Альпидовская О.В. — к.м.н., доцент кафедры общей и клинической морфологии и судебной медицины ФГБОУ ВО «Чувашский государственный университет имени И.Н. Ульянова», г. Чебоксары, Чувашская Республика, Россия

Author:

Alpidovskaya O.V., PhD (Medicine), Associate Professor, Department of General and Clinical Morphology and Forensic Medicine, I. Ulyanov Chuvash State University, Cheboksary, Chuvash Republic, Russian Federation

Поступила 25.08.2023

Отправлена на доработку 03.10.2023

Принята к печати 29.11.2023

Received 25.08.2023

Revision received 03.10.2023

Accepted 29.11.2023

ОСОБЕННОСТИ ЛЕЙКОЦИТАРНОГО ПУЛА КОНЦЕНТРАТА КЛЕТОК ПУПОВИННОЙ КРОВИ, ЗАГОТОВЛЕННОГО ДЛЯ ДОЛГОСРОЧНОГО КРИОХРАНЕНИЯ

Тюмина О.В.^{1, 2}, Овчинников П.А.¹, Трусова Л.М.¹, Тюмин И.В.^{1, 3},
Давыдкин И.Л.²

¹ ГБУЗ «Самарский областной медицинский центр «Династия», г. Самара, Россия

² ФГБОУ ВО «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Самара, Россия

³ Медицинский радиологический научный центр имени А.Ф. Цыба — филиал ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Министерства здравоохранения РФ, г. Обнинск, Россия

Резюме. Аллогенная трансплантация гемопоэтических клеток входит в стандарт лечения пациентов с острым лейкозом высокого риска. Пуповинная кровь (ПК) является альтернативным источником аллогенных стволовых гемопоэтических клеток для пациентов, которые нуждаются в трансплантации, но не имеют родственного донора. Цель исследования: изучение особенностей лейкоцитарного пула (клеточного состава, иммунофенотипа) концентрата клеток пуповинной крови (ПК), которые заготавливаются для публичного долгосрочного криохраниения для нужд трансплантологии. Проведено исследование 1096 образцов пуповинной крови доношенных новорожденных до и после процессинга (выделения концентрата гемопоэтических стволовых клеток (ГСК)). Показано, что при использовании критерия обработки образцов ПК с количеством лейкоцитов не менее 15×10^8 лейкоцитов в пересчете на объем заготовленного образца ПК до обработки с антикоагулянтом среднее количество клеток в концентрате ГСК ПК объемом 25 мл, находящегося на долгосрочном криохраниении составляет: лейкоцитов — $17,41 \pm 0,36 \times 10^8$, ГСК с иммунофенотипом (CD34⁺) — $5,25 \pm 3,6 \times 10^6$, натуральных киллерных клеток (CD3⁺CD16⁺CD56⁺) — $1,65 \pm 0,7 \times 10^8$. Изучена субпопуляционная структура НК-лимфоцитов в концентрате ГСК ПК: иммунофенотип CD56^{dim}CD16^{dim} клеток встречался в большинстве случаев — $45,15 \pm 18,1\%$, а минорные субпопуляции CD56^{dim}CD16^{bright}, CD56⁺CD16⁺, CD56^{bright}CD16 составили $0,27 \pm 0,2$, $1,33 \pm 0,7$ и $0,99 \pm 0,4\%$ соответственно. При анализе популяции NKT-клеток было выявлено $6,22 \pm 2,1\%$ клеток с иммунофенотипом CD3⁺CD16/CD56⁺, количество CD3⁺CD56⁺ клеток составило $3,69 \pm 2,4\%$, количество CD3⁺CD16⁺ — $2,53 \pm 1,2\%$. В пуле NKT-клеток выявлены $5,15 \pm 2,1\%$ CD56⁺CD16⁺ клеток, также определены две минорные субпопуляции, которые отличаются по экспрессии антигенов CD56 и CD16: уровень CD56⁺CD16⁺ составил $2,91 \pm 1,2\%$, а CD56⁺CD16⁺ оказалось равным $0,69 \pm 0,3\%$. Полученные данные о количестве и характеристике иммунофенотипа клеток, также гетерогенности популяции НК- и NKT-лимфоцитов в концентрате ГСК ПК, заложенных

Адрес для переписки:

Тюмина Ольга Владимировна
ГБУЗ «Самарский областной медицинский центр
«Династия»
443095, Россия, г. Самара, ул. Ташкентская, 159.
Тел.: 8 (902) 291-27-88.
E-mail: centr123@bk.ru

Address for correspondence:

Olga V. Tyumina
Samara Regional Dynasty Medical Center
159 Tashkentskaya St
Samara
443095 Russian Federation
Phone: +7 (902) 291-27-88.
E-mail: centr123@bk.ru

Образец цитирования:

О.В. Тюмина, П.А. Овчинников, Л.М. Трусова,
И.В. Тюмин, И.Л. Давыдкин «Особенности
лейкоцитарного пула концентрата клеток пуповинной
крови, заготовленного для долгосрочного криохраниения»
// Медицинская иммунология, 2024. Т. 26, № 3.
С. 617-624. doi: 10.15789/1563-0625-FOT-2900

© Тюмина О.В. и соавт., 2024

Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

O.V. Tyumina, P.A. Ovchinnikov, L.M. Trusova, I.V. Tyumin,
I.L. Davydkin "Features of the leukocyte pool of umbilical cell
blood cell concentrate prepared for long-term cryostorage",
Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya,
2024, Vol. 26, no. 3, pp. 617-624.
doi: 10.15789/1563-0625-FOT-2900

© Tyumina O.V. et al., 2024

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

DOI: 10.15789/1563-0625-FOT-2900

на долгосрочное криохраниение, необходимо учитывать для подбора концентрата ГСК ПК с целью трансплантации при онкогематологических заболеваниях.

Ключевые слова: пуповинная кровь, стволовые гемопоэтические клетки, концентрат ГСК ПК, NK-лимфоциты, NKT-лимфоциты, субпопуляции лимфоцитов

FEATURES OF THE LEUKOCYTE POOL OF UMBILICAL CELL BLOOD CELL CONCENTRATE PREPARED FOR LONG-TERM CRYOSTORAGE

Tyumina O.V.^{a, b}, Ovchinnikov P.A.^a, Trusova L.M.^a, Tyumin I.V.^{a, c}, Davydkin I.L.^b

^a Samara Regional Dynasty Medical Center, Samara, Russian Federation

^b Samara State Medical University, Samara, Russian Federation

^c A. Tsyb Medical Radiological Research Center, Branch of National Medical Research Center of Radiology, Obninsk, Russian Federation

Abstract. Allogeneic hematopoietic cell transplantation is the standard of care for patients with high-risk acute leukemia. Cord blood (UCB) is an alternative source of allogeneic hematopoietic stem cells for patients who need transplantation but do not have a related donor. The purpose of our study was to evaluate the characteristics of leukocyte pool (cellular composition, immunophenotype) of umbilical cord blood (UCB) cell concentrates, which were harvested for public long-term cryostorage for the needs of transplantology. A study of 1096 samples of umbilical cord blood of full-term newborns before and after processing [isolation of hematopoietic stem cells (HSC) concentrate] was carried out. The number of cells in the pooled concentrate of HSC at a volume of 25 mL, after long-term cryostorage was as follows: leukocytes, $17.41 \pm 0.36 \times 10^8$; HSCs with CD34⁺ immunophenotype, $5.25 \pm 3.6 \times 10^6$; natural killer cells (CD3⁺CD16⁺CD56⁺), $1.65 \pm 0.7 \times 10^8$. Analysis of the NKT cell population revealed $6.22 \pm 2.1\%$ of cells with CD3⁺CD16/CD56⁺ immunophenotype. The contents of CD3⁺CD56⁺ cells was $2.69 \pm 2.4\%$, the relative amount of CD3⁺CD16⁺ was $2.53 \pm 1.2\%$. In the pooled NKT cell preparations, $5.15 \pm 2.1\%$ of CD56⁺CD16 cells were detected, and two minor subpopulations were also identified, which differ in CD56 and CD16 antigen expression: the level of CD56⁺CD16⁺ was $2.91 \pm 1.2\%$, and the ratio of CD56⁺CD16⁺ cells was $0.69 \pm 0.3\%$. The obtained data on relative amounts and characteristics of cellular immunophenotype as well as the heterogeneity of the NK and NKT cell population in the HSC UCB concentrate, subjected to long-term cryostorage must be taken into account when selecting the HSC UCB concentrates for the purpose of transplantation in oncohematological diseases.

Keywords: cord blood, hematopoietic stem cells, stem cell concentrate, NK, NK lymphocytes, NKT lymphocytes, lymphocyte subpopulations

Введение

Аллогенная трансплантация гемопоэтических стволовых клеток (алло-ГСК) — терапия, направленная на излечение пациентов с лейкемией, рефрактерной ко всем другим видам стандартной химиотерапии. Эффективность Алло-ГСК обеспечивается за счет двух причин: использования высоких дозы химиотерапии и эффекта аллогенной реакции «трансплантат против лейкемии», которая опосредована донорскими лимфоцитами. Только около одной трети всех пациентов, которым требуется алло-ГСК, будут иметь подходящего родственного донора. Пуповинная кровь

(ПК) является альтернативным источником гемопоэтических стволовых клеток. Преимущества ПК включают быструю доступность и менее строгие требования соответствия подбора по системе лейкоцитарных антигенов, что приводит к подбору единиц ПК для большинства пациентов, кроме того преимуществом ПК является низкий риск передачи инфекции от донора к реципиенту [7, 9].

Рецидив лейкоза остается значительным препятствием для успеха алло-ГСК. Единица ПК содержит как минимум в 10-100 раз меньше лимфоцитов, чем трансплантат стволовых клеток костного мозга или периферической крови.

Учитывая данное обстоятельство были опасения относительно способности клеток ПК вызывать аллогенную реакцию «трансплантат против лейкемии». Однако частота рецидивов лейкемии после трансплантации единиц ПК аналогична другим источникам клеток [13, 15]. Учитывая, что реакция «трансплантат против лейкемии», возникает рано после алло-ГСК и что естественные клетки-киллеры (NK) характеризуются способностью быстро восстанавливаться [8], такие клетки могут играть важную роль в этой реакции после трансплантации алло-ГСК ПК.

Цель исследования — представить характеристику лейкоцитарного пула, включая иммунофенотип концентрата клеток пуповинной крови, заготавливаемых в государственном банке ПК для целей трансплантаций, чтобы понять их сильные и слабые стороны при их применении в клинической медицине.

Материалы и методы

Материалом для исследования служила пуповинная кровь 1096 доношенных новорожденных, которую заготавливали после подписания добровольного информированного согласия матери при физиологических родах с учетом отсутствия противопоказаний. Срок гестации, родившихся детей 37-41 недель (Me — 40,2 недели). В третьем периоде родов после рождения ребенка пережимали и пересекали пуповину, затем производили пункцию сосудов пуповины специальной системой для забора ПК, содержащей 35,5 мл антикоагулянта CPDA. Сбор крови осуществляли в течение 5-15 мин после родов, до отделения плаценты. Полученный материал доставляли в термоконтейнере при комнатной температуре и подвергали анализу не позднее 24 ч. после процедуры сбора.

В соответствии с приказом МЗ РФ от 25 июля 2003 г. № 325 «О развитии клеточных технологий», международным стандартом NETCORD и Российским стандартом РУСКОРД все образцы пуповинной крови, поступившие в лабораторию банка пуповинной крови ГБУЗ «МЦ Династия», прежде всего оценивались как источник ГСК, на его пригодность для трансплантации [2, 5]. Для этого производили: взвешивание образца, определение объема материала; определение группы крови и резус-фактора; определение клеточного состава, количества гемопоэтических стволовых клеток с иммунофенотипом CD34⁺; обследование на наличие гемотрансмиссивных инфекций (ВИЧ, HbsAg, вирусный гепатит С, сифилис, цитомегаловирус, герпес, токсоплазмоз); бактериологическое исследование крови на стерильность. В результате лабораторного скрининга отбирали для дальнейшей обработки образцы ПК с содер-

жанием лейкоцитов не менее 10×10^9 /л, объемом не менее 120 мл пуповинной крови с антикоагулянтом, а также образцы ПК с отрицательными результатами на гемотрансмиссивные инфекции, которым далее проводилось HLA-типирование средним разрешением по локусам A, B, C, DRB1, DQA1.

Затем каждый образец ПК подвергался процедуре процессинга: выделению концентрата лейкоцитов, содержащего в том числе гемопоэтические стволовые клетки, при этом для уменьшения общего объема крови и удаления эритроцитов использовался 10% гидроксипропилкрахмал и метод двойного центрифугирования.

В результате процедуры выделения концентрата ГСК первоначальный объем собранного образца ПК 120 ± 35 мл уменьшился до 25 мл, для криохранения использовались контейнеры Масо Biotec с магистральями портами, полимерными иглами и переходниками «Луер» для криоконсервирования, хранения и транспортировки стволовых клеток (арт. GSR0501AU) (Masopharma, Франция).

Далее образец ГСК ПК подвергался криоконсервации после добавления ДМСО к клеточной суспензии в финальной концентрации 10% и замораживании в автоматизированном комплексе Биоархив в течение 30 мин, снижение температуры проводилось средним на 1-3 °С в 1 мин и дальнейшего хранения концентрата ГСК ПК проводилось в парах жидкого азота.

Определение численности клеточных популяций до и после обработки образцов ПК проводилось на гематологическом анализаторе Mindray BC 5300 в режиме автоматической аспирации, определялось 26 параметров, включая распределение лейкоцитов по пяти параметрам: лимфоциты, моноциты, нейтрофилы, эозинофилы, моноциты.

Идентификация специфичных рецепторов, экспрессирующихся на поверхности лейкоцитарных и гемопоэтических стволовых клеток пуповинной крови, проводилась после процессинга пуповинной крови, то есть получения концентрата ГСК. Исследуемые образцы анализировались методом проточной цитометрии на цитофлуориметре BDFACS Canto™ II (США), реагенты Becton, Dickinson and Company (США), программное обеспечение — BD FACSDiva v. 9.0.1.

В ходе проточной цитофлуориметрии устанавливалось процентное содержание изучаемой популяции от числа всех лейкоцитов, гейтируемых на цитометре по экспрессии мембранных маркеров (CD — кластер дифференцировки) в реакции прямой иммунофлуоресценции с моноклональными антителами. При помощи па-

нели моноклональных антител было проведено определение уровня экспрессии поверхностных маркеров лимфоцитов CD34, CD45, CD3, CD4, CD8, CD19, CD14, CD16, CD56. Статистический анализ проводили с использованием программы Statistica 7.

Результаты и обсуждение

Всего было проанализировано 1096 образцов пуповинной крови. В таблице 1 представлены данные о клеточном составе образцов ПК до процессинга (выделения концентрата ГСК), с учетом корректировки на объем антикоагулянта. Дальнейшему процессингу подвергались только образцы ПК с высокой концентрацией лейкоцитов, не менее $10 \times 10^9/\text{л}$ или 15×10^8 в пересчете на объем заготовленного образца ПК до обработки с антикоагулянтом.

