

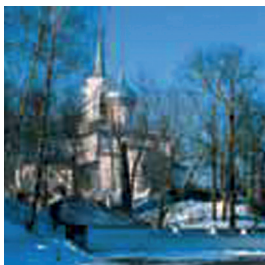
ISSN 1563-0625 (print)
ISSN 2313-741X (online)

Том 26, № 6. С. 1133-1324

2024

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

МЕДИЦИНСКАЯ ИММУНОЛОГИЯ



XV Всероссийская школа по клинической иммунологии

«ИММУНОЛОГИЯ ДЛЯ ВРАЧЕЙ»

2 – 8 февраля 2025 года

Пушкинские Горы, Псковская область

Организаторы:

Министерство здравоохранения
Российской Федерации

Российская Академия Наук

Федеральная служба по надзору
в сфере защиты прав потребителей
и благополучия человека

Комитет по здравоохранению Правительства Санкт-Петербурга
Администрация Псковской области

ГНЦ – Институт иммунологии ФМБА России
Институт экспериментальной медицины
НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера Роспотребнадзора
Первый Санкт-Петербургский государственный
медицинский университет им. акад. И.П. Павлова

Российское научное общество иммунологов
Российская ассоциация аллергологов и клинических иммунологов
Российское цитокиновое общество
Ассоциация специалистов и организаций
лабораторной службы «Федерация Лабораторной Медицины»
Санкт-Петербургское региональное отделение Всероссийской Общественной
Организации – Ассоциации Аллергологов и Клинических Иммунологов

В программе школы:

- Лекции ведущих российских иммунологов
- Лекции зарубежных специалистов
- Семинары по практическим вопросам иммунологии

Пакет слушателя включает:

- Посещение лекций и семинаров
- Проживание
- 3-разовое питание
- Трансфер Псков – Пушкинские Горы и обратно (аэропорт)

**Слушатели, зарегистрированные на сайте НМО www.sovetnmo.ru,
получат зачетные единицы**

Координатор проекта:

**Зам. председателя СПб РО РААКИ,
академик РАН, Тотолян Арег Артемович**
197101, Санкт-Петербург, ул. Мира, 14
НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера

Заявки подавать до 1 декабря 2024 года.

Секретариат: Ракитянская Наталья Владимировна
Тел./факс: (812) 644-63-12, e-mail: shkola@spb-raaki.ru
Адрес для корреспонденции:
197101, Санкт-Петербург, а/я 130, СПб РО РААКИ

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

МЕДИЦИНСКАЯ ИММУНОЛОГИЯ

ноябрь-декабрь

2024, том 26

№ 6

Основан в марте 1999 года

Главный редактор

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

Исполняющий обязанности главного редактора

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

Редакционная коллегия

Горячкина Людмила Александровна – доктор медицинских наук, профессор, заведующая кафедрой клинической аллергологии Российской медицинской академии 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 №ФС77-60436 30 декабря 2014 г.

Данный материал распространяется по лицензии Creative Commons Attribution 4.0 License.

Издательство «Человек»

199004, Россия, Санкт-Петербург, Малый пр. В.О., 26, оф. 3.

E-mail: mail@mirmed.ru

Тел./факс: (812) 325-25-64.

Подписано в печать 16.10.2024 г. Формат 60 x 90 1/8. Печать офсетная.

Усл. печ. л. 24. Тираж 2000 экз. (1-й завод – 1000 экз.) Заказ № 063

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

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

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

(SPb RAACI)

MEDICAL IMMUNOLOGY/ MEDITSINSKAYA IMMUNOLOGIYA

November-December

2024, volume 26

No. 6

Published since March 1999

Editor-in-Chief

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

Acting 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, Malyyi ave., Vasilevsky Island, 26, office 3.

E-mail: mail@mirmed.ru

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

Passed for printing 16.10.2024. Print format 60 x 90 1/8. Offset printing.

Printed sheets 24. Circulation 2000 copies. (1st edition – 1000 copies.)

Print in LLC «ARTEMIDA»

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

Phone: (812) 950-10-99

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

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

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

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

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

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

Editorial Council

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

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

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

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

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

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

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

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

СОДЕРЖАНИЕ

Обзоры

Белоглазов В.А., Яцков И.А., Ульянова Д.И.

РОЛЬ ЛИПОПОЛИСАХАРИДА В ФОРМИРОВАНИИ МИКРОВАСКУЛЯРНЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ ПРИ САХАРНОМ ДИАБЕТЕ 1-ГО ТИПА.....	1139
--	------

Гогина С.С., Стойнова А.М.

ЛИГАНДЫ И НОСИТЕЛИ ДЛЯ УЛУЧШЕНИЯ ИММУННОЙ АКТИВНОСТИ: МЕХАНИЗМЫ ДЕЙСТВИЯ И ПЕРСПЕКТИВЫ ПРИМЕНЕНИЯ В МЕДИЦИНЕ И БИОТЕХНОЛОГИИ.....	1149
---	------

Воробьева И.Г., Абакушина Е.В.

НОВЫЕ СТРАТЕГИИ ИММУНОТЕРАПИИ СОЛИДНЫХ ОПУХОЛЕЙ НА ОСНОВЕ НК-КЛЕТОК.....	1163
--	------

Монирех Аскарзаде, Мохаммад Реза Атаоллахи, Закра Шокролахи, Мохаммад Реза Аташхар

ИНТЕРЛЕЙКИН-40 – НОВЫЙ ЦИТОКИН.....	1177
-------------------------------------	------

Оригинальные статьи

Шабалдин Н.А., Синицкая А.В., Богданов Л.А., Шабалдин А.В.

ВЛИЯНИЕ ВОСПАЛЕНИЯ НА ТЕЧЕНИЕ АСЕПТИЧЕСКОГО НЕКРОЗА ГОЛОВКИ БЕДРЕННОЙ КОСТИ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ.....	1183
---	------

Коваленко Л.П., Журиков Р.В., Вальдман Е.А., Никитин С.В.

ВЛИЯНИЕ ПРОИЗВОДНЫХ 5-ОКСИПИРИМИДИНА И ПРЕПАРАТА СРАВНЕНИЯ ЭРИУС НА ВЫРАЖЕННОСТЬ СИСТЕМНОЙ РЕАКЦИИ АНАФИЛАКСИИ, УРОВЕНЬ ИММУНОГЛОБУЛИНА Е И ЦИТОКИНОВ У МЫШЕЙ ЛИНИИ BALB/c.....	1197
---	------

Корякина О.В., Ковтун О.П., Базарный В.В., Коленкин М.А.

КЛИНИЧЕСКАЯ ЦЕННОСТЬ УРОВНЯ СЫВОРОТОЧНОГО ИНТЕРЛЕЙКИНА-13 ПРИ ВИНКРИСТИНОВОЙ ПОЛИНЕВРОПАТИИ У ДЕТЕЙ ПРИ ОСТРОМ ЛИМФОБЛАСТНОМ ЛЕЙКОЗЕ.....	1205
---	------

Ибрагимов Б.Р., Скибо Ю.В., Решетникова И.Д., Абрамов С.Н., Даминова А.Г., Евтюгин В.Г., Абрамова З.И.