В результате проведения процедуры выделения ГСК в процессе седиментации эритроцитов под действием гидроксипропилоккрахмала происходит значимое повышение доли лимфоцитов с 31,9% до 35,6%, снижение доли эозинофилов и базофилов почти 2 раза с 5,0% до 2,9% и с 1,9% до 1,0% соответственно, при этом доля нейтрофилов не изменяется (47,2% и 47,0% после выделения концентрата ГСК) (табл. 2). Кроме того, происходит деплеция 85% эритроцитов, сохранение 91% лейкоцитов и 70% тромбоцитов в концентрате клеток после обработки.

Концентрация клеток в конечном криомешке, зависит от его объема, в таблице 3 приведены данные о клеточном составе концентрата ГСК пуповинной крови объемом 25 мл, заготовленного для долгосрочного криохранения.

В концентрате ГСК ПК объемом 25 мл выявлено среди всех лейкоцитов: нейтрофилов — 46,9% ($8,16 \pm 0,42 \times 10^8$), лимфоцитов 35,6% ($6,49 \pm 0,25 \times 10^8$), моноцитов — 13,4% ($2,34 \pm 0,14 \times 10^8$), эозинофилов — 2,8% ($0,48 \pm 0,03 \times 10^8$), базофилов — 1,08% ($0,18 \pm 0,02 \times 10^8$).

Иммунологическая характеристика лейкоцитов пуповинной крови оценивалась после обработки, выделения объемом 25 мл концентрата ГСК ПК, выявлено: Т-лимфоцитов — $3,8 \pm 0,13 \times 10^8$ (22,01%), В-лимфоцитов — $1,43 \pm 0,43 \times 10^8$ (8,21%), Т-лимфоцитов хелперов — $2,66 \pm 0,11 \times 10^8$ (15,33%), Т-цитотоксических лимфоцитов — $0,95 \pm 0,13 \times 10^8$ (5,43%), натуральных киллеров — $1,6 \pm 0,7 \times 10^6$, 25,9±0,36% от всех лимфоцитов. Количество гемопоэтических стволовых клеток с фенотипом CD34⁺ в концентрате ГСК ПК оценивалось по двум параметрам: процент от общего количества лимфоцитов, что составило $0,81 \pm 0,16\%$, и абсолютное количество в концентрате ГСК ПК в объеме 25 мл, что составило $5,25 \pm 1,2 \times 10^6$ клеток, на 1 мл соответственно — $0,21 \pm 0,15 \times 10^3/\text{мм}^3$. Одна из важных характеристик концентрата ГСК ПК — это количество натуральных киллерных клеток (NK клетки — CD3⁺CD16⁺CD56⁺), их абсолютное количество в концентрате ГСК ПК

ТАБЛИЦА 1. КЛЕТОЧНЫЙ СОСТАВ ОБРАЗЦОВ ПУПОВИННОЙ КРОВИ (n = 1096) ДО ОБРАБОТКИ ($\times 10^9/\text{л}$)

TABLE 1. CELLULAR COMPOSITION OF UMBILICAL CORD BLOOD SAMPLES (n = 1096) BEFORE PROCESSING ($\times 10^9/\text{L}$)

	Лейкоциты WBC	Нейтрофилы NEW	Лимфоциты LYM	Моноциты MON	Эозинофилы EOS	Базофилы BAS	Эритроциты RBC	Тромбоциты PLT
Среднее значение Average value	18,17	8,57	5,81	2,53	0,91	0,35	4510,1	281,6
Медиана Median	17,35	8,01	6,01	2,12	0,55	0,17	4345,2	295,2
Стандартное отклонение Standard deviation	3,24	3,23	1,92	1,02	0,35	0,18	125,1	24,6
Стандартная ошибка среднего Standard error of the mean	0,15	0,10	0,05	0,05	0,02	0,01	26,1	5,1
Минимальное значение Minimum value	10,91	5,11	4,85	0,68	0,07	0,03	4023,1	195,2
Максимальное значение Maximum value	42,91	24,2	18,65	13,78	2,64	2,12	4642,2	354,3

ТАБЛИЦА 2. КЛЕТочный состав концентрата (n = 1096) ГСК пуповинной крови для долгосрочного криохранения ($\times 10^9/\text{л}$)

TABLE 2. CELLULAR COMPOSITION OF THE CONCENTRATE (n = 1096) UMBILICAL CORD BLOOD HSCs FOR LONG-TERM CRYOPRESERVATION ($\times 10^9/\text{L}$)

	Лейкоциты WBC	Нейтрофилы NEW	Лимфоциты LYM	Моноциты MON	Эозинофилы EOS	Базофилы BAS	Эритроциты RBC	Тромбоциты PLT
Среднее значение Average value	72,57	35,51	25,83	8,39	2,14	0,43	2320,1	656,3
Медиана Median	73,25	36,31	24,21	8,92	2,55	0,51	2345,2	691,6
Стандартное отклонение Standard deviation	17,54	9,43	7,82	2,02	0,45	0,31	105,1	22,8
Стандартная ошибка среднего Standard error of the mean	0,56	0,32	0,35	0,06	0,02	0,03	0,62	0,17
Минимальное значение Minimum value	62,51	29,37	22,25	6,82	1,79	0,32	2123,1	507,1
Максимальное значение Maximum value	137,85	64,6	47,96	15,81	3,02	0,82	2649,7	965,2

ТАБЛИЦА 3. КЛЕТочный состав концентрата (n = 1096) ГСК пуповинной крови объемом 25 мл для долгосрочного криохранения ($\times 10^8/\text{л}$)

TABLE 3. CELLULAR COMPOSITION OF THE CONCENTRATE (n = 1096) CORD BLOOD HSCs WITH A VOLUME OF 25 mL FOR LONG-TERM CRYOPRESERVATION ($\times 10^8/\text{L}$)

	Лейкоциты WBC	Нейтрофилы NEW	Лимфоциты LYM	Моноциты MON	Эозинофилы EOS	Базофилы BAS	Эритроциты RBC	Тромбоциты PLT
Среднее значение Average value	17,41	8,16	6,19	2,34	0,48	0,18	550,1	176,5
Медиана Median	18,05	8,91	7,11	1,99	0,55	0,15	505,2	176,2
Стандартное отклонение Standard deviation	4,44	1,23	2,12	0,52	0,15	0,11	10,1	12,8
Стандартная ошибка среднего Standard error of the mean	0,36	0,42	0,25	0,14	0,03	0,02	0,22	0,17
Минимальное значение Minimum value	12,31	5,71	4,3	1,02	0,31	0,32	490,1	156,4
Максимальное значение Maximum value	37,82	17,76	13,26	4,17	1,02	1,82	675,7	265,2

составляет $1,65 \pm 0,7 \times 10^8$ или $25,9 \pm 0,36\%$ от всех лимфоцитов.

Была исследована гетерогенность популяции натуральных киллерных клеток в концентрате ГСК ПК в пересчете на лейкоциты ($CD45^+CD3^-$): в популяции NK-лимфоцитов было выявлено $21,0 \pm 12,1\%$ $CD3^-/CD16/CD56^+$ антиген-положительных клеток, с фенотипами $CD3^-CD56^+$ и $CD3^-CD16^+$ было, соответственно, $17,69 \pm 8,9$ и $13,53 \pm 6,3\%$ клеток. Анализируя субпопуляционную структуру, выявлено, что NK-клетки представлены в основном пулом $CD56^{dim}CD16^{dim}$ клеток — $45,15 \pm 18,1\%$. При этом минорные субпопуляции $CD56^{dim}/CD16^{bright}$, $CD56^-CD16^+$, $CD56^{bright}/CD16^-$ составили $0,27 \pm 0,2$; $1,33 \pm 0,7$ и $0,99 \pm 0,4\%$ соответственно.

Анализируя популяции $CD45^+CD3^+$ лимфоидных клеток, популяция NKT-клеток с иммунофенотипом $CD3^+CD16/CD56^+$ выявляется в $6,22 \pm 2,1\%$ антиген-положительных клеток, количество $CD3^+CD56^+$ клеток составило $3,69 \pm 2,4\%$, количество $CD3^+CD16^+$ — $2,53 \pm 1,2\%$. В пуле NKT-клеток выявлены $CD56^+CD16^-$ клетки, количество которых $5,15 \pm 2,1\%$ среди $CD3^+$ лимфоцитов. При этом определены две минорные субпопуляции, которые отличаются по экспрессии антигенов CD56 и CD16: уровень $CD56^-CD16^+$ составил $2,91 \pm 1,2\%$, а $CD56^+CD16^+$ оказалось равным $0,69 \pm 0,3\%$.

В результате проведенных исследований была получена характеристика клеточного состава, а также иммунологическая характеристика клеток в концентрате ГСК пуповинной крови, заготовленного для долгосрочного хранения для целей трансплантаций онкогематологическим пациентам.

Количество лейкоцитов, ГСК является важной характеристикой концентрата ГСК ПК, находящегося в международной поисковой донорской базе для подбора реципиентам ГСК по степени HLA-совместимости. Чем больше лейкоцитов и ГСК в концентрате ПК, тем выше вероятность подбора образца для целей трансплантации. В Самарском банке пуповинной крови образцы ПК с содержанием в образце менее 15×10^8 лейкоцитов в пересчете на объем заготовленного образца ПК до обработки с антикоагулянт подвераются утилизации, при этом на долгосрочное криохраниение закладываются только концентрат ГСК ПК с высокой клеточностью: с количеством ГСК $CD34^+$ не менее $1,0 \times 10^6$, при этом в концентрате ГСК ПК среднее количество $CD34^+$ составляет $5,3 \pm 3,6 \times 10^6$ в образце, среднее количество лейкоцитов $17,41 \pm 0,76 \times 10^8$ в образце.

Полученные данные по общему количеству лейкоцитов в концентрате ГСК ПК без пересчета на объем, хранящегося образца, значимо

отличаются от данных Банка стволовых клеток департамента здравоохранения г.Москвы [4]: $72,57 \pm 0,56 \times 10^9/\text{л}$ против $39,00 \pm 0,48 \times 10^9/\text{л}$, соответственно значимая разница и по количеству популяций лейкоцитов. В нашем исследовании количество нейтрофилов в концентрате ГСК ПК: $35,51 \pm 0,56 \times 10^9/\text{л}$ против $18,30 \pm 0,32 \times 10^9/\text{л}$ и лимфоцитов в концентрате: $25,83 \pm 0,56 \times 10^9/\text{л}$ против $13,10 \pm 0,35 \times 10^9/\text{л}$ соответственно [4].

Выявленные значимые различия в содержании лейкоцитарного пула в концентрате ГСК ПК объясняются разными критериями, установленным к обработке образцов ПК в банках, а также % выхода (сохранения) лейкоцитов после процессинга. В Самарском банке образцы ПК с низким содержанием лейкоцитов не подвергаются процессингу. Минимальное значение лейкоцитов в нашем исследовании до процессинга ПК в образце $10,91 \times 10^9/\text{л}$ против $5,83 \times 10^9/\text{л}$, поэтому образцы ПК, заложенные на долгосрочное криохраниение, отличаются высоким содержанием в концентрате ГСК ПК $CD34^+$ клеток: $5,25 \pm 3,6 \times 10^6$ в образце, что составляет $0,210 \times 10^3/\text{мм}^3$.

Для реализации эффекта трансплантат против лейкоза свою решающую роль играют натуральные киллеры [3, 9, 14]. Поэтому иммунологическая характеристика концентрата ГСК ПК также является важной. В целом пуповинная кровь по данным авторов хорошо охарактеризована [3, 4, 11, 12]. Иммунологическая характеристика концентрата ГСК ПК, полученная в ходе исследования, согласуется с данными Румянцев С.А. [4], а также зарубежными авторами [4, 10, 15].

Изучая субпопуляционную структуру NK-лимфоцитов в концентрате ПК выявлено, что иммунофенотип $CD56^{dim}CD16^{dim}$ клеток встречался в большинстве случаев — $45,15 \pm 18,1\%$, а минорные субпопуляции $CD56^{dim}CD16^{bright}$, $CD56^-CD16^+$, $CD56^{bright}CD16^-$ составили $0,27 \pm 0,2$; $1,33 \pm 0,7$ и $0,99 \pm 0,4\%$ соответственно. Полученные данные согласуются с результатами, опубликованными Табаковым Д.В. [6], где также выявлено, что основной пул NK-клеток у взрослых доноров составили клетки с иммунофенотипом $CD56^{dim}CD16^{dim}$ — $52,3 \pm 19,9\%$, и аналогичные показатели минорных субпопуляций NK-клеток [11, 15].

В нашем исследовании показано, что популяция NKT-клеток в концентрате ГСК ПК с иммунофенотипом $CD3^+CD16/CD56^+$ выявляется в $6,22 \pm 2,1\%$ от лимфоцитов, исследование субпопуляционной структуры NKT-лимфоцитов в концентрате ГСК ПК аналогичны данным, полученным Табаковым Д.В. [6] и другими исследователями [1, 15].

Заключение

Таким образом, мы представили характеристику лейкоцитарного пула, включая иммунофенотип клеток в концентрате ГСК ПК, заготавливаемых в государственном банке ПК для целей трансплантаций. Для повышения востребованности образцов ГСК ПК важно заготавливать образцы ПК с высоким содержанием лейкоцитов, ГСК с иммунофенотипом CD34⁺ и натуральных киллерных клеток (CD3⁺CD16⁺CD56⁺).

При применении критерия обработки образцов ПК с количеством лейкоцитов не менее 15×10^8 лейкоцитов в пересчете на объем заготовленного образца ПК до обработки с антикоагулянтом среднее количество клеток в концентрате ГСК ПК объемом 25 мл, находящегося на долгосрочном криохраниении составляет: лейкоцитов – $17,41 \pm 0,36 \times 10^8$, ГСК с иммунофенотипом (CD34⁺) – $5,25 \pm 3,6 \times 10^6$, натуральных киллерных клеток (CD3⁺CD16⁺CD56⁺) – $1,65 \pm 0,7 \times 10^8$.

Полученные данные о количестве и характеристике иммунофенотипа клеток, а также гетерогенности популяции NK- и NKT-лимфоцитов в концентрате ГСК ПК, заложенных на долгосрочное криохраниение, необходимо учитывать для подбора концентрата ГСК ПК с целью трансплантации при онкогематологических заболеваниях.

Вклад авторов

Написание текста статьи, концепция и дизайн иммунологического исследования, анализ полученных данных — Тюмина О.В., проведение иммунологического исследования — Труслова Л.М., сбор биологического материала, процессинг, анализ лабораторных данных — Овчинников П.А., сбор и анализ литературных источников, статистическая обработка материала — Тюмин И.В., сбор и анализ данных, концепция исследования, редактирование текста статьи — Давыдкин И.Л.