ВЛИЯНИЕ БЕЛКА RUBICON НА ПРОТЕКАНИЕ ЛСЗ-АССОЦИИРОВАННОГО ФАГОЦИТОЗА В МОНОЦИТАХ БОЛЬНЫХ ТЯЖЕЛОЙ АТОПИЧЕСКОЙ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМОЙ.....	1213
--	------

Синицкая А.В., Синицкий М.Ю., Казачек Я.В., Евтушенко А.В., Хуторная М.В., Асанов М.А., Поддубняк А.О., Понасенко А.В.

ОЦЕНКА ЛОКАЛЬНОГО ПРОФИЛЯ ЦИТОКИНОВ, ЭКСПРЕССИРУЕМЫХ НАТИВНЫМИ КЛАПАНАМИ СЕРДЦА, ПОЛУЧЕННЫМИ ОТ ПАЦИЕНТОВ С ИНФЕКЦИОННЫМ ЭНДОКАРДИТОМ.....	1223
--	------

Арсентьева Н.А., Бацунов О.К., Любимова Н.Е., Басина В.В., Эсауленко Е.В., Тотолян Арег А.

ПРОФИЛЬ ЦИТОКИНОВ ПЛАЗМЫ КРОВИ БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКИМ ВИРУСНЫМ ГЕПАТИТОМ С.....	1235
--	------

Свитич О.А., Олисова О.Ю., Потапова М.Б., Меремьянина Е.А., Рассказова Н.Д., Белокопытова Е.А., Солодкова А.А., Мурзина А.А., Семенова И.Б., Упатова А.Г.

ИССЛЕДОВАНИЕ АССОЦИИИ ПОЛИМОРФНЫХ МАРКЕРОВ В ГЕНАХ IL33 И IL37 С РИСКОМ РАЗВИТИЯ АТОПИЧЕСКОГО ДЕРМАТИТА.....	1249
--	------

Расулова Х.А., Расулова М.А.

ИММУНОАНАЛИЗ ЕСТЕСТВЕННЫХ НЕЙРОТРОПНЫХ АУТОАНТИТЕЛ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ БОЛЬНЫХ С COVID-19-АССОЦИИРОВАННЫМИ ИШЕМИЧЕСКИМИ ИНСУЛЬТАМИ.....	1257
---	------

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

АНТИИДИОТИПИЧЕСКИЕ АУТОАНТИТЕЛА, СПЕЦИФИЧНЫЕ К СТЕРОИДНЫМ ГОРМОНАМ, И ПРОЛИФЕРАТИВНАЯ АКТИВНОСТЬ ОПУХОЛИ У БОЛЬНЫХ РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ.....	1269
---	------

Абрамова Т.Я., Блинова Е.А., Пашкина Е.А., Гришина Л.В., Ильина Н.А., Чумасова О.А., Сизиков А.Э., Козлов В.А.

ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ Т-ЛИМФОЦИТОВ В УСЛОВИЯХ «КЛЕТОЧНОГО СОСЕДСТВА» ПРОЛИФЕРИРУЮЩИХ И АПОПТОТИРУЮЩИХ КЛЕТОК IN VITRO У ЗДОРОВЫХ ЛЮДЕЙ И ПАЦИЕНТОВ С РЕВМАТОИДНЫМ АРТРИТОМ.....	1279
---	------

Иванов А.В., Уварова М.А., Фролов К.Б., Семенова Е.В.

ДИНАМИКА ГУМОРАЛЬНОГО ИММУНИТЕТА ПРИ ЕСТЕСТВЕННОМ ИНФИЦИРОВАНИИ SARS-CoV-2 ИЛИЛИ ПОСЛЕ ВАКЦИНАЦИИ ВАКЦИНОЙ «СПУТНИК V».....	1291
---	------

Давыдова А.А., Михайлова В.А., Ковалева А.А., Гребенкина П.В., Тыщук Е.В., Зементова М.С., Беспалова О.Н., Соколов Д.И., Сельков С.А.

ПРЕПАРАТЫ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ ДЛЯ ВНУТРИВЕННОГО ВВЕДЕНИЯ И РЕКОМБИНАНТНОГО ГРАНУЛОЦИТАРНОГО КОЛОНИЕСТИМУЛИРУЮЩЕГО ФАКТОРА ВЛИЯЮТ НА ЭКСПРЕССИЮ ЦИТОТОКСИЧЕСКИХ РЕЦЕПТОРОВ НК-КЛЕТОК.....	1301
---	------

Новикова И.А., Прокопович С.С.

ФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ СТАТУС НЕЙТРОФИЛОВ КРОВИ ПРИ ВРОЖДЕННЫХ ДЕФЕКТАХ АНТИТЕЛОПРОДУКЦИИ.....	1309
--	------

Стенина М.А., Громова Т.В., Греченко В.В., Ганковская Л.В.

УВЕЛИЧЕНИЕ ПОПУЛЯЦИИ γδТ-КЛЕТОК КРОВИ КАК РЕАКЦИЯ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ НА ПОРАЖЕНИЕ СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКИ ЖЕЛУДКА И КИШЕЧНИКА У ЛЮДЕЙ СТАРШИХ ВОЗРАСТНЫХ ГРУПП.....	1315
--	------

Юбилей..... 1322 |

Авторский указатель.....	1324
--------------------------	------

Предметный указатель.....	1324
---------------------------	------

CONTENTS

Reviews

Beloglazov V.A., Yatskov I.A., Ulyanova D.I.

ROLE OF LIPOPOLYSACCHARIDE IN GENESIS OF MICROVASCULAR COMPLICATIONS IN TYPE 1 DIABETES MELLITUS 1139

Gogina S.S., Stoinova A.M.

LIGANDS AND CARRIERS FOR ENHANCING IMMUNE ACTIVITY: MECHANISMS OF ACTION AND PROSPECTS
FOR APPLICATIONS IN MEDICINE AND BIOTECHNOLOGY 1149

Vorobyova I.G., Abakushina E.V.

NEW STRATEGIES FOR SOLID TUMOR IMMUNOTHERAPY BASED ON NK CELLS 1163

Monireh Askarzadeh, Mohammad Reza Ataollahi, Zahra Shokrolahi, Mohammad Reza Atashzar

INTERLEUKIN 40, A NOVEL CYTOKINE 1177

Original articles

Shabaldin N.A., Sinitskaya A.V., Bogdanov L.A., Shabaldin A.V.

THE EFFECT OF INFLAMMATION ON THE COURSE OF EXPERIMENTAL ASEPTIC NECROSIS OF FEMORAL HEAD 1183

Kovalenko L.P., Zhurikov R.V., Valdman E.A., Nikitin S.V.

EFFECT OF 5-HYDROXYPYRIMIDINE DERIVATIVES AND REFERENCE DRUG AERIUS ON SYSTEMIC ANAPHYLAXIS,
CONCENTRATION OF IMMUNOGLOBULIN E AND CYTOKINES TESTED IN BALB/c MICE 1197

Koryakina O.V., Kovtun O.P., Bazarnyi V.V., Kopenkin M.A.

CLINICAL VALUE OF SERUM INTERLEUKIN-13 LEVELS IN VINCRISTINE-INDUCED POLYNEUROPATHY IN CHILDREN
WITH ACUTE LYMPHOBLASTIC LEUKEMIA 1205

Ibragimov B.R., Skibo Yu.V., Reshetnikova I.D., Abramov S.N., Daminova A.G., Etyugin V.G., Abramova Z.I.

EFFECT OF THE RUBICON PROTEIN ON LC3-ASSOCIATED PHAGOCYTOSIS BY MONOCYTES IN THE PATIENTS
WITH SEVERE ATOPIC BRONCHIAL ASTHMA 1213

Sinitskaya A.V., Sinitsky M.Yu., Kazachek Ya.V., Evtushenko A.V., Khutornaya M.V., Asanov M.A., Poddubnyak A.O., Ponasenko A.V.

CYTOKINE EXPRESSION PROFILE OF NATIVE HEART VALVES OBTAINED FROM PATIENTS WITH INFECTIVE ENDOCARDITIS 1223

Arsentieva N.A., Batsunov O.K., Lyubimova N.E., Basina V.V., Esaulenko E.V., Totolian Areg A.

CYTOKINE PROFILING OF PLASMA IN PATIENTS WITH VIRAL HEPATITIS C 1235

Svitich O.A., Olisova O.Yu., Potapova M.B., Meremianina E.A., Rasskazova N.D., Belokopytova E.A., Solodkova A.A.,
Murzina A.A., Semenova I.B., Upatova A.G.

ASSOCIATION BETWEEN POLYMORPHISMS OF IL33 AND IL37 AND ATOPIC DERMATITIS 1249

Rasulova Kh.A., Rasulova M.A.

IMMUNE ANALYSIS OF NATURAL NEUROTROPIC AUTOANTIBODIES IN BLOOD SERUM OF PATIENTS WITH
COVID-19 ASSOCIATED ISCHEMIC STROKE 1257

Glushkov A.N., Polenok E.G., Mun S.A., Gordeeva L.A., Antonov A.V., Bairamov P.V., Verbitskaya N.E., Kolpinsky G.I.

ANTI-IDIOTYPIC ANTIBODIES SPECIFIC TO STEROID HORMONES AND PROLIFERATIVE ACTIVITY OF TUMOR
IN BREAST CANCER PATIENTS 1269

Abramova T.Ya., Blinova E.A., Pashkina E.A., Grishina L.V., Ilina N.A., Chumasova O.A., Sizikov A.E., Kozlov V.A.

IN VITRO FUNCTIONAL ACTIVITY OF T LYMPHOCYTES UNDER THE CONDITIONS OF "CELL NEIGHBORHOOD"
OF PROLIFERATING AND APOPTOTIC CELLS IN HEALTHY PEOPLE AND PATIENTS WITH RHEUMATOID ARTHRITIS 1279

Ivanov A.V., Uvarova M.A., Frolov K.B., Semenova E.V.

DYNAMICS OF HUMORAL IMMUNITY DURING NATURAL SARS-CoV-2 INFECTION AND/OR AFTER VACCINATION
WITH THE "SPUTNIK V" VACCINE 1291

Short communications

Davydova A.A., Mikhailova V.A., Kovaleva A.A., Grebenkina P.V., Tyshchuk E.V., Zementova M.S., Bespalova O.N., Sokolov D.I., Selkov S.A.

INTRAVENOUS IMMUNOGLOBULINS AND RECOMBINANT GRANULOCYTE-COLONY STIMULATING FACTOR MODULATE
EXPRESSION OF NK CYTOTOXIC RECEPTORS 1301

Novikova I.A., Prokopovich S.S.

FUNCTIONAL STATUS OF BLOOD NEUTROPHILS IN CONGENITAL DEFECTS OF ANTIBODY PRODUCTION 1309

Stenina M.A., Gromova T.V., Grechenko V.V., Gankovskaya L.V.

EXPANSION OF THE $\gamma\delta$ T CELL POPULATION IN PERIPHERAL BLOOD: A RESPONSE OF IMMUNE SYSTEM
TO THE DAMAGE OF GASTROINTESTINAL MUCOUS MEMBRANES IN OLDER AGE GROUPS 1315

Anniversary 1322

Author index 1324

Subject index 1324

РОЛЬ ЛИПОПОЛИСАХАРИДА В ФОРМИРОВАНИИ МИКРОВАСКУЛЯРНЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ ПРИ САХАРНОМ ДИАБЕТЕ 1-ГО ТИПА

Белоглазов В.А., Яцков И.А., Ульянова Д.И.

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

Резюме. Несмотря на существенные успехи, достигнутые в разработке патогенетических методов лечения пациентов с сахарным диабетом 1-го типа (СД1), и снижение смертности у данной категории больных, по сравнению с общей популяцией разница в ожидаемой продолжительности жизни у пациентов СД1 в возрасте 20 лет составляет около 10-12 лет. Одной из наиболее важных проблем в ведении пациентов с СД1 на данный момент является наличие микрососудистых осложнений, повышающих риск развития сердечно-сосудистых заболеваний (ССЗ) и общей смертности. Избыточный риск сохраняется даже при надлежащем контроле всех факторов риска ССЗ, что определяет необходимость углубленных исследований для уточнения и выявления всех факторов развития и прогрессирования микрососудистых осложнений у пациентов с СД1, а также разработки методов их модификации и коррекции. По данным литературы, основными патогенетическими звеньями развития микрососудистых осложнений при СД1 являются процессы прямого повреждения эндотелия, опосредованного глюкозой, окислительный стресс, а также фибротические процессы микрососудистого русла, в данном литературном обзоре основное внимание сконцентрировано на описании дополнительного возможного пути развития данных изменений — хроническом воздействии повышенной концентрации липополисахарида грамотрицательной флоры (LPS) в системном кровотоке. LPS, повышая генерацию реактивных форм кислорода, через НАДФ-оксидазу приводит к существенному снижению биодоступности эндотелиального NO и развитию эндотелиальной дисфункции (ЭД). Активация толл-подобных рецепторов 4-го типа (TLR4) сопровождается включением p38MAPK и последующей транслокацией NF-κB в ядро, увеличивая транскрипцию гена интерлейкина-6 (IL-6) и молекул адгезии (ICAM-1, VCAM-1 и E-селектина). LPS способен ингибировать противовоспалительное действие TGF-β, повышая количество поляризованных M1-макрофагов и приводя к персистенции воспаления, активировать рецепторы TGFBR1, усиливая экспрессию гена PAI-1, повышая риск атерогенеза и тромбообразования в сосудистом русле. Представленные в данном литературном обзоре данные свидетельствуют о наличии возможной оси «LPS-кишечник-микрососудистая сеть», являющейся важным патогенетическим компонентом микроваскулярных осложнений у пациентов с СД1. Хроническое избыточное поступление LPS в системный кровоток может приводить к развитию

Адрес для переписки:

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

Address for correspondence:

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

Образец цитирования:

В.А. Белоглазов, И.А. Яцков, Д.И. Ульянова «Роль
липолисахарида в формировании микроваскулярных
осложнений при сахарном диабете 1-го типа»
// Медицинская иммунология, 2024. Т. 26, № 6.
С. 1139-1148.
doi: 10.15789/1563-0625-ROL-2863
© Белоглазов В.А. и соавт., 2024
Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

V.A. Beloglazov, I.A. Yatskov, D.I. Ulyanova "Role
of lipopolysaccharide in genesis of microvascular complications
in type 1 diabetes mellitus", Medical Immunology (Russia)/
Meditsinskaya Immunologiya, 2024, Vol. 26, no. 6,
pp. 1139-1148.
doi: 10.15789/1563-0625-ROL-2863
© Beloglazov V.A. et al., 2024
The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License
DOI: 10.15789/1563-0625-ROL-2863

персистирующего низкоинтенсивного воспаления, сопровождающегося изменением архитектоники экстрацеллюлярного матрикса, потенцировать развитие эндотелиальной дисфункции и сосудистого воспаления. Направление изучения влияния LPS на течение СД1 является перспективным направлением и требует дальнейших более глубоких научных изысканий.