Список литературы / References

1. Абакушина Е.В. Метод проточной цитометрии для оценки NK-клеток и их активности // Клиническая лабораторная диагностика, 2015. № 11. С. 37-44. [Abakushina E.V. Flow cytometry method for assessing NK cells and their activity. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika = Russian Clinical Laboratory Diagnostics*, 2015, Vol. 11, no. 37-44. (In Russ.)]
2. Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации от 25 июля 2003 г. № 325 «О развитии клеточных технологий». [Order of the Ministry of Health of the Russian Federation dated July 25, 2003 No. 325 "On the development of cell technologies"].
3. Ремизова И.И., Чистякова Г.Н., Ляпунов В.А., Черешнев В.А., Устьянцева Л.С., Газиева И.А. Особенности фенотипического состава и функциональной активности иммунокомпетентных клеток пуповинной крови в зависимости от гестационного возраста // Медицинская иммунология, 2016. Т. 18, № 3. С. 291-298. [Remizova I.I., Chistyakova G.N., Lyapunov V.A., Chereshev V.A., Ustyantseva L.S., Gazieva I.A. Features of the phenotypic composition and functional activity of umbilical cord blood immunocompetent cells depending on gestational age. *Meditinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2016, Vol. 18, no. 3, pp. 291-298. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2016-3-291-298.
4. Румянцев С.А., Боякова Е.В., Шутьева А.Б., Майорова О.А., Панков Д.Д., Сахаровская Е.Л. Состав лейкоцитарного пула и гемопоэтических стволовых клеток пуповинной крови доношенных новорожденных // АГ-инфо, 2011. № 2. С. 6-11. [Rumyantsev S.A., Boyakova E.V., Shutieva A.B., Mayorova O.A., Pankov D.D., Sakharovskaya E.L. Composition of the leukocyte pool and hematopoietic stem cells cord blood of full-term newborns. *AG-info = AG-info*, 2011, no. 2, pp. 6-11. (In Russ.)]
5. РУСКОРД. Ассоциация Рускорд открывает новую веху стандартизации для банков пуповинной крови в России. [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://ruscord.com/bez-kategorii/assocziacziya-ruskord-otkryvaet-novuyu-vehu-standartizaczii-dlya-bankov-pupovinnnoj-krovi-v-rossii/> [RUSCORD. Ruscord Association opens a new standardization milestone for cord blood banks in Russia. [Electronic resource]. Access mode: <https://ruscord.com/bez-kategorii/assocziacziya-ruskord-otkryvaet-novuyu-vehu-standartizaczii-dlya-bankov-pupovinnnoj-krovi-v-rossii/>].
6. Табаков Д.В., Заботина Т.Н., Борунова А.А., Панчук И.О., Короткова О.В., Кадагидзе З.Г. Гетерогенность популяций NK- и NKT-лимфоцитов у здоровых доноров // Медицинская иммунология, 2017. Т. 19, № 4. С. 401-408. [Tabakov D.V., Zabolina T.N., Borunova A.A., Panchuk I.O., Korotkova O.V., Kadagidze Z.G. Heterogeneity of NK and NKT lymphocyte populations in healthy donors. *Meditinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2017, Vol. 19, no. 4, pp. 401-408. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2017-4-401-408.
7. Тюмина О.В., Волчков С.Е., Овчинников П.А. Применение гемопоэтических стволовых клеток пуповинной крови // Гены и Клетки, 2019. Т. 14, № 3. С. 236-237. [Tyumina O.V., Volchikov S.E., Ovchinnikov P.A. Application of cord blood hematopoietic stem cells. *Geny i Kletki = Genes and Cells*, 2019, Vol. 14, no. 3, pp. 236-237. (In Russ.)]
8. Abu-Ghosh A., Goldman S., Slone V., van de Ven C., Suen Y., Murphy L., Sender L., Cairo M. Immunological reconstitution and correlation of circulating serum inflammatory mediators/ cytokines with the incidence of acute

graft-versus-host disease during the first 100 days following unrelated umbilical cord blood transplantation. *Bone Marrow Transplant.*, 1999, Vol. 24, pp. 535-544.

9. Barker J.N., Wagner J.E. Umbilical-cord blood transplantation for the treatment of cancer. *Nat. Rev. Cancer*, 2003, Vol. 3, pp. 526-532.

10. Biron C.A., Nguyen K.B., Pien G.C., Cousens L.P., Salazar-Mather T.P. Natural killer cells in antiviral defense: function and regulation by innate cytokines. *Annu. Rev. Immunol.*, 1999, Vol. 17, pp. 189-220.

11. Dalle J.H., Menezes J., Wagner E., Blagdon M., Champagne J., Champagne M.A., Duval M. Characterization of cord blood natural killer cells: implications for transplantation and neonatal infections. *Pediatr. Res.*, 2005, Vol. 57, pp. 649-655.

12. Damele L., Spaggiari G.M., Parodi M., Mingari M.C., Vitale M., Vitale C. Cord blood-derived natural killer cell exploitation in immunotherapy protocols: more than a promise? *Cancers*, 2022, Vol. 14, 4439. doi: 10.3390/cancers14184439.

13. Eapen M., Rubinstein P., Zhang M.-J., Stevens C., Kurtzberg J., Scaradavou A., Loberiza F.R., Champlin R.E., Klein J.P., Horowitz M.M., Wagner J.E. Outcomes of transplantation of unrelated donor umbilical cord blood and bone marrow in children with acute leukaemia: a comparison study. *Lancet*, 2007, Vol. 369, pp. 1947-1954.

14. Escobedo-Cousin M., Jackson N., Laza-Briviesca R., Ariza-McNaughton L., Luevano M., Derniame S., Querol S., Blundell M., Thrasher A., Soria B., Cooper N., Bonnet D., Madrigal A., Saudemont A. Natural killer cells improve hematopoietic stem cell engraftment by increasing stem cell clonogenicity in vitro and in a humanized mouse model. *PLoS One*, 2015, Vol. 10, e0138623. doi: 10.1371/journal.pone.0138623.

15. Verneris M.R., Mille J.S. The phenotypic and functional characteristics of umbilical cord blood and peripheral blood natural killer cell. *Br. J. Haematol.*, 2009, Vol. 147, no. 2, pp. 185-191.

Авторы:

Тюмина О.В. — д.м.н., директор ГБУЗ «Самарский областной медицинский центр «Династия»; профессор кафедры госпитальной терапии ФГБОУ ВО «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Самара, Россия

Овчинников П.А. — заведующий отделением заготовки крови и ее компонентов ГБУЗ «Самарский областной медицинский центр «Династия», г. Самара, Россия

Трусова Л.М. — заведующая лабораторией иммунологического типирования ГБУЗ «Самарский областной медицинский центр «Династия», г. Самара, Россия

Тюмин И.В. — аспирант отделения клинической иммунологии, Медицинский радиологический научный центр имени А.Ф. Цыба — филиал ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Министерства здравоохранения РФ, г. Обнинск; врач-онколог ГБУЗ «Самарский областной медицинский центр «Династия», г. Самара, Россия

Давыдкин И.Л. — д.м.н., профессор, заведующий кафедрой и клиникой госпитальной терапии с курсом поликлинической терапии и трансфузиологии, проректор по научной работе ФГБОУ ВО «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Самара, Россия

Authors:

Tyumina O.V., PhD, MD (Medicine), Director, Samara Regional Dynasty Medical Center; Professor, Department of Hospital Therapy, Samara State Medical University, Samara, Russian Federation

Ovchinnikov P.A., Head, Department of Blood Banking, Samara Regional Dynasty Medical Center, Samara, Russian Federation

Trusova L.M., Head, Department of Immunology, Samara Regional Dynasty Medical Center, Samara, Russian Federation

Tyumin I.V., Postgraduate Student, Department of Clinical Immunology, A. Tsyb Medical Radiological Research Center, Branch of National Medical Research Center of Radiology, Obninsk; Oncologist, Samara Regional Dynasty Medical Center, Samara, Russian Federation

Davydkin I.L., PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Department of Hospital Therapy with Transfusiology, Vice-Rector for Research, Samara State Medical University, Samara, Russian Federation

Поступила 11.08.2023

Отправлена на доработку 04.10.2023

Принята к печати 05.10.2023

Received 11.08.2023

Revision received 04.10.2023

Accepted 05.10.2023

ВОЗМОЖНОСТИ СКАНИРУЮЩЕЙ ЭЛЕКТРОННОЙ МИКРОСКОПИИ В ОБРАТНО-РАССЕЯННЫХ ЭЛЕКТРОНАХ ДЛЯ МОРФОЛОГИЧЕСКОЙ И ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ ОЦЕНКИ ТИМУСА, ВЫНУЖДЕННО УДАЛЕННОГО У ДЕТЕЙ ПЕРВЫХ НЕДЕЛЬ ЖИЗНИ С ВРОЖДЕННЫМИ ПОРОКАМИ СЕРДЦА

Шабалдин А.В.¹, Мухамадияров Р.А.¹, Кошелев В.А.¹,
Ведерникова А.В.², Ровда Ю.И.², Гришачева Е.О.¹, Халивопуло И.К.¹,
Миняйлова Н.Н.², Ляпин А.А.¹

¹ ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний»,
г. Кемерово, Россия

² ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный медицинский университет», г. Кемерово, Россия

Резюме. Тимэктомия в ряде клинических ситуаций является вынужденным этапом кардиохирургического лечения врожденных пороков сердца, но вопрос о ее влиянии на формирование иммунитета в раннем онтогенезе остается открытым. До сих пор среди ученых ведутся споры о развитии иммунодефицитных состояний у детей, перенесших тимэктомию в раннем возрасте. Как в зарубежной, так и отечественной литературе можно видеть совершенно разнополярные мнения. Одним из направлений в решении этого вопроса может быть морфофункциональное исследование удаленного тимуса с помощью современных методов сканирующей электронной микроскопии. Цель исследования — изучить возможности сканирующей электронной микроскопии в обратно-рассеянных электронах для морфологической и функциональной оценки тимуса, вынужденно удаленного у детей первых недель жизни с врожденными пороками сердца.

Было проведено исследование тимуса новорожденного ребенка (27-й день постнатальной жизни) с врожденным пороком сердца: дефект межжелудочковой перегородки при помощи визуализации методом сканирующей электронной микроскопии в обратно-рассеянных электронах после заливки в эпоксидную смолу. Масса тимуса составила 15,7 грамма, размеры тимуса: поперечный — 3,4 см, продольный — 4,1 см, толщина — 1,7 см; объем — 12,4 см³.

Адрес для переписки:

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

Address for correspondence:

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

Образец цитирования:

А.В. Шабалдин, Р.А. Мухамадияров, В.А. Кошелев,
А.В. Ведерникова, Ю.И. Ровда, Е.О. Гришачева,
И.К. Халивопуло, Н.Н. Миняйлова, А.А. Ляпин
«Возможности сканирующей электронной
микроскопии в обратно-рассеянных электронах для
морфологической и функциональной оценки тимуса,
вынужденно удаленного у детей первых недель жизни
с врожденными пороками сердца» // Медицинская
иммунология, 2024. Т. 26, № 3. С. 625-636.
doi: 10.15789/1563-0625-AOE-2924

© Шабалдин А.В. и соавт., 2024

Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

A.V. Shabaldin, R.A. Mukhamadiyarov, V.A. Koshelev,
A.V. Vedernikova, Yu.I. Rovda, E.O. Grishacheva,
I.K. Khalivopulo, N.N. Minyailova, A.A. Lyapin "Applications
of EMBEDDING and backscattered scanning electron
microscopy for morphological and functional assessment of
the thymus forcibly removed in children with congenital heart
defects during the first weeks of life", Medical Immunology
(Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2024, Vol. 26, no. 3,
pp. 625-636. doi: 10.15789/1563-0625-AOE-2924

© Shabaldin A.V. et al., 2024

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

DOI: 10.15789/1563-0625-AOE-2924

Проведенное исследование показало возможности сканирующей электронной микроскопии в обратно-рассеянных электронах в морфологической и в функциональной оценке тимуса как центрального органа иммунной системы. Поэтапная визуализация от малых к большим увеличениям, от тканей к клеткам и внутриклеточным структурам, а также послойное исследование коркового, мозгового вещества, междольковых перегородок и сосудов, позволяет эффективно оценить функциональность тимуса. Данный метод исследования является достаточным для научных исследований вынужденно удаленного тимуса, так как дает возможность для визуализации его микроанатомии. Позволяет проводить фенотипирование клеток различных слоев тимуса, изучать межклеточные взаимодействия тимоцитов с ретикуло-эпителиальными клетками, тонкие особенности телец Гассалья и, наконец, процесс покидания тимуса Т-лимфоцитами.

Ключевые слова: сканирующая электронная микроскопия в обратно-рассеянных электронах, тимус, тимэктомия, врожденные пороки сердца

APPLICATIONS OF EMBEDDING AND BACKSCATTERED SCANNING ELECTRON MICROSCOPY FOR MORPHOLOGICAL AND FUNCTIONAL ASSESSMENT OF THE THYMUS FORCEDLY REMOVED IN CHILDREN WITH CONGENITAL HEART DEFECTS DURING THE FIRST WEEKS OF LIFE

Shabaldin A.V.^a, Mukhamadiyarov R.A.^a, Koshelev V.A.^a,
Vedernikova A.V.^b, Rovda Yu.I.^b, Grishacheva E.O.^a, Khalivopulo I.K.^a,
Minyailova N.N.^b, Lyapin A.A.^a

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

^b Kemerovo State Medical University, Kemerovo, Russian Federation

Abstract. Thymectomy in a number of clinical situations is an unavoidable step of cardiac surgical treatment of congenital heart defects, but the issue of its effects on development of immunity in early ontogenesis remains open. There is still debates among scientists about the risk of immune deficiency states in children who underwent thymectomy at an early age. One may see completely different opinions, both in domestic and foreign publications. A tool for resolving this issue may be provided by morpho-functional studies of the removed thymic tissue by means of modern scanning electron microscopy techniques. The objective of our study was to assess the possibilities of EMbedding and backscattered scanning electron microscopy for morphological and functional evaluation of the thymus, which was forcedly removed in the infant patients with congenital heart defects over the first weeks of life.

The thymus of a newborn infant (postnatal day 27) with congenital heart disease: ventricular septal defect was examined using EMbedding and backscattered scanning electron microscopy imaging after embedding in epoxy resin. The mass of thymus gland was 15.7 g, the dimensions of thymus were: transverse, 3.4 cm; longitudinal, 4.1 cm; thickness, 1.7 cm; volume, 12.4 cm³.

The study showed ability of EMbedding and backscattered scanning electron microscopy in morphological and functional assessment of thymus gland considered the central organ of the immune system. Step-by-step visualization from low to high magnifications, from tissues to cells and intracellular structures, as well as layer-by-layer examination of thymic cortex, medulla, interlobular septa and vessels, allows you to effectively assess the functionality of the thymus. This research method is sufficient for scientific research of the forcedly removed thymus since it enables us to visualize its microanatomy, allowing cell phenotyping at different layers of the thymus, studying intercellular interactions of thymocytes with reticulo-epithelial cells, subtle features of Hassall's bodies and, finally, the process of T lymphocytes' release from thymus gland.