Ключевые слова: сахарный диабет 1-го типа, липополисахарид, эндотелиальная дисфункция, сосудистое воспаление, фиброз, кишечная проницаемость

ROLE OF LIPOPOLYSACCHARIDE IN GENESIS OF MICROVASCULAR COMPLICATIONS IN TYPE 1 DIABETES MELLITUS

Beloglazov V.A., Yatskov I.A., Ulyanova D.I.

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

Abstract. Despite significant advances in pathogenetic treatments for patients with diabetes mellitus type 1 (DM1) and reduction of mortality in this cohort of patients, as compared with general population, the difference in life expectancy in DM1 patients at the age of 20 years is about 10-12 years. Microvascular complications that increase the risk of cardiovascular disease (CVD) and overall mortality represent one of the most important problems in management of patients with DM1. The excessive risks persist even with proper control of all CVD risk factors, thus determining the need for in-depth research, in order to clarify and identify all factors of development and progression of microvascular complications in patients with DM1, as well as to develop methods for their modification and correction. According to current literature, the main pathogenetic links in the development of microvascular complications in DM1 concern, e.g., direct glucose-mediated endothelial damage, oxidative stress, as well as microvascular fibrotic processes. In this review article, we consider additional possible route of these changes, i.e., chronic exposure to increased burden of bacterial lipopolysaccharide (LPS) derived from Gram-negative flora retained in systemic blood flow. LPS, by promoting generation of reactive oxygen species via NADPH-oxidase, thus leading to a significantly decreased bioavailability of endothelial NO and development of endothelial dysfunction (ED). Activation of toll-like receptor type 4 (TLR4) is accompanied by activation of p38MAPK, and subsequent translocation of NF- κ B to the nucleus, increasing transcription of the interleukin-6 (IL-6) gene and adhesion molecules (ICAM-1, VCAM-1 and E-selectin). LPS is able to inhibit the anti-inflammatory effect of TGF- β , increasing the number of polarized M1 macrophages and leading to persistence of inflammation, activate TGFBR1 receptors, promotes PAI-1 gene expression, thus increasing the risk of atherogenesis and thrombosis in the vascular bed. The data presented in this literature review suggest a possible "LPS-gut-microvascular network" axis, which is an important pathogenic component of microvascular complications in patients with DM1. Chronic excessive intake of LPS into the systemic bloodstream can lead to the development of persistent low-grade inflammation accompanied by changes in architectonics of extracellular matrix, potentiate the development of endothelial dysfunction and vascular inflammation. The studies of LPS effects upon clinical course of DM1 are promising and require further in-depth research.

Keywords: type 1 diabetes mellitus, lipopolysaccharide, endothelial dysfunction, vascular inflammation, fibrosis, intestinal permeability

Современные стратегии ведения сахарного диабета 1-го типа (СД1) позволили снизить смертность у данной категории больных. Вместе с тем, по сравнению с общей популяцией разница в ожидаемой продолжительности жизни у пациентов СД1 в возрасте 20 лет составляет около 10-12 лет [27, 46].

Данные эпидемиологических исследований показывают, что наличие микрососудистых осложнений у пациентов с СД1 может повышать риск развития сердечно-сосудистых заболеваний (ССЗ) и общей смертности [19, 56]. В 50-летнем исследовании Joslin Medalist Study и в Финском исследовании диабетической нефропатии

(FinnDiane) сосуществование пролиферативной диабетической ретинопатии и диабетической болезни почек стадии $\geq 3B$ было связано с более высокой распространенностью ССЗ у пациентов с длительно существующим диабетом 1-го типа [18].

Избыточный риск сохраняется даже при надлежащем контроле всех факторов риска ССЗ [48]. В частности, было подсчитано, что риск смерти от всех причин, а также сердечно-сосудистой смерти у людей с СД1 с хорошим гликемическим контролем остается в два раза выше, чем у лиц без диабета [36].

Эти данные подчеркивают необходимость углубленных исследований с целью уточнения и стратификации факторов риска развития и прогрессирования микрососудистых осложнений у пациентов с СД1, а также разработки методов их модификации и коррекции [52, 58].

Несмотря на то, что, по данным литературы, основными патогенетическими звеньями развития микрососудистых осложнений при СД1 являются процессы прямого повреждения эндотелия, опосредованного глюкозой, окислительный стресс (из-за перепроизводства супероксида, производства сорбита и конечных продуктов гликирования в результате преобладающего состояния гипергликемии), а также фибротические процессы микрососудистого русла, в данном литературном обзоре основное внимание будет сконцентрировано на описании дополнительного возможного пути развития данных изменений — хроническом воздействии повышенной концентрации липополисахарида грамотрицательной флоры (LPS) в системном кровотоке. Такое решение продиктовано наличием данных о развитии у пациентов с СД1 предпосылок к формированию состояния «метаболической эндотоксинемии» [1, 4, 17], «эндотоксиновой агрессии» [2] и представленных в литературе сведениях о влиянии LPS на развитие сосудистых изменений, сходных с таковыми при СД1 [3, 22, 24, 53].

Кишечная проницаемость, LPS, ЭД и СД1

Кишечный эпителиальный монослой является одним из важнейших барьеров между организмом и внешней средой [20]. Здоровый кишечный барьер обеспечивает прохождение воды, питательных веществ и биологически активных соединений и предотвращает проникновение патогенных веществ, таких как микробные и пищевые антигены [20]. LPS является основным компонентом внешней мембраны грамотрицательных бактерий и состоит из трех основных составляющих: высоко вариабельного О-антигена, состоящего из повторяющихся олигосахаридных единиц, основного олигосахарида и липида А, являющегося основной причиной токсичности

LPS [47]. Толл-подобные рецепторы (TLR) врожденной иммунной системы распознают липид А и затем вызывают развитие каскада иммунных и воспалительных реакции [47]. Повышение кишечной проницаемости способствует транслокации LPS из просвета кишечника в кровоток, вызывая «метаболическую эндотоксинемию» [7, 44]. LPS имеет короткий период полураспада, в связи с чем в качестве маркера «метаболической эндотоксинемии» был выбран LPS-связывающий белок (LBP) [23, 38]. LBP — это острофазный белок, синтезируемый в печени [23, 38]. Связывание комплекса LBP-LPS с кластером дифференцировки 14 (CD14), который в основном экспрессируется макрофагами и нейтрофилами, опосредует трансдукцию сигнала через TLR4 и, в конечном счете, активацию ядерного фактора каппа В (NF- κ B), что приводит к активации врожденных и адаптивных воспалительных реакций [23, 38]. Учитывая, что LBP представляет собой гуморальный компонент врожденного иммунного ответа на LPS, оценка концентрации LBP по данным литературы является косвенным способом оценки эндотоксиновой нагрузки в системном кровотоке и, следовательно, достоверным маркером метаболической эндотоксинемии [23, 38].