Keywords: Embedding technique, scanning electron microscopy, thymus, thymectomy, congenital heart defects

Введение

Тимэктомия в ряде клинических ситуаций является вынужденным этапом кардиохирургического лечения врожденных пороков сердца, поскольку она осуществляется только с целью обеспечения наилучшего оперативного доступа к аномально сформированному сердцу. Большинство операций проводится с искусственным кровообращением через срединную стернотомию. У части пациентов оперативное вмешательство проводится через боковой доступ (открытый артериальный проток, коарктация аорты, двойное отхождение сосудов от желудочков сердца). Удаление тимуса происходит через срединный доступ [7]. Полное удаление тимуса у детей неонатального и грудничкового периодов, так как у этих детей тимус практически прикрывает всю площадь сердца. Развитие современных технологий, проведение оперативного вмешательства во все более раннем возрасте и сразу после рождения, высокая хирургическая активность приводят к увеличению количества детей, у которых проведена частичная или тотальная тимэктомия [7]. Общеизвестно, что современная практика хирургического лечения пороков сердца позволяет оперировать детей даже в этих периодах детства, т. е. тогда, когда еще не произошло необратимого ремоделирования сосудистого ложа вследствие аномальной гемодинамики и необратимых дистрофических изменений в органах. По определению удаление тимуса (или его части) в этот период должно в той или иной степени негативно влиять на формирование иммунной системы в целом. Так, известно, что формирование центральной толерантности, как основной функции тимуса, продолжается после рождения ребенка, примерно до 28-го дня постнатальной жизни. В этот период происходит ограничение иммунных ответов на микроокружение новорожденного ребенка, в том числе на симбионтную микрофлору матери и ближнего окружения. С этих позиций, способ вынужденного «отключения» органа от процесса «иммунного обеспечения» организма (особенно в раннем возрасте) не мог оставаться без внимания научного медицинского сообщества, где дискуссии по этому вопросу продолжаются.

В то же время удаленный тимус детей неонатального периода почти не исследовался современными методами сканирующей электронной микроскопией, позволяющей детально изучить тонкую структуру тканей и клеток тимуса [3, 12]. В рамках общей концепции тимуса как единственного центрального органа иммунной системы у человека, эти исследования могут дать дополнительную научную информацию о его функционировании в неонатальном периоде, а с одновременным использованием иммунологиче-

ских методов — получить новые знания о формировании иммунопатологии у тимэктомированных детей в последующем онтогенезе.

Сканирующая электронная микроскопия в обратно-рассеянных электронах (СЭМ ОРЭ) является современным методом морфологической оценки тканей, при помощи которого возможно визуализировать макро и микроанатомии тимуса, изучить межклеточные взаимодействия, а также ультраструктурные особенности субклеточных органелл. Данный метод апробирован в ряде кардиологических исследованиях, которые опубликованы в отечественной и зарубежной печати [4, 20, 21]. В то же время исследований тимуса детей с помощью СЭМ ОРЭ не так много и, особенно, у детей первых недель жизни.

Исходя из этого, была поставлена **цель исследования** — изучить возможности сканирующей электронной микроскопии в обратно-рассеянных электронах для морфологической и функциональной оценки тимуса, вынужденно удаленного у детей первых недель жизни с врожденными пороками сердца.

Материалы и методы

Для выполнения поставленной задачи было проведено исследования тимуса новорожденного ребенка (27-й день постнатальной жизни) с врожденным пороком сердца (дефект аортолегочной перегородки, дефект межпредсердной перегородки вторичного типа, дефект межжелудочковой перегородки) с помощью сканирующей электронной микроскопии в обратно-рассеянных электронах. Выполнено полное удаление тимуса через срединный доступ (срединная стернотомия) при кардиохирургической операции по закрытию септальных дефектов.

Протокол исследования был одобрен локальным этическим комитетом Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний». До включения в работу от матери ребенка было получено письменное информированное согласие.

Были измерены масса и размеры тимуса. Масса тимуса составила 15,7 грамма, размеры тимуса: поперечный — 3,4 см, продольный — 4,1 см, толщина — 1,7 см; объем — 12,4 см³. Это соответствует макроскопической категории мезотимуса.

Извлеченный тимус быстро промывали в охлажденном физиологическом растворе и помещали в забуференный (pH 7,4) 10%-ный водный раствор формалина (BioVitrum, Россия). После суточной фиксации в формалине (2 смены раствора формалина по 12 часов каждая) биоматериал постфиксировали 1% тетраоксидом осмия в

0,1 М фосфатном буфере в течение 12 часов, затем окрашивали 2%-ным тетраоксидом осмия в бидистиллированной воде в течение 48 часов. Далее образцы обезвоживали в серии спиртов возрастающей концентрации (50%-ный, 60%-ный, 70%-ный, 80%-ный и 95%-ный этанол, все по две смены, каждая смена по 15 минут), окрашивали 2%-ным уранилацетатом (Electron Microscopy Sciences, США) в 95%-ном этаноле (5 часов), обезвоживали 99,7% изопропанолом (BioVitrum, Россия) в течение 5 часов и ацетоном («Реахим», Россия) в течение 1 часа, пропитывали смесью ацетона с эпоксидной смолой Araldit 502 (Electron Microscopy Sciences, США) в соотношении 1:1 (6 часов), после чего переносили в свежую порцию заливочной смеси эпоксидной смолы (на 24 часа) и далее проводили ее полимеризацию в свежей порции смолы в емкостях FixiForm (Electron Microscopy Sciences, США) при 60 °С. После этого образцы в эпоксидных блоках подвергали шлифовке и полировке на установке TegraPol-11 (Struers, США). Контрастирование цитратом свинца проводили по Рейнольдсу в течение 7 минут путем нанесения раствора на поверхность шлифованного образца с последующей его отмывкой бидистиллированной водой. Далее проводили напыление на полированную поверхность эпоксидных блоков углерода (толщина покрытия 10-15 нм) с помощью вакуумного напылительного поста (ЕМ ACE200, Leica). Визуализацию структуры образцов проводили при помощи оригинального метода сканирующей электронной микроскопии в обратно-рассеянных электронах после заливки в эпоксидную смолу на сканирующем электронном микроскопе Hitachi-S-3400N (Hitachi, Япония) в режиме BSECOMP при ускоряющем напряжении 10 или 15 кВ [4].

Визуализацию структур тимуса проводили по следующей схеме. Для оценки тканей тимуса: долячатость его структуры, соотношение коркового и мозгового слоя, характеристика соединительнотканых перегородок, разделяющих долики и сосуды в них — проводилась визуализация с увеличением 50 и 250. Исследования клеток и межклеточных взаимодействий в корковом и мозговом слоях тимуса проводили при увеличении от 1,00 к до 7,50 к. Тельца Гассалья и выход Т-лимфоцитов в капилляры изучались на увеличениях от 5,00 к до 7,50 к.

Результаты

Гистологические исследования удаленного тимуса проводятся в обязательном порядке в патолого-анатомическом бюро. Как правило, при окрашивании (гематоксилин-эозин) гистологических срезов тимуса анализируется долячатость его строения, соотношения коркового и мозгово-

го вещества в долях, выраженность жировой и соединительно-тканой инволюции. В то же время качественно оценить межклеточные взаимодействия тимоцитов с ретикулоэпителиальными клетками при этой визуализации не удается.

В представленном примере можно видеть полностью сохранившийся тимус (рис. 1, см. 3-ю стр. обложки) с нормальной массой и размерами для четырехнедельного ребенка.

Микроскопическое исследование при увеличении 50 (рис. 2) позволяет оценить долячатость строения тимуса и вычислить соотношение коркового (А) и мозгового (В) вещества (слоев) в доле. Как видно из рисунка 2, в исследуемом тимусе сохранено нормальное соотношение (2/1) коркового и мозгового слоев во всех долях [3], долики разделены соединительноткаными тяжами, в которых визуализируются кровеносные сосуды разных диаметров. Жировая ткань отсутствует. Это указывает на физиологическое функционирование тимуса в этот возрастной период, а его удаление является рисковым фактором для формирования иммунопатологических состояний в последующем онтогенезе.

Визуализации микроскопического строения тимуса на средних увеличениях, фокусируясь на междолевой соединительнотканной перегородке, позволяет оценить стенки кровеносных сосудов (рис. 3). Как видно из рисунка 3, сосудистые стенки артериолы и вены сформированы тремя слоями (соединительнотканый, мышечный и эндотелиальный) и не имеют патологических включений.

Далее проведен анализ клеточного состава коркового вещества тимической долики (рис. 4). Наибольший интерес представляют межклеточные взаимодействия ретикулоэпителиальных клеток коркового слоя (эпителиоцитов) и лимфоцитов тимуса (timoцитов) различной степени дифференцировки с преобладанием гетеро- или эухроматина различной конденсации и маргинации. Эта микроскопическая картина показывает, что в тимусе (в его корковом слое) идут процессы, специфичные только для него, это созревание и отбор (положительная и отрицательная селекции) Т-клеточного рецептора на тимоцитах через их контакты с эпителиоцитами. На рисунке 5 при визуализации на больших увеличениях (до 7,50 к) отлично видны отростки эпителиоцита, его межклеточные контакты с тимоцитами, а также электронно-плотные гранулы внутри самой эпителиальной клетки коркового слоя. Внутриклеточное строение эпителиоцита представлено электронно-плотными гранулами, в цитоплазме также визуализируются митохондрии и мембраны эндоплазматической сети. Морфологическое строение ядра представлено его округлой

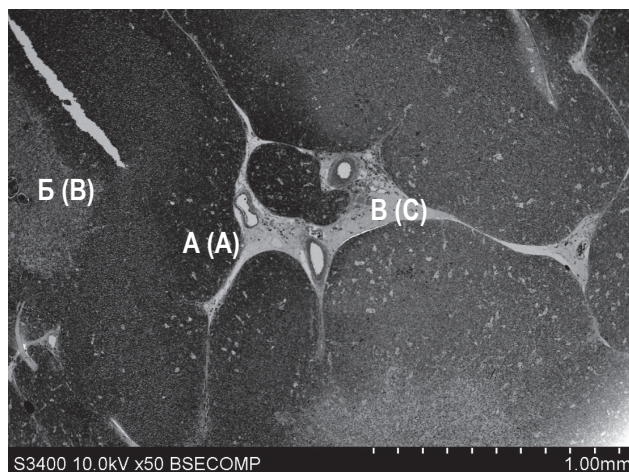


Рисунок 2. Оригинальный метод СЭМ-ОРЭ

Примечание. Микроскопическое строение тимуса, увеличение 50×. Визуализируются дольки тимуса: А – корковое вещество; Б – мозговое вещество; В – междольковые перегородки.

Figure 2. Original scanning electron microscopy in backscattered electrons method

Note. Microscopic structure of the thymus, magnification 50×. The thymus lobules are visualized: A, cortical substance; B, medulla; C, interlobular septa.

формой с умеренной конденсацией хроматина и маленьким темным ядрышком в его центре. В ядре эпителиоцита хорошо детектируется ядерная мембрана. Полученные микроскопические характеристики коркового вещества тимуса дополнительно указывают на эффективное функционирование эпителиоцитов, образующих широкопетлистую сеть за счет своих отростков. На рисунке 4 видны и макрофагальные клетки, участвующие с позитивной и негативной селекцией Т-клеточных рецепторов, экспрессируемых на тимоцитах. В целом эта морфологическая картина коркового слоя тимуса указывает на функциональную состоятельность органа, в котором продолжается иммуногенез, так необходимый для последующего развития ребенка.

На рисунке 6 показано микроскопическое строение коркового слоя тимуса, где в дифференцировке тимоцитов участвуют и другие клетки тимуса (макрофаги (А), клетки-няньки (ретiculoэпителиоциты с инвагинированными тимоцитами, Б), эпителиоциты (В)). Эти активные межклеточные взаимодействия в сети ретикулоэпителиальных клеток хорошо визуализируются при помощи оригинального метода СЭМ-ОРЭ и могут быть главными критериями функциональности тимуса, вынужденно удаленного у детей неонатального периода. Одним из важных морфологических критериев клеточных взаимодействий, относящихся к ретикулоэпителиальным клеткам второго типа, является инвагинация в них тимоцитов, что наглядно видно на рисунке 6.

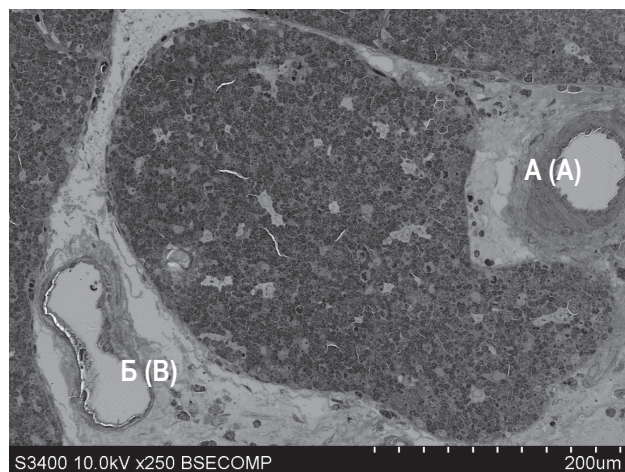


Рисунок 3. Оригинальный метод СЭМ-ОРЭ

Примечание. Микроскопическое строение тимуса, увеличение 250×. Визуализация стенок сосудов. А – артериола; Б – венола.

Figure 3. Original scanning electron microscopy in backscattered electrons method

Note. Microscopic structure of the thymus, magnification 250×. Visualization of vessel walls. A, arteriole; B, venule.

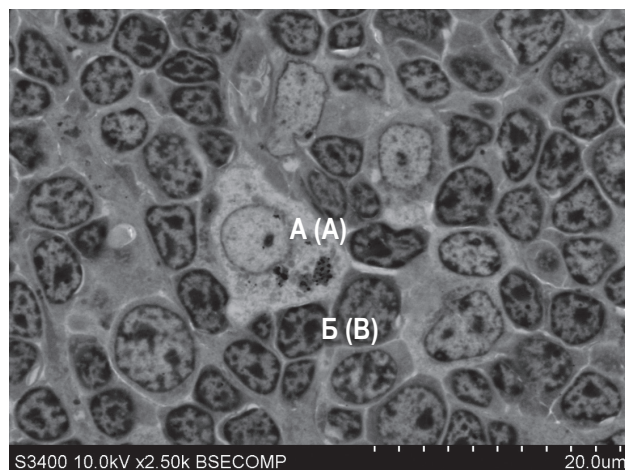


Рисунок 4. Оригинальный метод СЭМ-ОРЭ

Примечание. Микроскопическое строение тимуса, увеличение 2,50 к. Корковый слой тимической дольки. Взаимодействие эпителиоцитов (А) с тимоцитами (Б)

Figure 4. Original scanning electron microscopy in backscattered electrons method

Note. Microscopic structure of the thymus, magnification 2.50 k. Cortical layer of the thymic lobule. Interaction of epithelial cells (A) with thymocytes (B)

В целом эпителиальные клетки (ретiculoэпителиальные клетки) коркового слоя тимуса создают ретикулярную сеть коркового слоя, что видно на рисунках 4 и 6.

Далее морфологическому анализу с помощью оригинального метода СЭМ ОРЭ подверглось мозговое вещество тимуса с его главными мор-

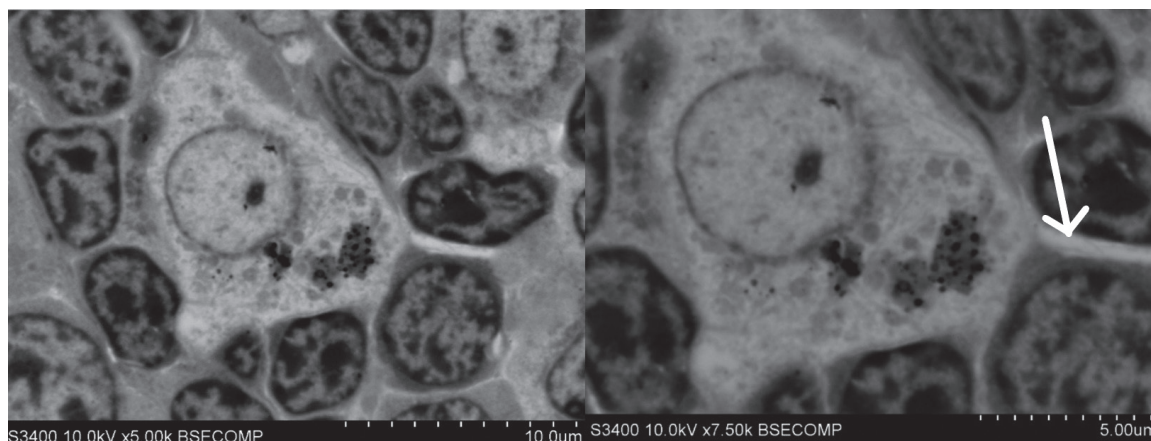


Рисунок 5. Оригинальный метод СЭМ-ОРЭ

Примечание. Микроскопическое строение тимуса. Увеличение эпителиоцита и контактирующих с ним тимоцитов от 5,00 к до 7,50 к. Стрелками указаны отростки эпителиоцита.

Figure 5. Original scanning electron microscopy in backscattered electrons method

Note. Microscopic structure of the thymus. Enlargement of the epithelial cell and thymocytes in contact with it from 5.00 k to 7.50 k. The arrows indicate the processes of the epithelial cell.

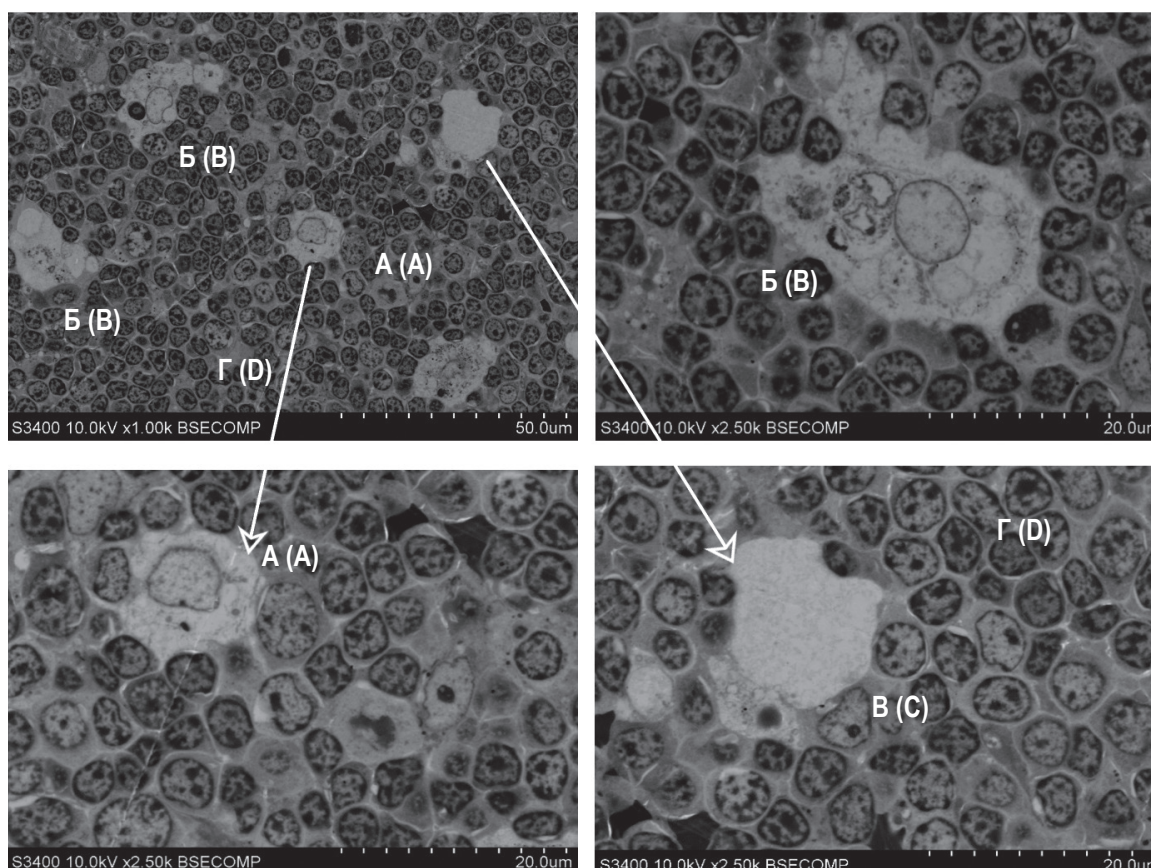


Рисунок 6. Оригинальный метод СЭМ-ОРЭ

Примечание. Микроскопическое строение тимуса. Кортикное вещество тимуса. Увеличение от 1,00 к до 2,50 к. Стрелками указаны увеличенные клетки. Макрофаги (А), клетки-няньки (Б), эпителиоциты (В), тимоциты (Г).

Figure 6. Original scanning electron microscopy in backscattered electrons method

Note. Microscopic structure of the thymus. Thymic cortex. Increase from 1.00 k to 2.50 k. Arrows indicate enlarged cells. Macrophages (A), nurse cells (B), epithelial cells (C), thymocytes (D).

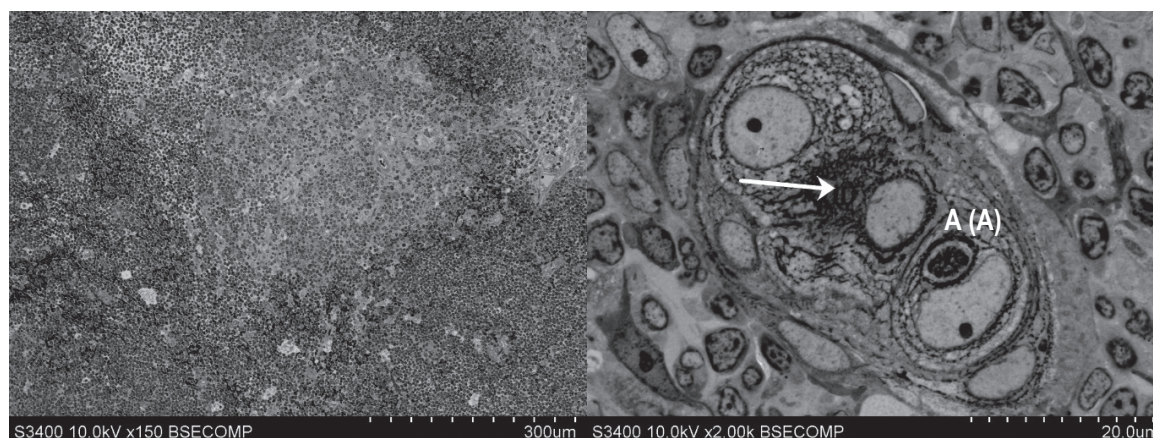


Рисунок 7. Оригинальный метод СЭМ-ОРЭ

Примечание. Микроскопическое строение тимуса, его мозгового слоя с увеличением 150 к (слева) и 2,00 к (справа, тельце Гассалья), объект фагоцитоза (А). Эндоплазматическая сеть показана стрелкой.

Figure 7. Original scanning electron microscopy in backscattered electrons method

Note. Microscopic structure of the thymus, its medulla with a magnification of 150 k (left) and 2.00 k (right, Hassall's body), an object of phagocytosis (A). The endoplasmic reticulum is shown by an arrow.

фологическими элементами — тельцами Гассалья (рис. 7).

Как видно из рисунка 7, мозговое вещество дольки тимуса имеет электронно-светлую плотность с равномерно распределенными по всему веществу клетками. Тельце Гассалья представлено слившимися ретикулоэпителиальными клетками мозгового слоя с другими сильно уплощенными клетками и с объектом фагоцитоза внутри них. В одной из клеток просматривается электронно-плотная эндоплазматическая сеть, похожая на эндоплазматический ретикулум. Эти два выявленных морфологических объекта показывают на основные функции телец Гассалья: фагоцитоз клеток, вступивших в апоптоз, и активный синтез протеинов, в том числе тимических гормонов и цитокинов (интерлейкина-7).

Визуализация мозгового слоя долек тимуса на больших увеличениях показала гетерогенность его клеточного состава (рис. 8).

Как видно из рисунка 8, в мозговом слое дольки тимуса отсутствуют межклеточные взаимодействия тимоцитов с эпителиоцитами мозгового слоя, макрофагами и дендритными клетками, а также нет так называемой ретикулярной сети. Тимоциты представлены клетками разных размеров с преимущественным конденсированным гетерохроматином внутри их ядер. Гетерогенность всех мононуклеаров преимущественно связана с их размером. Большие мононуклеары с округлым ядром могут быть ранними формами лимфоцитарного ряда (лимфобластами). Вполне допустимо, что это тимические прогениторные клетки, которые поддерживают иммуногенез в постнатальном периоде, когда перестает работать

транспорт предшественников Т-лимфоцитов из красного костного мозга.

На рисунке 9 представлена микрофотография возможного выхода дифференцированного тимоцита/Т-лимфоцита из тимического вещества в просвет сосуда для дальнейшего его транспорта в периферические органы иммунной системы.

Тем самым этим микроснимком можно документировать один из важных функциональных компонентов тимуса — его покидание зрелыми тимоцитами, а в дальнейшем — так называемыми

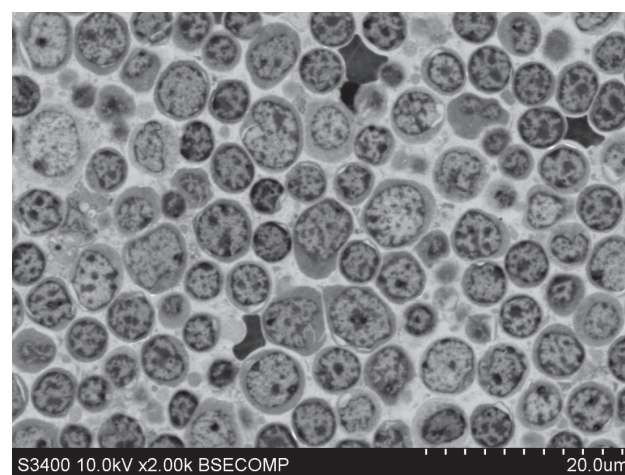


Рисунок 8. Оригинальный метод СЭМ-ОРЭ

Примечание. Микроскопическое строение тимуса. Клеточный состав мозгового слоя дольки тимуса. Увеличение 2,00 к.

Figure 8. Original scanning electron microscopy in backscattered electrons method

Note. Microscopic structure of the thymus. Cellular composition of the medulla of the thymus lobule. Magnification 2.00 k.

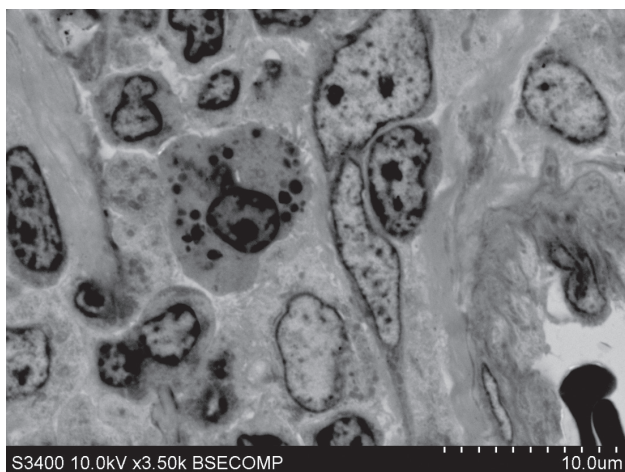


Рисунок 9. Оригинальный метод СЭМ-ОРЭ

Примечание. Микроскопическое строение тимуса. Диapedез тимоцита в просвете капилляра для дальнейшего транспорта в периферические органы иммунной системы. Увеличение 3,50 к.

Figure 9. Original scanning electron microscopy in backscattered electrons method

Note. Microscopic structure of the thymus. Diapedesis of the thymocyte into the lumen of the capillary for further transport to the peripheral organs of the immune system. Magnification 3.50 k.

ми недавними мигрантами из тимуса (RTE — $CD45^+CD31^+$), которые после встречи с антигеном становятся зрелыми Т-лимфоцитами.

Таким образом, проводя анализ тимуса при помощи оригинального метода СЭМ-ОРЭ и используя вариативность увеличительной способности микроскопа, возможно визуализировать макро- и микроанатомию тимуса, а также ультраструктурные особенности клеток и субклеточных органелл. Такие морфологические параметры дают возможность получить исчерпывающую характеристику о функционировании вынужденно удаленного тимуса и предположить возможные последствия для иммунной системы ребенка в дальнейшем. В то же время дискуссионные вопросы о наличии иммунных нарушений у кардиохирургических пациентов с вынужденной тимэктомией в анамнезе представлены в обсуждении.

Обсуждение

С позиции современных знаний тимус является единственным центральным органом иммунной системы человека [2, 8]. Основной его функцией является антиген-независимая дифференцировка Т-лимфоцитов от стадии double negative до стадии single positive, которая проходит преимущественно в корковом слое тимуса, в так называемой сети эпителиальных кортикальных клеток (ретикулоэпителиальных клеток). Эта сеть

образована отростками этих клеток. Большим количеством исследований, при совмещении электронной микроскопии и иммуногистохимии на экспериментальных животных, была доказана основная гипотеза о позитивной и негативной селекции в тимусе, лежащей в основе центральной толерантности к аутоантигенам [14, 17, 22]. Принимая во внимание этот огромный пласт исследований, можно считать доказанными основные положения этой теории, в которой большое значение отводится межклеточным контактам. Прежде всего это контакты кортикальных ретикулоэпителиальных клеток и тимоцитов. Именно этот тимический этап отлично визуализируется при помощи оригинального метода СЭМ-ОРЭ. Другие этапы создания центральной толерантности, такие как апоптоз и фагоцитоз тимоцитов, непрошедших этапы позитивной и негативной селекции, также хорошо визуализируются при помощи оригинального метода СЭМ-ОРЭ. И наконец этап покидания тимуса в мозговом слое single positive Т-лимфоцитом также можно обнаружить с помощью данного оригинального метода. Соответственно, не прибегая к дополнительным гистохимическим исследованиям, но с учетом доказанных положений внутритимической дифференцировки тимоцитов, можно использовать оригинальный метод СЭМ-ОРЭ для дальнейших научных исследований вынужденно удаленного тимуса у детей неонатального периода с врожденным пороком сердца с целью оценки его функциональности. Кроме того, с помощью сканирующей электронной микроскопии в обратно-рассеянных электронах после заливки в эпоксидную смолу есть возможность проводить дифференцировку типов ретикулоэпителиальных клеток, а по их представительству в корковом и мозговом слоях тимуса выделять различные отклонения в функционировании тимуса у детей неонатального периода [3]. Также электронная микроскопия тимуса позволяет оценить так называемые эпителиально-мезенхимальные переходы в тимусе. Оценка этого процесса очень важна для удаленных тимусов как объектов получения стромальных прогениторных клеток, способных создать новое тимическое микроокружение в лабораторных условиях для последующей трансплантации [12].

В то же время остановимся на противоречивых аспектах последствий ранней тимэктомии.