Данные, в основном полученные в ходе исследований на животных, свидетельствуют о том, что СД способствует транслокации LPS через кишечный барьер, что приводит к повышению его концентрации в системном кровотоке [7]. На данный момент наблюдается значительное преобладание научных публикаций, описывающих состояние эндотоксинемии у пациентов с СД2, относительно СД1 (70% и 30% соответственно) [17]. В большинстве исследований сообщается о высоком уровне циркулирующего LPS в кровотоке (на 235,7% превышающих верхний диапазон нормы) у пациентов с СД1, с наивысшими показателями концентрации LPS у больных с наличием такого маркера микрососудистых осложнений, как макроальбуминурия [17, 33]. Достаточно показательным и заслуживающим отдельного внимания является факт критического повышения концентраций, циркулирующего LPS (на 882%!) при манифестации СД1 [45]. Данное наблюдение можно объяснить, с одной стороны, высокой гликемией, с последующим резким нарушением кишечной проницаемости для LPS у пациентов на момент манифестации СД1, с другой стороны, этот факт дает право предположить предшествующее повышение концентрации LPS в системном кровотоке с развитием LPS-индуцированного инсулита. Данное предположение базируется на данных литературы, свидетельствующих о вовлеченности LPS в развитие аутоиммунной патологии [15, 57].

К сожалению, только одна публикация, основанная на исследовании 97 пациентов с СД1, на сегодняшний день описывает состояние LPS-связывающих систем и концентрации LPS у пациентов с СД1. Авторы сообщают о значительном увеличении концентрации LPS, снижении уровня LBP и увеличении уровней маркеров воспаления, таких как IL-1 β , IL-6 и TNF α при СД1 [4].

Литературные данные по изучению зонулина у пациентов с СД1 свидетельствуют о существенном нарушении плотных межэпителиальных контактов кишечника, что создает условия для чрезмерной транслокации LPS в портальную кровь и лимфу у данной категории больных [31, 43, 49, 51, 60]. Однако публикаций, подтверждающих одновременное повышение маркеров системной эндотоксинемии и повышенной кишечной проницаемости при СД1, на данный момент нет.

LPS относится к хорошо изученному классу патоген-ассоциированных молекулярных паттернов [5], который широко используется в животных экспериментальных моделях эндотелиальной дисфункции (ЭД) [5]. Отмечается значительная взаимосвязь уровня эндотоксинемии и развития ССЗ [39]. Установлено, что даже субклиническая эндотоксинемия коррелирует с уровнем смертности от ССЗ [40].

Вызванное различными причинами нарушение целостности кишечного барьера и экспрессии белков плотных контактов способствует свободному проникновению LPS в портальный, а затем и в системный кровоток [39]. Более того, LPS может создавать «порочный круг», способствуя дисрегуляции барьерной функции эпителия кишечника [54].

Влияние LPS на развитие ЭД находит свое доказательство в целом ряде исследований. Так, дисфункция эндотелия после введения LPS была изучена с помощью исследований сосудистой реактивности в работе Choу и соавт., где было показано, что 4-часовое введение LPS лабораторным животным (мыши дикого типа (WT)) подавляло ацетилхолин(АХ)-индуцированный сосудорасширяющий ответ [9], что также подтверждалось и в других исследованиях с похожим дизайном [55]. Были также выявлены косвенные признаки, указывающие на снижение биодоступности оксида азота (NO) после воздействия LPS, что подтверждается отсутствием эффекта ингибирования eNOS на степень дилатации сосудов у мышей [10, 35].

Интересные данные были получены при оценке механизмов, лежащих в основе LPS-индуцированной дисфункции эндотелия в эксперименте на 10-недельных мышках-самцах [55]. Результаты показали, что LPS ингибирование активности NO восстанавливалось после совмест-

ной инкубации с апоцитинином, ингибитором NADPH-оксидазы. Биодоступность NO сильно зависит от присутствия свободных радикалов, генерируемых NADPH-оксидазой. В частности, было показано, что супероксид инактивирует эндотелиальный NO. В эксперименте было доказано, что обработка LPS в концентрации 5 мкг/мл в течение 60 минут увеличивает концентрацию супероксида в 1,5 раза, а общее образование свободных радикалов в эндотелиальных клетках (ЭК) пупочной вены человека (HUVECs) практически в 3 раза [62]. Сам же патологический эффект был ингибирован дифенилениодония хлоридом, также ингибирующим NADPH-оксидазу [63].

Аналогичный апоцитинину эффект подавления LPS-зависимого снижения уровня фосфорилированной eNOS и повышения уровня NADPH-оксидазы в клетках пупочной вены, был зарегистрирован при ингибировании TLR4 [9]. Также в эксперименте на лабораторных мышках, с введением LPS как *in vivo*, так и *ex vivo*, наблюдалось одновременное увеличение концентрации TLR4 и реактивных форм кислорода. Применение антагониста TLR4 — TAK 242 значительно улучшило реакцию АХ-зависимой вазодилатации и значительно снизило генерацию TLR4 и супероксид аниона в аорте исследуемых мышей [58].

Интересным является факт наличия дозозависимого увеличения относительной экспрессии mPНК TLR4, которое наблюдали в гладкомышечных клетках аорты сосудов человека после 24-часовой инкубации с LPS [25]. В интактных клетках пупочной вены экспрессия mPНК TLR4 была очень низкой и достигала максимума при воздействии LPS в дозе 100 нг/мл через 30 мин, а экспрессия белка TLR4 достигала пика через 2 ч [59]. Аналогичная активация TLR4 и связанного с ним белка MyD88 была зарегистрирована в исследованиях на клетках пупочной вены человека при 24-часовой обработке 5 мкг/мл LPS [62, 63]. Активация белка MyD88 в эндотелиальных клетках аорты человека наблюдалась после инкубации с LPS в концентрации 10 нг/мл в течение 12 ч [11].

Роль TLR4 в LPS-индуцированной дисфункции эндотелия была подтверждена в эксперименте с внутрибрюшинным введением LPS нокаутированным по TLR4 лабораторным мышам, у которых не произошло достоверных изменений в характере АХ-индуцированного вазодилатации ($p < 0,05$ по сравнению с контролем WT) [35].

Представленные выше исследования свидетельствуют об активации TLR4-опосредованного пути влияния LPS на повышенную генерацию реактивных форм кислорода, через НАДФ-оксидазу и последующую деактивацию eNOS и

снижение биодоступности эндотелиального NO, что приводит к развитию ЭД.

LPS и воспаление сосудистой стенки

Помимо развития непосредственно ЭД, важным фактором является влияние LPS на развитие воспаления в сосудистой стенке. Данный механизм был подробно изучен на культуре клеток пуповины человека. Через 30 минут инкубации клеток с LPS, уровень ингибитора ядерного фактора каппа В альфа (IkB α), который удерживает NF- κ B в неактивном состоянии, значительно снижался, что сопровождалось повышением активности NF- κ B [59]. Более длительная инкубация клеточной культуры с LPS в дозе 100 нг/мл привела к быстрому $34,7 \pm 3,1\%$ снижению уровня IkB α , что привело к резкому $9,6 \pm 1,1$ -кратному увеличению белка p65 NF- κ B (RelA, член подсемейства NF- κ B) в ядре и $36,7 \pm 3,3\%$ снижению его цитоплазматического уровня, увеличению секреции IL-6 и уровня мРНК в $5,7 \pm 0,2$ раза ($864,8 \pm 32,3$ против $151,8 \pm 12,7$ пг/мл) и $2,2 \pm 0,3$ раза соответственно ($p < 0,01$ по сравнению с контролем) [37].