Так, клинический аспект последствий тимэктомии не отличается однородностью. В одних случаях результаты демонстрировали достаточно позитивную картину, как, например, в исследовании, проведенном Wells W.J. и соавт. (1998), где в процессе катамнестического наблюдения в течение первого года жизни (после тимэктомии) ни один из исследуемых пациентов не нуждался в

госпитализации из-за инфекции. Было обычное и ожидаемое количество легких инфекционных заболеваний, включая случаи конъюнктивита, синусита, отита и бронхита, большинство из которых, лечили антибиотиками амбулаторно. Среднее количество инфекционных заболеваний на одного пациента составило 3 в течение года (95% ДИ 1,4). Не было отмечено увеличения заболеваемости кандидозом, который обычно считается клиническим критерием Т-клеточного иммунодефицита [26]. Не показало увеличение частоты инфекций (после тимэктомии у новорожденных) исследование Afifi A и соавт. (2010), причем даже при наличии изменений в популяции Т-клеток [9]. В нижеперечисленных источниках также не наблюдалось ни клинически значимого иммунодефицита, ни повышенной частоты аутоиммунных заболеваний по сравнению с контрольной группой соответствующего возраста [13, 19, 24].

В других случаях выявлялось статистически значимое превышение вирусно-бактериальной инфекции, проявляющейся многократными отитами, ОРВИ, пневмонией; госпитализаций по случаю тяжело протекающей инфекции. Кроме того, частота госпитализаций, связанных с инфекционными заболеваниями, больше увеличилась у пациентов с полной, а не частичной тимэктомией. Послеоперационный катамнез у этой группы детей составлял в среднем 18 лет [15, 18]. В ретроспективном шведском популяционном когортном исследовании авторы изучали частоту аутоиммунных, инфекционных и atopических заболеваний, а также злокачественных новообразований в связи с ранней тимэктомией у больных с ВПС в возрасте до 5 лет. Пациенты, перенесшие тимэктомию, имели повышенный риск аутоиммунных заболеваний, гипотиреоза, глютеновой болезни, а также возникновения инфекций по сравнению с контрольной группой, перенесшей раннюю операцию на сердце без тимэктомии. По сравнению с общей популяцией того же пола и возраста у пациентов после тимэктомии чаще развивались рак, аутоиммунные заболевания и atopические заболевания, а также был значительно более высокий риск соответствующих бактериальных и вирусных инфекций (63,1% против 23,1%) [16].

Wienecke L.M. и соавт. (2022) высказывают предположение о вероятной связи хронического воспаления и иммунного старения у взрослых, прооперированных в детстве по поводу ВПС с сочетанной тимэктомией. Эти пациенты могут составлять группу риска при заболевании, например COVID-19, и они по-прежнему страдают от заметно более высокой и преждевременной заболеваемости и смертности. Ведущими причинами смерти у взрослых с ВПС (и тимэктомирован-

ных) являются сердечная недостаточность (43%), такие инфекции, как пневмония и эндокардит (12%), а также внезапная сердечная смерть [27].

Собственные исследования клеточного состава периферической крови у детей с вынужденной тимэктомией показали развитие абсолютной или относительной нейтропении и лимфоцитопении; последней — за счет лимфоцитов различных фенотипов ($CD3^+$, $CD4^+$, $CD8^+$, $CD19^+$, $CD45RA^+$, $CD31$) — в разных вариациях [5, 6]. Снижение уровня Т-лимфоцитов $CD4$ было больше, чем Т-лимфоцитов $CD8$, главным образом за счет $CD45RA^+$ субпопуляции [25]. Prelog M. и соавт. (2008) свидетельствовали о том, что тимэктомия в раннем детстве у исследуемых приводила к значительным изменениям периферической субпопуляции $CD4^+CD45RA^+CD62L^+$ — наивных Т-клеток, которые напоминают признаки старения иммунной системы у пожилых людей после инволюции тимуса [23]. В частности, отмечалось увеличение Т-клеток памяти и связанное с этим нарастание титров аутоантител (ANA, ANCA) [11].

Некоторые авторы связывали с тимэктомией с ухудшением параметров гуморального иммунитета и системы фагоцитирующих мононуклеаров [10].

Учитывая столь противоречивые результаты последствий тимэктомии, возникает вопрос о первопричине такого исхода. По определению, благоприятный прогноз может быть связан с более зрелым возрастом ребенка, подвергшегося тимэктомии (например старше 1,5-2 лет), когда тимопоэтическая функция вилочковой железы наиболее активная и имеет место более активная миграция из тимуса так называемых недавних эмигрантов из тимуса (RTE , $CD45^+CD31^+$) на периферию (в ткани) с трансформацией в полноценные эффекторные Т-лимфоциты. Такой же результат можно ожидать у тимэктомированных детей более раннего возраста, когда изначально нормально сформированный тимус имеет генетически детерминированную большую функциональную потенцию в сравнении с детьми популяции аналогичного возраста. Негативные последствия тимэктомии могут быть связаны с относительно более ранним оперативным вмешательством (ранее 1,5-2 лет) или морфологически и функционально незрелой вилочковой железой к моменту этого радикального вмешательства. В этом случае передача RTE на периферию относительно более низкая и более низкое формирование зрелых Т-лимфоцитов. Представленный оригинальный метод сканирующей электронной микроскопии в обратно-рассеянных электронах тимуса в этом случае поможет определиться со степенью его зрелости к моменту операции и тем самым поможет внести определенный вклад в аналитику прогноза.

На основании большого количества исследований многие авторы считают, что нужно поставить под сомнение все еще практикуемое хирургическое удаление ткани вилочковой железы при операции на сердце у детей в условиях искусственного кровообращения и начать дальнейшие долгосрочные исследования последствий тимэктомии и развития системного воспалительного ответа [1, 6, 27]. В этом отношении морфофункциональные исследования тимуса до удаления с помощью ультразвуковых методов исследования и удаленного тимуса с помощью самодостаточного метода сканирующей электронной микроскопии в обратно-рассеянных электронах, с параллельным исследованием иммунных показателей периферической крови, в том числе уровней TREC и KREC, позволят получить новые знания о механизмах развития иммунных нарушений в последующем онтогенезе.

Заключение

Полученные данные показали возможности сканирующей электронной микроскопии в обратно-рассеянных электронах в морфологической и в функциональной оценке тимуса, как центрального органа иммунной системы, вынуждено удаленного у детей первых недель жизни

с врожденными пороками сердца. Поэтапная визуализация от малых к большим увеличениям, от тканей к клеткам и внутриклеточным структурам, а также послойное исследование коркового, мозгового вещества, междольковых перегородок и сосудов позволят эффективно оценить функциональность тимуса.

Данный метод исследования является достаточно точным для научных исследований вынужденно удаленного тимуса, так как дает возможность показывать клеточный состав различных слоев тимуса, межклеточные взаимодействия тимоцитов с ретикулоэпителиальными клетками коркового и мозгового слоев тимуса, тонкие особенности телец Гассалья и, наконец, процесс покидания тимуса Т-лимфоцитами.

Дальнейшие исследования тимуса с помощью оригинального метода сканирующей электронной микроскопии в обратно-рассеянных электронах позволят определить цифровые значения для каждого из вышеописанных процессов, а проводя дальнейшее наблюдение за этими детьми (с тимэктомией) с учетом их инфекционной, аллергической и другой иммунопатологии, можно будет выделить внутритимические микроанатомические маркеры различных первичных функциональных состояний тимуса (реактивно избыточное, депрессивное, эйтоничное).

Список литературы / References

1. Борисенко Д.В., Ивкин А.А., Шукевич Д.Л. Современные методы ограничения системного воспалительного ответа при коррекции врожденных пороков сердца у детей в условиях искусственного кровообращения // Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний, 2021. Т. 10, № 2. С. 113-124. [Borisenko D.V., Ivkin A.A., Shukevich D.L. Modern methods of limiting the systemic inflammatory response in the correction of congenital heart defects in children under cardiopulmonary bypass. *Kompleksnyye problemy serdechno-sosudistykh zabolevaniy* = *Complex Problems of Cardiovascular Diseases*, 2021, Vol. 10, no. 2, pp. 113-124. (In Russ.)]
2. Козлов В.А. Определяющая роль тимуса в иммунопатогенезе аутоиммунных, онкологических и инфекционных заболеваний // Медицинская иммунология, 2023. Т. 25, № 1. С. 39-58. [Kozlov V.A. Determining role of thymus in immune pathogenesis of autoimmune, oncological and infectious diseases. *Meditsinskaya immunologiya* = *Medical Immunology (Russia)*, 2023, Vol. 25, no. 1, pp. 39-58. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2009-1-57-62.
3. Кулида Л.В., Перетятко Л.П., Назаров С.Б. Варианты патоморфологических изменений тимуса у внутриутробно инфицированных новорожденных с экстремально низкой массой тела // Архив патологии, 2014. Т. 76, № 3. С. 1319. [Kulida L.V., Peretiatko L.P., Nazarov S.B. Variants of pathomorphological changes in the thymus of in utero infected extremely low birth weight neonatal infants. *Arkhir patologii* = *Pathology Archive*, 2014, Vol. 76, no. 3, pp. 13-19. (In Russ.)]
4. Мухамадияров Р.А., Кошелев В.А., Фролов А.В., Миронов А.В., Шабаев А.Р., Евтушенко А.В., Ляпин А.А., Кутихин А.Г. Ультраструктура неоинтими нативных и искусственных элементов системы кровообращения // Архив патологии, 2022. Т. 84, № 3. С. 14-23. [Mukhamadiyarov R.A., Koshelev V.A., Frolov A.V., Mironov A.V., Shabaev A.R., Evtushenko A.V., Lyapin A.A., Kutikhin A.G. Ultrastructure of neointima of native and artificial elements of the blood circulatory system. *Arkhir patologii* = *Pathology Archive*, 2022, Vol. 84, no. 3, pp. 1423. (In Russ.)]
5. Ровда Ю.И., Шмудевич С.А., Шабалдин А.В., Лукоянычева Е.Б. Особенности субпопуляций Т-лимфоцитов хелперов, экспрессирующих CD45RA- и CD31-маркеры, у детей после тимэктомии, выполненной при хирургическом лечении врожденного порока сердца // Медицинская иммунология, 2016. Т. 18, № 2. С. 119-128. [Rovda Yu.I., Shmulevich S.A., Shabaldin A.V., Lukoyanycheva E.B. Subpopulation profiles of t helper cells expressing CD45RA and CD31 markers in children after thymectomy performed upon surgical

treatment of congenital heart disease. *Meditinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2016, Vol. 18, no. 2, pp. 119-128. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2016-2-119-128.

6. Ровда Ю.И., Шмулевич С.А., Шабалдин А.В., Шабалдина Е.В., Миняйлова Н.Н., Сизова И.Н., Лукоянычева Е.Б. Клинико-иммунологические характеристики детей в катамнезе, после операции по поводу врожденного порока сердца, сочетанной с вынужденной тимэктомией // Педиатрия, 2018. Т. 97, № 4. С. 50-58, [Rovda Y.I., Shmulevich S.A., Shabaldin A.V., Shabaldina E.V., Minyaylova N.N., Sizova I.N., Lukoyanycheva E.B. Clinical and immunological characteristics of children in a catamnesis after surgery for congenital heart diseases, combined with induced thymectomy. *Pediatrics = Russian Pediatrics*, 2018, Vol. 97, no. 4, pp. 50-58. (In Russ.)]

7. Смолягин А.И., Фроленко А.Л., Продеус А.П., Ярилин А.А. Иммунный статус детей после оперативного лечения по поводу врожденных пороков сердца // Вестник Уральской медицинской академической науки, 2011. № 2-1 (35). С. 200-201. [Smolyagin A.I., Frolenko A.L., Prodeus A.P., Yarilin A.A. Immune status of children after surgical treatment for congenital heart defects. *Vestnik Uralskoy meditsinskoy akademicheskoy nauki = Bulletin of the Ural Medical Academic Science*, 2011, no. 2-1 (35), pp. 200-201. (In Russ.)]

8. Ярилин А.А., Донецкова А.Д. Т-клетки – недавние эмигранты из тимуса // Иммунология, 2012. Т. 33, № 6. С. 326-334. [Yarilin A.A., Donetskova A.D. T cells are recent emigrants from the thymus. *Immunologiya = Immunology*, 2012, Vol. 33, no. 6, pp. 326-334. (In Russ.)]

9. Afifi A., Raja S.G., Pennington D.J., Tsang V.T. For neonates undergoing cardiac surgery does thymectomy as opposed to thymic preservation have any adverse immunological consequences? *Interact. Cardiovasc. Thorac. Surg.*, 2010, Vol. 11, no. 3, pp. 287-291.

10. Brearley S., Gentle T.A., Roberts K.D., Abra L.D., Thompson R.A. Immunodeficiency following neonatal thymectomy in man. *Clin. Exp. Immunol.*, 1987, Vol. 70, pp. 322-327.

11. Broek T., Madi A., Delemarre E.M., Schadenberg A.W.L., Tesselaar K., Borghans J.A.M., Nierkens S., Redegeld F.A., Otten H.G., Rossetti M., Albani S., Sorek R., Cohen I.R., Jansen N.J.G., van Wijk F. Human neonatal thymectomy induces altered B-cell responses and autoreactivity. *Eur. J. Immunol.*, 2017, Vol. 47, no. 11, pp. 1970-1981.

12. Campinoti S., Gjinovci A., Ragazzini R., Zanieri L., Ariza-McNaughton L., Catucci M., Boeing S., Park J.-E., Hutchinson J.C., Muñoz-Ruiz M., Manti P.G., Vozza G., Villa C.E., Phylactopoulos D.-E., Maurer C., Testa G., Stauss H.J., Teichmann S.A., Sebire N.J., Hayday A.C., Bonnet D., Bonfanti P. Reconstitution of a functional human thymus by postnatal stromal progenitor cells and natural whole-organ scaffolds. *Nat. Commun.*, 2020, Vol. 11, 6372. doi: 10.1038/s41467-020-20082-7.

13. Eysteinsdottir J.H., Freysdottir J., Haraldsson A., Stefansdottir J., Skaftadottir I., Helgason H., Ogmundsdottir H.M. The influence of partial or total thymectomy during open heart surgery in infants on the immune function later in life. *Clin. Exp. Immunol.*, 2004, Vol. 136, no. 2, pp. 349-355.

14. Gunther-Cummins L., Lagou M., Guzik H., DesMarais S., Karagiannis G., DesMarais V., Macaluso F.P. Method development: characterization of the structure of the thymic epithelial cell network utilizing fluorescent whole slide scanning and 3D SEM array tomography. *Microsc. Microanal.*, 2023, Vol. 29, Iss. 29 Suppl. 1, pp. 1217-1218.

15. Gudmundsdottir J., Óskarsdóttir S., Skogberg G., Lindgren S., Lundberg V., Berglund M., Lundell A.C., Berggren H., Fasth A., Telemo E., Ekwall O. Early thymectomy leads to premature immunologic ageing: An 18-year follow-up. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2016, Vol. 138, no. 5, pp. 1439-1443.e10.

16. Gudmundsdottir J., Söderling J., Berggren H., Óskarsdóttir S., Neovius M., Stephansson O., Ekwall O. Long-term clinical effects of early thymectomy: Associations with autoimmune diseases, cancer, infections, and atopic diseases. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2018, Vol. 141, no. 6, pp. 2294-2297.e8.

17. Kisielow P. How does the immune system learn to distinguish between good and evil? The first definitive studies of T cell central tolerance and positive selection. *Immunogenetics*, 2019, Vol. 71, pp. 513-518.

18. Kurobe H., Tominaga T., Sugano M., Hayabuchi Y., Egawa Y., Takahama Y., Kitagawa T. Complete but not partial thymectomy in early infancy reduces T-cell-mediated immune response: three-year tracing study after pediatric cardiac surgery. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, 2013, Vol. 145, no. 3, pp. 656-662, 662.e1-2; discussion 662.

19. Mancebo E., Clemente J., Sanchez J., Ruiz-Contreras J., de Pablos P., Cortezon S., Romo E., Paz-Artal E., Allende L.M. Longitudinal analysis of immune function in the first 3 years of life in thymectomized neonates during cardiac surgery. *Clin. Exp. Immunol.*, 2008, Vol. 154, no. 3, pp. 375-383.

20. Mukhamadiyarov R.A., Bogdanov L.A., Glushkova T.V., Shishkova D.K., Kostyunin A.E., Koshelev V.A., Shabaev A.R., Frolov A.V., Stasev A.N., Lyapin A.A., Kutikhin A.G. EMbedding and backscattered scanning electron microscopy: a detailed protocol for the whole-specimen, high-resolution analysis of cardiovascular tissues. *Front. Cardiovasc. Med.*, 2021, Vol. 8, 739549. doi: 10.3389/fcvm.2021.739549.

21. Mukhamadiyarov R.A., Kutikhin A.G. Backscattered scanning electron microscopy approach for assessment of microvessels under conditions of normal microanatomy and pathological neovascularization. *Bull. Exp. Biol. Med.*, 2020, Vol. 169, no. 4, pp. 525-530.

22. Ohigashi I., Frantzeskakis M., Jacques A., Fujimori S., Ushio A., Yamashita F., Ishimaru N., Yin D., Cam M., Kelly M.C., Awasthi P., Takada K., Takahama Y. The thymoproteasome hardwires the TCR repertoire of CD8⁺ T cells in the cortex independent of negative selection. *J. Exp. Med.*, 2021, Vol. 218, no. 4, e20201904. doi: 10.1084/jem.20201904.

23. Prelog M., Keller M., Geiger R., Brandstätter A., Würzner R., Schweigmann U., Zlamy M., Zimmerhackl L.B., Grubeck-Loebenstein B. Thymectomy in early childhood: significant alterations of the CD4(+)CD45RA(+) CD62L(+) T cell compartment in later life. *Clin. Immunol.*, 2009, Vol. 130, no. 2, pp. 123-132.
24. Roosen J., Oosterlinck W., Meyns B. Routine thymectomy in congenital cardiac surgery changes adaptive immunity without clinical relevance. *Interact. Cardiovasc. Thorac. Surg.*, 2015, Vol. 20, no. 1, pp. 101-106.
25. Torfadottir H., Freysdottir J., Skaftadottir I., Haraldsson A., Sigfiisson G., Ogmundsdottir H.M. Evidence for extrathymic T cell maturation after thymectomy in infancy. *Clin. Exp. Immunol.*, 2006, Vol. 145, no. 3, pp. 407-412.
26. Wells W.J., Parkman R., Smogorzewska E., Barr M. Neonatal thymectomy: does it affect immune function? *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, 1998, Vol. 115, no. 5, pp. 1041-1046.
27. Wienecke L.M., Cohen S., Bauersachs J., Mebazaa A., Chousterman B.G. Immunity and inflammation: the neglected key players in congenital heart disease? *Heart Fail. Rev.*, 2022, Vol. 27, pp. 1957-1971.

Авторы:

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

Мухамадияров Р.А. — к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории фундаментальных аспектов атеросклероза отдела экспериментальной медицины ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», г. Кемерово, Россия

Кошелев В.А. — лаборант-исследователь, младший научный сотрудник лаборатории молекулярной, трансляционной и цифровой медицины ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», г. Кемерово, Россия

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

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

Гришачева Е.О. — детский кардиолог отделения кардиохирургии № 2 ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», г. Кемерово, Россия

Халивопуло И.К. — кардиохирург, заведующий отделением кардиохирургии № 2 ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», г. Кемерово, Россия

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

Ляпин А.А. — сердечно-сосудистый хирург отделения кардиохирургии № 2 ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», г. Кемерово, Россия

Authors:

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

Mukhamadiyarov R.A., PhD (Biology), Senior Research Associate, Laboratory for Vascular Biology, Division of Experimental Medicine, Research Institute of Complex Problems of Cardiovascular Diseases, Kemerovo, Russian Federation

Koshelev V.A., Laboratory Assistant, Junior Research Associate, Laboratory of Molecular, Translational and Digital Medicine, Research Institute of Complex Problems of Cardiovascular Diseases, Kemerovo, Russian Federation

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

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

Grishacheva E.O., Pediatric Cardiologist, Department of Cardiac Surgery No. 2, Research Institute of Complex Problems of Cardiovascular Diseases, Kemerovo, Russian Federation

Khalivopulo I.K., Chief Regional Specialist for Cardiovascular Surgery, Head, Department of Cardiac Surgery No. 2, Research Institute of Complex Problems of Cardiovascular Diseases, Kemerovo, Russian Federation

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

Lyapin A.A., Cardiovascular Surgeon, Department of Cardiac Surgery No. 2, Research Institute of Complex Problems of Cardiovascular Diseases, Kemerovo, Russian Federation

Поступила 31.10.2023

Отправлена на доработку 13.11.2023

Принята к печати 14.11.2023

Received 31.10.2023

Revision received 13.11.2023

Accepted 14.11.2023

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-1β на репарацию язвенных повреждений слизистой оболочки желудка // Цитокины и воспаление, 2012. Т. 11, № 1. С. 64-69. [Varyushina E.A., Alexandrov G.V., Sazonova T.A., Simbirtsev A.S. Study of the effect of local application of recombinant human interleukin-1β in the repair of ulcerative lesions of gastric mucosa. *Tsitokiny i vospalenie = Cytokines and Inflammation*, 2012, Vol. 11, no. 1, pp. 64-69. (In Russ.)]

Описание статьи из книги (монографии):

Соколова Г.Н., Потапова В.Б. Клинико-патогенетические аспекты язвенной болезни желудка. М.: Анахарсис, 2009. 328 с. [Sokolova G.N., Potapova V.B. Clinical and pathogenetic aspects of gastric ulcer. Moscow: Anacharsis, 2009. 328 p.]

Примеры правильного оформления англоязычных ссылок:

Wells S.M., Kantor A.B., Stall A.M. CD43(S7) expression identifies peripheral B-cell subsets. *J. Immunol.*, 1994, Vol. 153, no. 12, pp. 5503-5515.

Goodman J.W., Parslow T.G. Immunoglobulin proteins. Basic and Clinical Immunology. Ed. Stites D.P., Terr A.I., Parslow T.G., Appleton and Lange, 1994, pp. 66-79.

Ссылки на литературные источники в тексте статьи, в рисунках и таблицах обозначаются арабскими цифрами в квадратных скобках [1, 2, 3,...]. не допускаются ссылки на диссертации, авторефераты диссертаций, публикации в сборниках, методические документы местного уровня. Количество источников не ограничено. В каждой ссылке приводятся все авторы работы. Неопубликованные статьи в список не включаются.

Обозначения, сокращения и единицы измерения

Для сложных терминов или названий, наиболее часто используемых в тексте статьи, можно ввести (в круглых скобках после первого упоминания полного названия термина) не более 3–5 нетрадиционных сокращений. Узаконенные международными номенклатурами сокращения используются в соответствующей транскрипции. Например, для термина «интерлейкин» используется сокращение «IL»,

а не русскоязычный вариант «ИЛ»; аналогично этому используются сокращения: «TNF», а не «ТНФ» или «ФНО»; «CD», а не «СД». Названия микроорганизмов приводятся в оригинальной транскрипции с использованием курсива (*E. coli*, *Streptococcus pyogenes*). Единицы измерения приводятся без точки после их сокращенного обозначения (с, ч, см, мл, мг, kDa и т.д.), регламентированного международными правилами.

Оформление иллюстративного материала

Иллюстративный материал должен быть оригинальным, то есть ранее нигде не опубликованным. Общее количество иллюстраций (таблиц и рисунков) не должно превышать восьми. При большем количестве иллюстраций их публикация оплачивается автором. Публикация цветных иллюстраций (независимо от их количества) также оплачивается автором. Весь иллюстративный материал присылается в двух экземплярах и на диске в виде отдельных файлов.

Размеры иллюстраций:

- максимальная высота — 210 мм
- максимальная ширина для 1 столбца — 82 мм, для 2 столбцов — 170 мм

Таблицы. Каждая таблица печатается на отдельном листе (в отдельном файле на диске) через 2 интервала. Нумерация таблиц дается арабскими цифрами отдельно от нумерации рисунков (графиков и фотографий). Название печатается над таблицей. Весь текст на русском языке, содержащийся в таблице, включая единицы измерения, должен быть переведен на английский язык; при этом перевод следует помещать в ячейку с соответствующим русским текстом отдельной строкой. Название таблицы и текст примечания к ней также должны быть переведены на английский язык и приведены под русским текстом с новой строки. Для пометок в таблицах следует использовать одну или несколько (*). Пояснения печатаются после соответствующего количества (*) под таблицей. Единицы измерения, при необходимости, включаются в заголовки строк или столбцов.

Рисунки (графики и фотографии). В тексте статьи названия рисунков (графиков, фотографий) и таблиц размещаются сразу после абзаца, где на них дается первая ссылка. Все рисунки нумеруются последовательно арабскими цифрами по мере их использования в тексте статьи. Названия рисунков и подписи к ним выносятся в виде списка на отдельную страницу. В списке указываются: номер рисунка, название (с большой буквы), текст примечаний (для микрофотографий должно быть указано увеличение). Подписи к рисункам даются краткие, но достаточно информативные. Названия рисунков и примечаний к ним, нарисовочные подписи, текст легенды должны быть переведены на английский язык и размещены под соответствующим текстом с новой строки. На обороте каждой иллюстрации подписывается фамилия первого автора, название статьи и порядковый номер. Для публикации в журнале принимаются только оригиналы фотографий (не ксерокопии) хорошего качества, максимально приближенные к вышеуказанным размерам.

Фотографии не должны иметь больших полей, т. е. фотографический материал должен занимать всю площадь фотографии. Рисунки могут быть представлены в графических форматах с расширением .tiff (разрешение не менее 300 dpi при 100% масштабе), .eps или .ai. Изображения, встроенные в документы Word, не принимаются. Графики и диаграммы предоставляются вместе с таблицами, на основе которых они были созданы, или с численными обозначениями показателей, отображаемых соответствующими графическими элементами (столбиками, секторами и т.п.) в виде файлов с расширениями .doc или, предпочтительнее, .xls.

Плата за публикацию статей

При соблюдении правил публикация статей в журнале «Медицинская иммунология» является бесплатной для авторов и учреждений, в которых они работают. Редакция может потребовать оплату в следующих случаях: 1) за публикацию цветных иллюстраций; 2) при большом количестве иллюстративного материала (свыше 8 иллюстраций).

Подготовка статей

Для представления статьи авторы должны подтвердить нижеследующие пункты. Статья может быть отклонена, если она им не соответствует.

- А. Направляя статью в журнал, авторы гарантируют, что поданные материалы не были ранее опубликованы полностью или по частям, в любой форме, в любом месте или на любом языке. Также авторы гарантируют, что статья не представлена для рассмотрения и публикации в другом журнале. С момента принятия статьи к печати в журнале «Медицинская иммунология» приведенный в ней материал не может быть опубликован авторами полностью или по частям в любой форме, в любом месте и на любом языке без согласования с руководством журнала. Исключением может являться: 1) предварительная или последующая публикация материалов статьи в виде тезисов или короткого резюме; 2) использование материалов статьи как части лекции или обзора; 3) использование автором представленных в журнал материалов при написании диссертации, книги или монографии. Воспроизведение всего издания или части любым способом запрещается без письменного разрешения издателей. Нарушение закона будет преследоваться в судебном порядке. Охраняется Законом РФ № 5351-1 «Об авторском праве и смежных правах» от 09.07.93 г.
- Б. Файл отправляемой статьи представлен в формате .doc, .docx, .rtf.
- В. Помимо файла со статьей, предоставлены следующие файлы:
 - 1) Файл с метаданными (при загрузке в систему ему присваивается имя «Метаданные»):
 - Фамилия, имя, отчество, ученая степень, ученое звание, должность автора, ответственного за дальнейшую переписку с редакцией (на русском и английском языках).
 - Название учреждения, где работает ответственный автор (в русском и официально принятом английском вариантах).

- Почтовый адрес для переписки с указанием почтового индекса (на русском и английском языках).
- Телефон, факс (с указанием кода страны и города), e-mail.
- Фамилия и инициалы остальных соавторов, их ученые степени, ученые звания, должности.
- Полное название статьи, направляемой в редакцию.
- Количество страниц текста, количество рисунков, количество таблиц.
- Указать, для какого раздела журнала предназначена работа: оригинальные статьи, лекции, обзоры, «точка зрения», краткие сообщения, новые иммунологические методы, случаи из практики, дневник иммунолога, книжное обозрение.
- Дата отправления работы.

2) Отсканированная копия файла с метаданными, подписанная всеми авторами (при загрузке в систему ему присваивается имя «Подписи авторов»)

3) Титульный лист (при загрузке в систему ему присваивается имя «Титульный лист»), по форме:

- название статьи (без использования каких-либо сокращений) (на русском и английском языках);
- Фамилия, имя, отчество, ученая степень, ученое звание, должность всех авторов (полностью) (на русском и английском языках);
- подразделение и учреждение, в котором выполнялась работа (если в работе участвовали авторы из разных учреждений, это должно быть отмечено звездочками) (в русском и официально принятом английском вариантах);
- сокращенное название статьи для верхнего колонтитула (не более 35 символов, включая пробелы и знаки препинания) (на русском и английском языках);
- не менее 6 ключевых слов на русском и английском языках;
- адрес для переписки с указанием телефона, номера факса и адреса e-mail.

4) Резюме (при загрузке в систему ему присваивается имя «Резюме»). Предоставляется в виде одного абзаца без ссылок и специфических сокращений. Объем — не менее 300 слов. Резюме в полном объеме представляется также в переводе на английский язык. В отдельных случаях, по решению редакционной коллегии, может быть затребован развернутый вариант резюме на английском языке.

5) Рисунки, если они есть - каждый отдельным файлом (при загрузке в систему каждому рисунку присваивается имя «Рисунок. Название рисунка (где название рисунка соответствует содержащемуся в файле рисунку. Порядковый номер рисунка)»)

6) Файл в формате .doc, .docx, rtf, с названиями рисунков

7) Таблицы, если они есть - каждая отдельным файлом (Название каждой таблицы должно быть приведено заголовком в файле с самой таблицей)

8) Файл с цитируемой литературой (при загрузке в систему ему присваивается имя «Литература»), по следующей форме: таблица из четырех столбцов (альбомная ориентация), где:

Порядковый номер ссылки	Авторы, название публикации и источника, где она опубликована, выходные данные	ФИО, название публикации и источника на английском	Полный интернет-адрес (URL) цитируемой статьи
Размещаются в таблице в алфавитном порядке, вначале русскоязычные, затем на языках с латинской графикой	Указывать по библиографическому стандарту, представленному выше	Официальное англоязычное название публикации и источника, где она опубликована - для русскоязычных статей. В редких случаях, когда не существует официальных англоязычных названий (это возможно для таких типов публикаций, как тезисы, книги и др.) - редакция просит предоставить их перевод, используя красный цвет шрифта. Для англоязычных публикаций и источников в этом столбце ставится прочерк	В том случае, если информация о статье не размещена на официальном сайте издания, допустимо использовать URL статьи со сторонних сайтов, в том числе системы www.e-library.ru

Текст должен быть набран с одинарным межстрочным интервалом; используется кегль шрифта в 14 пунктов; для выделения используется курсив, а не подчеркивание; все ссылки на иллюстрации, графики и таблицы расположены в соответствующих местах в тексте, а не в конце документа.