После стимуляции LPS также увеличивался и уровень фосфорилированной p38 митоген-активированной протеиновой киназы (p38MAPK), достигая пика через 10 минут и почти возвращаясь к базальному уровню через 60 минут [35]. В ряде исследований было показано, что предварительная обработка селективным ингибитором p38MAPK, частично предотвратила транслокацию NF- κ B [26, 34]. Эти данные свидетельствуют о том, что p38MAPK, по крайней мере частично, является регулятором NF- κ B в инкубированных с LPS клеточных культурах. Также сообщается о том, что селективное ингибирование p38MAPK восстанавливает нарушенное АХ-индуцированное расслабление сосудистой стенки, что указывает на связь между сигнальными путями активации данной протеиновой киназы и окислительно-восстановительными реакциями [29]. Возможно, что данная связь является двунаправленной, поскольку ингибирование NADPH-оксидазы 4 значительно снижает p65 NF- κ B в LPS-стимулированной (5 мкг/мл) культуре клеток пупочной вены [62].

Значительный интерес представляют исследования уровня молекул адгезии, включая молекулу межклеточной адгезии-1 (ICAM-1), молекулу адгезии сосудистых клеток-1 (VCAM-1) и Е-селектина в контексте LPS-опосредованных механизмов активации эндотелиальных клеток.

Так, сообщается о значительном увеличении экспрессии мРНК ICAM-1 и Е-селектина в зависимости от времени экспозиции LPS в ЭК и клетках пупочной вены человека [28, 61]. Предварительная обработка ингибитором p38MAPK значительно подавляла LPS-индуцированную

активацию ICAM-1 и VCAM-1 в клетках пупочной вены человека [8].

В двойном слепом плацебо-контролируемом исследовании с участием 24 здоровых респондентов мужчин в возрасте 19-29 лет болюсная внутривенная инъекция LPS в дозе 4 нг/кг массы тела привела к резкому увеличению уровня Е-селектина [6].

В исследовании с фармакологической блокадой NF- κ B с помощью ингибитора LY2228820 в течение 4 ч также был показан значительный ингибирующий эффект на VCAM-1 и Е-селектин в культуре клеток, предварительно обработанных 1 мкг/мл LPS, что подтверждает взаимодействие p38MAPK и NF- κ B в развитии сосудистого воспаления [12]. Более того, у нокаутированных по TLR4 мышей не было зарегистрировано увеличение активации NF- κ B в ответ на внутрибрюшинное введение LPS *in vivo* (10 мкг/10 г массы тела), что подтверждает гипотезу о том, что активация TLR4 играет одну из решающих ролей в LPS-индуцированном воспалении сосудистой стенки [14].

В целом анализ этих данных свидетельствует об активации TLR4-опосредованного воспалительного пути после воздействия LPS на эндотелий. Предполагаемый механизм включает активацию p38MAPK, зависимую и независимую деградацию белка IkB α и последующую транслокацию p65 NF- κ B в ядро, что приводит к транскрипции маркера воспаления (IL-6) и молекул адгезии (ICAM-1, VCAM-1 и Е-селектина).

LPS и фиброз

Одним из основных регуляторов развития фиброза и синтеза внеклеточного матрикса по данным литературы является трансформирующий фактор роста бета (TGF- β) [16, 41], в связи с этим данный раздел будет в большей степени посвящен описанию взаимного влияния LPS и TGF- β .

TGF- β хорошо известный иммуносупрессивный фактор, который участвует в подавлении чрезмерно выраженных воспалительных реакций [13], индуцируя поляризацию макрофагов M2, в том числе на фоне стимуляции LPS, что может ослаблять макрофаг-опосредованное воспаление [30].

Канонический сигнальный путь для TGF- β включает семейство транскрипционных активаторов Smad, которых у млекопитающих насчитывается более восьми [50]. Smad можно разделить на три функциональных класса: активируемые рецепторами Smad (R-Smads, Smad1, Smad2, Smad3, Smad5 и Smad8), общие медиаторные Smad (Co-Smad, Smad4) и ингибиторные Smad (I-Smads, Smad6 и Smad7) [50].

В ряде работ сообщается о выраженном антагонизме действия LPS и TGF- β . Так, Mitchel K.