Текст соответствует стилистическим и библиографическим требованиям.

Если вы отправляете статью в рецензируемый раздел журнала, то вы согласны с требованиями слепого рецензирования, подробнее о котором можно узнать на сайте журнала (<http://mimmun.ru>) из рубрики **Рецензирование**, в разделе **«О Журнале»**.

Вы можете оформить подписку на журнал «Медицинская иммунология» через отделения связи: Каталог «УРАЛ-ПРЕСС» — индекс 42311. Подписка на электронную версию журнала на сайте www.elibrary.ru

АВТОРСКИЙ УКАЗАТЕЛЬ

Абрамова З.И.....	523	Жданова А.С.....	555	Мануйлов В.А.....	569	Соколов Д.И.....	425
Адамовская Е.Н.	607	Зайцева А.С.	607	Матушкина В.А.....	545	Старикова Э.А.....	503
Аллабердина Д.У.	577	Зементова М.С.	425	Миняйлова Н.Н.....	625	Тетерин Ю.В.....	545
Альпидовская О.В.....	613	Зуева Е.В.	591	Митрофанова Е.С.....	533	Топтыгина А.П.	449
Атажахова М.Г.....	545	Зурочка А.В.....	533	Мухамадияров Р.А.....	625	Тотолян Арег А.	591
Богомазова А.А.....	523	Кажарова С.В.	577	Мухин В.Е.....	555	Трулев А.С.....	591
Борисова О.В.....	569	Калашникова А.А.	513	Нестерова И.В.	545	Трусова Л.М.	617
Бурова Л.А.	503	Карташова Н.П.	569	Овчинников П.А.....	617	Тюмина О.В.	617
Бычкова Н.В.....	513	Копать В.В.....	591	Ожиганова А.....	503	Тюмин И.В.....	617
Ведерникова А.В.	625	Костинов М.П.....	577	Полищук В.Б.....	577	Халивопуло И.К.....	625
Владимиров И.С.	555	Кошелев В.А.....	625	Решетникова И.Д.....	523	Черепович Б.С.....	569
Власенко А.Е.	577	Краевой С.А.....	555	Ровда Ю.И.	625	Чирак Е.Л.....	591
Гайнитдинова В.В.	577	Кудрявцев И.В.....	503, 591	Рябенкова А.А.	591	Чирак Е.Р.	591
Городин В.Н.....	545	Кудряшова А.М.....	569	Савин Т.В.....	591	Чудилова Г.А.....	545
Грачева А.В.....	569	Лебедева А.М.....	503	Савлевич Е.Л.....	533	Шабалдин А.В.....	625
Гришачева Е.О.....	625	Левешко Т.А.....	503	Саенко А.И.....	591	Шепелькова Г.С.	607
Давыдкин И.Л.....	617	Ленева И.А.....	569	Сайдос М.З.....	465	Шиловский И.П.	533
Духовлинов И.В.	591	Любимова Е.В.	533	Свитич О.А.....	569	Шмелев Е.И.	607
Евстифеев В.В.	607	Ляпин А.А.....	625	Сельков С.А.....	425	Юдин В.С.....	555
Еремеев В.В.....	607	Макаров В.В.....	555	Симбирцев А.С.....	591		
Жгулева А.С.....	425	Мамедова Дж.Т.....	503	Скибо Ю.В.....	523		

ПРЕДМЕТНЫЙ УКАЗАТЕЛЬ

адаптивные НК.....	514	микробиота.....	449	хроматография.....	592
адаптивный иммунитет.....	466	микроРНК.....	607	цитокины.....	534
азоксимера бромид.....	578	моноцит.....	426	CD1-молекула.....	449
аминофталгидразид.....	613	мультиплексный анализ.....	534	CD19 ⁺ НК-клетки.....	514
апоптоз.....	524, 546	нейтрофильные гранулоциты.....	546	CD4 ⁺ Т-клетки.....	592
аргинин.....	504	нетяжелая внебольничная		CD56 ⁺ CD19 ⁺ dim.....	514
аргининдеиминаза.....	504	пневмония.....	578	CD8 ⁺ Т-клетки.....	592
астма.....	524	отдаленные эффекты.....	578	COVID-19.....	546, 556, 570, 592
аутоиммунитет.....	449	плацента.....	426	DAMPs.....	466
аутофагия.....	466, 504, 524	полиморфизм.....	524	IFN γ	592
бактериальный лизат.....	578	полипозный риносинусит.....	534	IL-6.....	613
беременность.....	426	постковидный синдром.....	546	IL-10.....	613
бронхиальная астма.....	534	пролиферация.....	504	IL-18.....	613
вируснейтрализующие антитела.....	570	проточная цитометрия.....	556	MAIT-клетки.....	449
воспаление.....	607	псевдонейтрализующий тест.....	570	NET.....	546
врожденные пороки сердца.....	626	пуговичная кровь.....	618	NK-клетки.....	426
ВЭБ-инфекция.....	514	раковые опухоли.....	426	NK-лимфоциты.....	618
гиперчувствительный пневмонит.....	607	ревматические болезни.....	466	NKT-клетки.....	449
глюкокортикоидный рецептор.....	524	резистентность.....	524	NKT-лимфоциты.....	618
гомеостаз.....	449	рецидив.....	534	PRR-рецепторы.....	466
диагностикум.....	592	рецидив.....	534	SARS-CoV-2.....	556, 570, 592
диагностический маркер.....	607	сканирующая электронная		SNOT-22.....	534
иммуоферментный анализ.....	592	микроскопия в обратно-		<i>Streptococcus pyogenes</i>	504
интегральный диагностический		рассеянных электронах.....	626	Т-клеточный иммунный ответ.....	592
критерий.....	546	стволовые гемопоэтические		Т-лимфоциты.....	504, 556
интерстициальные		клетки.....	618	TGF- β 1.....	534
болезни легких.....	607	степень медикаментозного		TGF- β 2.....	534
кластеризация данных.....	556	контроля.....	534	TGF- β 3.....	534
клеточный иммунитет.....	556	стерильное воспаление.....	466	TNF α	613
концентрат ГСК ПК.....	618	субпопуляции лимфоцитов.....	618	γ Т-клетки.....	449
концентрация IL-6.....	578	сыворотки крови животных.....	570		
концентрация TNF.....	578	табачная интоксикация.....	613		
коронавирусный		твердофазный ИФА.....	570		
антиген Cord_PS.....	592	тимус.....	626		
кросс-презентация.....	466	тимэктомия.....	626		
лимфоциты.....	524	трогоцитоз.....	514		
макрофаг.....	426	трофобласт.....	426		
		фиброз.....	607		

ИЛЛЮСТРАЦИИ К СТАТЬЕ «МИКРОРНК КАК МАРКЕРЫ ФИБРОЗИРОВАНИЯ У ПАЦИЕНТОВ С ГИПЕРЧУВСТВИТЕЛЬНЫМ ПНЕВМОНИТОМ» (АВТОРЫ: ШЕПЕЛКОВА Г.С., ЗАЙЦЕВА А.С., ЕВСТИФЕЕВ В.В., АДАМОВСКАЯ Е.Н., ШМЕЛЕВ Е.И., ЕРЕМЕЕВ В.В. [с. 607-612])

ILLUSTRATIONS FOR THE ARTICLE "MicroRNAs AS FIBROSIS MARKERS IN PATIENTS WITH HYPERSENSITIVITY PNEUMONITIS" (AUTHORS: SHEPELKOVA G.S., ZAYTSEVA A.S., EVSTIFEV V.V., ADAMOVSKAYA E.N., SHMELEV E.I., YEREMEEV V.V. [pp. 607-612])

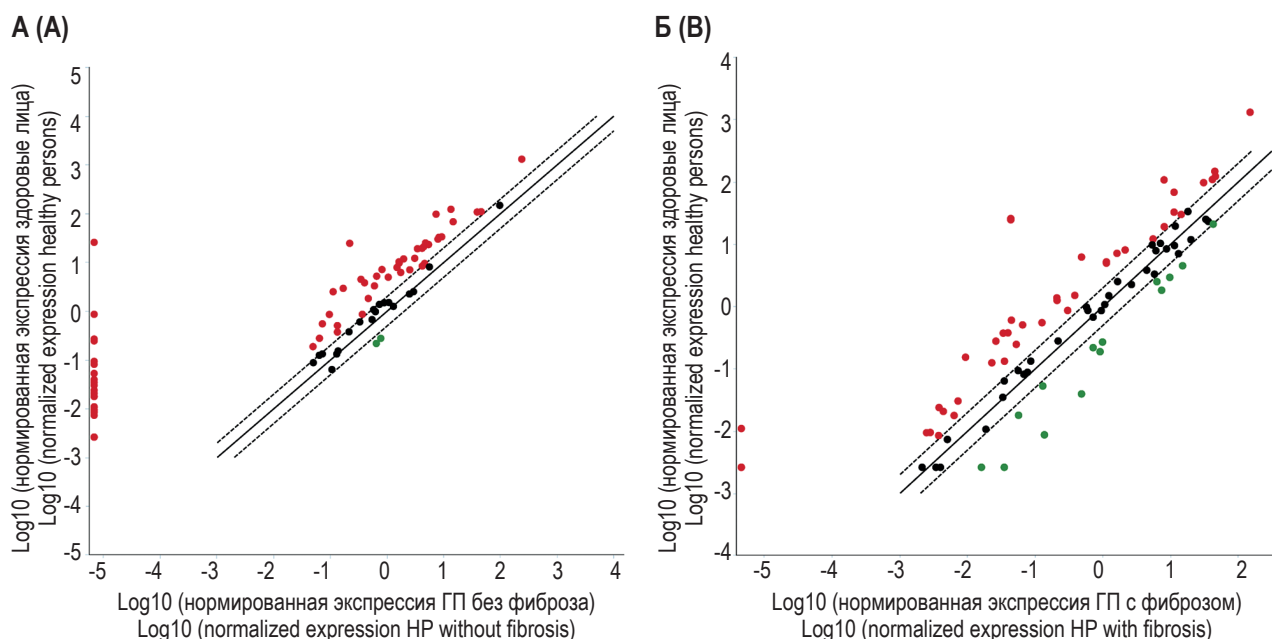


Рисунок 1. Различия профиля экспрессии генов, кодирующих зрелые микроРНК, в сыворотке крови больных с диагнозом ГП в сравнении со здоровым контролем

Примечание. Кратные значения экспрессии генов у пациентов с ГП без фиброза по сравнению со здоровым контролем (А), ГП с фиброзом по сравнению со здоровым контролем (Б). Представлено медианное значение экспрессии для каждого гена (из трех независимых повторов на группу) в виде log10. Красные точки – микроРНК с повышенной экспрессией в сравнении с группой здоровых лиц. Черные точки – микроРНК, чья экспрессия достоверно не отличается от экспрессии в группе здоровых лиц. Зеленые точки – микроРНК с пониженной экспрессией в сравнении с группой здоровых лиц. Пунктирная линия – границы области, в которых показатели экспрессии микроРНК отличаются от контрольной группы менее чем в 2 раза. Сплошная прямая линия – значения идентичны группе контроля.

Figure 1. Difference in the expression of genes encoding mature miRNAs in the serum of HP patients

Note. Gene expression values as fold-change for HP without fibrosis versus healthy control (A), HP with fibrosis versus healthy control (B). The median value for each gene from three independent replicates per group is presented in log10 scale. Red point, upregulated miRNAs as compared with control group. Black point, unchanged miRNAs as compared with control group. Green point, downregulated miRNAs as compared with control group. Dotted line, the boundaries of the area in which the values are less than 2 times different from the control group. Solid straight line, values are identical to the control group.

ИЛЛЮСТРАЦИИ К СТАТЬЕ «ВОЗМОЖНОСТИ СКАНИРУЮЩЕЙ ЭЛЕКТРОННОЙ МИКРОСКОПИИ В ОБРАТНО-РАССЕЯННЫХ ЭЛЕКТРОНАХ ДЛЯ МОРФОЛОГИЧЕСКОЙ И ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ ОЦЕНКИ ТИМУСА, ВЫНУЖДЕННО УДАЛЕННОГО У ДЕТЕЙ ПЕРВЫХ НЕДЕЛЬ ЖИЗНИ С ВРОЖДЕННЫМИ ПОРОКАМИ СЕРДЦА» (АВТОРЫ: ШАБАЛДИН А.В., МУХАМАДИЯРОВ Р.А., КОШЕЛЕВ В.А., ВЕДЕРНИКОВА А.В., РОВДА Ю.И., ГРИШАЧЕВА Е.О., ХАЛИВОПУЛО И.К., МИНЯЙЛОВА Н.Н., ЛЯПИН А.А. [с. 625-636])

ILLUSTRATIONS FOR THE ARTICLE "APPLICATIONS OF EMBEDDING AND BACKSCATTERED SCANNING ELECTRON MICROSCOPY FOR MORPHOLOGICAL AND FUNCTIONAL ASSESSMENT OF THE THYMUS FORCEDLY REMOVED IN CHILDREN WITH CONGENITAL HEART DEFECTS DURING THE FIRST WEEKS OF LIFE" (AUTHORS: SHABALDIN A.V., MUKHAMADIYAROV R.A., KOSHELEV V.A., VEDERNIKOVA A.V., ROVDA YU.I., GRISHACHEVA E.O., KHALIVOPULO I.K., MINYAILOVA N.N., LYAPIN A.A. [pp. 625-636])

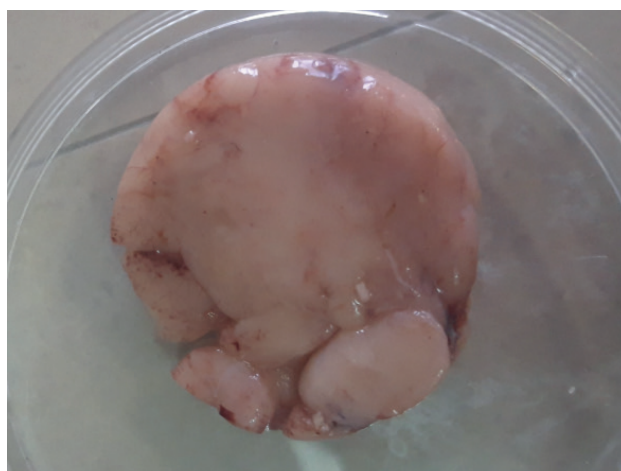


Рисунок 1. Макропрепарат тимуса ребенка 27 дней жизни

Figure 1. Macropreparation of the thymus, a child 27 days old

ПОДПИСНОЙ ИНДЕКС:
УРАЛ-ПРЕСС – 42311