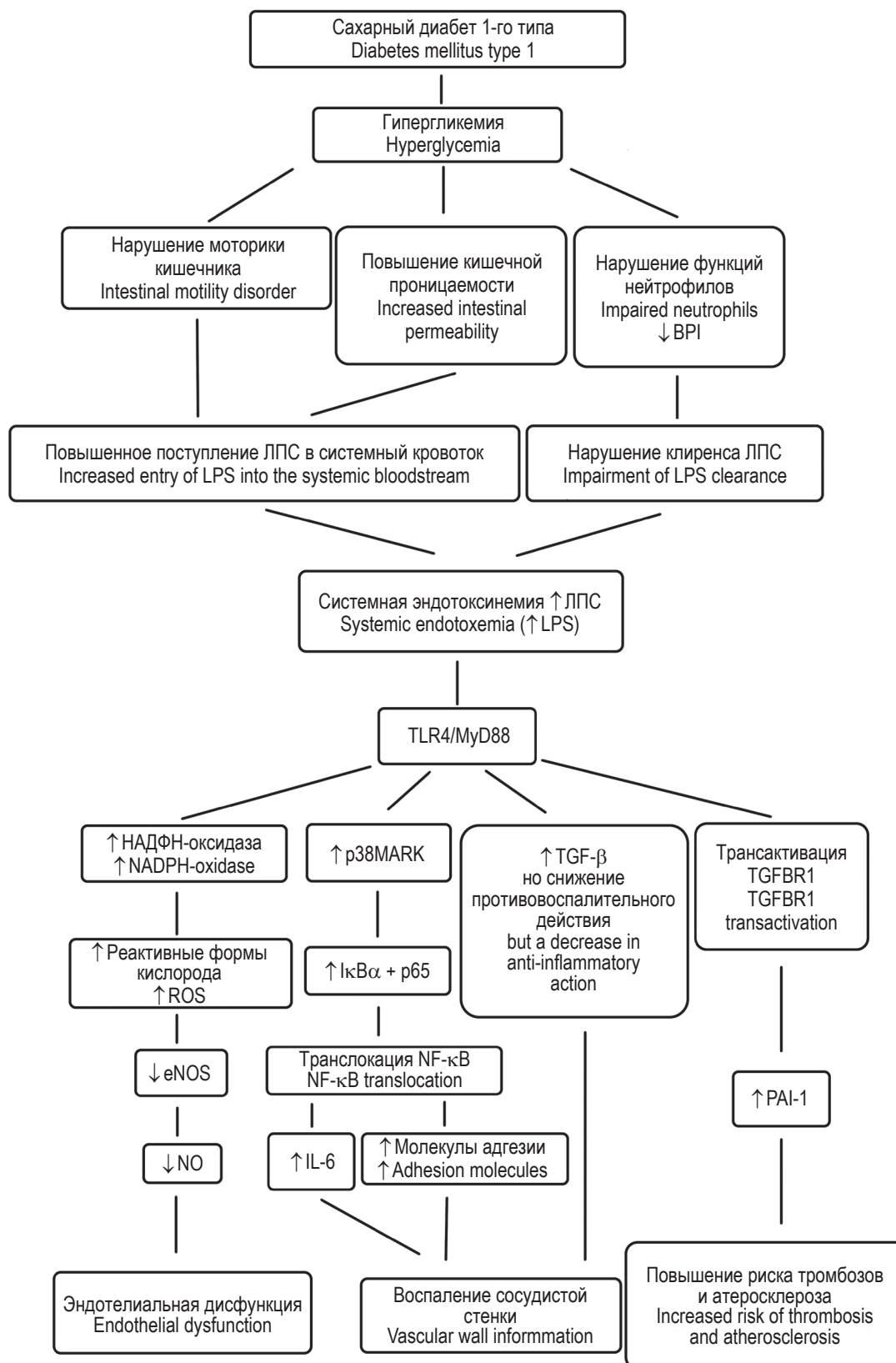


Рисунок 1. Роль LPS в развитии микрососудистых осложнений при СД1

Примечание. BPI – Bactericidal/Permeability-Increasing Protein; ROS – реактивные формы кислорода.

Figure 1. Role of LPS in the development of microvascular complications in DM1

Note. BPI, Bactericidal/Permeability-Increasing Protein; ROS, Reactive Oxygen Species.

и соавт. сообщают о влиянии активации LPS/TLR4 на ключевые компоненты сигнального пути TGF- β 1 в микроглии, в результате чего TGF- β 1 теряет способность оказывать свое противовоспалительное действие, что приводит к длительной персистенции воспаления и активированных микроглиальных клеток [42]. Kim E.-Y. с соавт. обнаружили, что LPS подавляет TGF- β 1-индуцированную экспрессию Smad6 в клетках мышей (RAW264.7) и повышает фосфорилирование линкера Smad3 на Thr-179 и Ser-208 1, что в совокупности проявляется в антагонизме противовоспалительной активности TGF- β 1 [32]. Несмотря на влияние LPS на функциональные пути TGF- β , имеются данные, доказывающие как LPS-индуцированное увеличение выработки TGF- β [21, 24], так и увеличение сигнализации рецепторов к TGF- β 1 и продукции TGF- β 1 через паракринные и аутокринные механизмы путем репрессии мембраносвязанного ингибитора костного морфогенетического белка и активина (BAMBI) через активацию TLR4/MyD88/NF- κ B [53]. Особый интерес представляет феномен «трансактиации», при которой непосредственно LPS через TLR4, активируя рецептор I трансформирующего фактора роста бета (TGFBR1), повышает экспрессию мРНК ингибитора активатора плазминогена типа 1 (PAI-1), повышая риск развития ССЗ и их осложнений [3].

Таким образом, с одной стороны, LPS способен проявлять антагонизм с TGF- β , ингибируя его противовоспалительное действие, повышая количество поляризованных M1-макрофагов и приводя к персистенции воспаления в ряде тканей, с другой — стимулировать выработку TGF- β 1, активировать рецепторы TGFBR1, усиливая экспрессию гена PAI-1, что может негативно влиять на процессы атерогенеза и тромбообразования в сосудистом русле.

Заключение

Представленные в данном литературном обзоре данные свидетельствуют о наличии возможной оси «LPS-кишечник-микрососудистая сеть» (рис. 1), являющейся важным патогенетическим компонентом микроваскулярных осложнений у пациентов с сахарным диабетом 1-го типа. Хроническое избыточное поступление LPS в системный кровоток может приводить к развитию персистирующего низкоинтенсивного воспаления, сопровождающегося изменением архитектоники экстрацеллюлярного матрикса, потенцировать развитие эндотелиальной дисфункции и сосудистого воспаления. Направление изучения влияния LPS на течение СД1 является перспективным направлением и требует дальнейших более глубоких научных изысканий.

Список литературы / References

1. Белоглазов В.А., Яцков И.А., Кумельский Е.Д., Половинкина В.В. Метаболическая эндотоксинемия: возможные причины и последствия // Ожирение и метаболизм, 2021. Т. 18, № 3. С. 320-326. [Beloglazov V.A., Yatskov I.A., Kumelsky E.D., Polovinkina V.V. Metabolic endotoxemia: possible causes and consequences. *Ozhirenie i metabolizm = Obesity and Metabolism*, 2021, Vol. 18, no. 3, pp. 320-326. (In Russ.)]
2. Яковлев М.Ю. Роль кишечной микрофлоры и недостаточность барьерной функции печени в развитии эндотоксинемии и воспаления // Казанский медицинский журнал, 1988. Т. 69, № 5. С. 353-358. [Yakovlev M.Yu. Role of intestinal microflora and insufficient barrier function of the liver in the development of endotoxemia and inflammation. *Kazanskiy meditsinskiy zhurnal = Kazan Medical Journal*, 1988, Vol. 69, no. 5, pp. 353-358. (In Russ.)]
3. Afroz R., Kumarapperuma H., Nguyen Q.V.N., Mohamed R., Little P.J., Kamato D. Lipopolysaccharide acting via toll-like receptor 4 transactivates the TGF- β receptor in vascular smooth muscle cells. *Cell. Mol. Life Sci.*, 2022, Vol. 79, no. 2, 121. doi: 10.1007/s00018-022-04159-8.
4. Aravindhan V., Mohan V., Arunkumar N., Sandhya S., Babu S. Chronic endotoxemia in subjects with type-1 diabetes is seen much before the onset of microvascular complications. *PLoS One*, 2015, Vol. 10, no. 9, e0137618. doi: 10.1371/journal.pone.0137618.
5. Battson M.L., Lee D.M., Weir T.L., Gentile C.L. The gut microbiota as a novel regulator of cardiovascular function and disease. *J. Nutr. Biochem.*, 2018, Vol. 56, pp. 1-15.
6. Branger J., van den Blink B., Weijer S., Gupta A., van Deventer S.J.H., Hack C.E., Peppelenbosch M.P., van der Poll T. Inhibition of coagulation, fibrinolysis, and endothelial cell activation by a p38 mitogen-activated protein kinase inhibitor during human endotoxemia. *Blood*, 2003, Vol. 101, pp. 4446-4448.
7. Cani P.D., Bibiloni R., Knauf C., Waget A., Neyrinck A.M., Delzenne N.M., Burcelin R. Changes in gut microbiota control metabolic endotoxemia-induced inflammation in high-fat diet-induced obesity and diabetes in mice. *Diabetes*, 2008, Vol. 57, no. 6, pp. 1470-1481.
8. Chen G., Zhao J., Yin Y., Wang B., Liu Q., Li P., Zhao L., Zhou H. C-type natriuretic peptide attenuates LPS-induced endothelial activation: involvement of p38, Akt, and NF- κ B pathways. *Amino Acids*, 2014, Vol. 46, no. 12, pp. 2653-2663.

9. Choy K.W., Lau Y.S., Murugan D., Vanhoutte P.M., Mustafa M.R. Paeonol attenuates LPS-induced endothelial dysfunction and apoptosis by inhibiting BMP4 and TLR4 signaling simultaneously but independently. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 2018, Vol. 364, no. 3, pp. 420-432.
10. Coquerel D., Nevriere R., Delile E., Mulder P., Marechal X., Montaigne D., Renet S., Remy-Jouet I., Gomez E., Henry J.P., do Rego J.C., Richard V., Tamion F. Gene deletion of protein tyrosine phosphatase 1B protects against sepsis-induced cardiovascular dysfunction and mortality. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 2014, Vol. 34, no. 5, pp. 1032-1044.
11. Cui S., Tang J., Wang S., Li L. Kaempferol protects lipopolysaccharide-induced inflammatory injury in human aortic endothelial cells (HAECs) by regulation of miR-203. *Biomed. Pharmacother.*, 2019, Vol. 115, 108888. doi: 10.1016/j.biopha.2019.108888.
12. Dayang E.Z., Plantinga J., Ter Ellen B., van Meurs M., Molema G., Moser J. Identification of LPS-activated endothelial subpopulations with distinct inflammatory phenotypes and regulatory signaling mechanisms. *Front. Immunol.*, 2019, Vol. 24, no. 10, 1169. doi: 10.3389/fimmu.2019.01169.
13. de Araújo Farias V., Carrillo-Gálvez A.B., Martín F., Anderson P. TGF-beta and mesenchymal stromal cells in regenerative medicine, autoimmunity and cancer. *Cytokine Growth Factor Rev.*, 2018, Vol. 43, pp. 25-37.
14. Fan J., Frey R.S., Malik A.B. TLR4 signaling induces TLR2 expression in endothelial cells via neutrophil NADPH oxidase. *J. Clin. Invest.*, 2003, Vol. 112, no. 8, pp. 1234-1243.
15. Feehley T., Belda-Ferre P., Nagler C.R. What's LPS got to do with it? A role for gut LPS variants in driving autoimmune and allergic disease. *Cell Host Microbe*, 2016, Vol. 19, no. 5, pp. 572-574.
16. Frangogiannis N. Transforming growth factor- β in tissue fibrosis. *J. Exp. Med.*, 2020, Vol. 217, no. 3, e20190103. doi: 10.1084/jem.20190103.
17. Gomes J.M.G., Costa J.A., Alfenas R.C.G. Metabolic endotoxemia and diabetes mellitus: A systematic review. *Metabolism*, 2017, Vol. 68, pp. 133-144.
18. Gordin D., Harjutsalo V., Tinsley L., Fickweiler W., Sun J.K., Forsblom C., Amenta P.S., Pober D., d'Eon S., Khatri M., Stillman I.E., Groop P.H., Keenan H.A., King G.L. Differential association of microvascular attributions with cardiovascular disease in patients with long duration of type 1 diabetes. *Diabetes Care*, 2018, Vol. 41, no. 4, pp. 815-822.
19. Groop P.H., Thomas M.C., Moran J.L., Wadèn J., Thorn L.M., Mäkinen V.P., Rosengård-Bärlund M., Saraheimo M., Hietala K., Heikkilä O., Forsblom C., FinnDiane Study Group. The presence and severity of chronic kidney disease predicts all-cause mortality in type 1 diabetes. *Diabetes*, 2009, Vol. 58, no. 7, pp. 1651-1658.
20. Groschwitz K.R., Hogan S.P. Intestinal barrier function: molecular regulation and disease pathogenesis. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2009, Vol. 124, pp. 3-20.
21. Grotendorst G.R., Smale G., Pencev D. Production of transforming growth factor beta by human peripheral blood monocytes and neutrophils. *J. Cell. Physiol.*, 1989, Vol. 140, no. 2, pp. 396-402.
22. Grylls A., Seidler K., Neil J. Link between microbiota and hypertension: Focus on LPS/TLR4 pathway in endothelial dysfunction and vascular inflammation, and therapeutic implication of probiotics. *Biomed. Pharmacother.*, 2021, Vol. 137, 111334. doi: 10.1016/j.biopha.2021.111334.
23. Gubern C., López-Bermejo A., Biarnés J., Vendrell J., Ricart W., Fernández-Real J.M. Natural antibiotics and insulin sensitivity: the role of bactericidal/permeability-increasing protein. *Diabetes*, 2006, Vol. 55, no. 1, pp. 216-224.
24. He Y., Ou Z., Chen X., Zu X., Liu L., Li Y., Cao Z., Chen M., Chen Z., Chen H., Qi L., Wang L. LPS/TLR4 signaling enhances TGF- β Response Through Downregulating BAMBI During Prostatic Hyperplasia. *Sci. Rep.*, 2016, Vol. 31, no. 6, 27051. doi: 10.1038/srep27051.
25. Heo S.K., Yun H.J., Noh E.K., Park W.H., Park S.D. LPS induces inflammatory responses in human aortic vascular smooth muscle cells via Toll-like receptor 4 expression and nitric oxide production. *Immunol. Lett.*, 2008, Vol. 120, no. 1-2, pp. 57-64.
26. Hippenstiel S., Soeth S., Kellas B., Fuhrmann O., Seybold J., Krüll M., Eichel-Streiber C., Goebeler M., Ludwig S., Suttorp N. Rho proteins and the p38-MAPK pathway are important mediators for LPS-induced interleukin-8 expression in human endothelial cells. *Blood*, 2000, Vol. 95, no. 10, pp. 3044-3051.
27. Htay T., Soe K., Lopez-Perez A., Doan A.H., Romagosa M.A., Aung K. Mortality and cardiovascular disease in type 1 and type 2 diabetes. *Curr. Cardiol. Rep.*, 2019, Vol. 21, no. 6, 45. doi: 10.1007/s11886-019-1133-9.
28. Jin M., Sun C.Y., Zang B.X. Hydroxysafflor yellow A attenuate lipopolysaccharide-induced endothelium inflammatory injury. *Chin. J. Integr. Med.*, 2016, Vol. 22, no. 1, pp. 36-41.
29. Ju H., Behm D.J., Nerurkar S., Eybye M.E., Haimbach R.E., Olzinski A.R., Douglas S.A., Willette R.N. p38 MAPK inhibitors ameliorate target organ damage in hypertension: Part 1. p38 MAPK-dependent endothelial dysfunction and hypertension. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 2003, Vol. 307, no. 3, pp. 932-938.
30. Kelly A., Houston S.A., Sherwood E., Casulli J., Travis M.A. Regulation of innate and adaptive immunity by TGF β . *Adv. Immunol.*, 2017, Vol. 134, pp. 137-233.
31. Khalil M.M., Ali H.A., Al-Hilo M.A.H. Role of Zonulin level as new metabolic biomarker in diabetes mellitus patients and associated complications. *AIP Conference Proceedings*, 2022, Vol. 2386, 030013. doi: 10.1063/5.0066876.
32. Kim E.Y., Kim B.C. Lipopolysaccharide inhibits transforming growth factor-beta1-stimulated Smad6 expression by inducing phosphorylation of the linker region of Smad3 through a TLR4-IRAK1-ERK1/2 pathway. *FEBS Lett.*, 2011, Vol. 585, no. 5, pp. 779-785.

33. Lassenius M.I., Pietiläinen K.H., Kaartinen K., Pussinen P.J., Syrjänen J., Forsblom C., Pörsti I., Rissanen A., Kaprio J., Mustonen J., Groop P.H., Lehto M., FinnDiane Study Group. Bacterial endotoxin activity in human serum is associated with dyslipidemia, insulin resistance, obesity, and chronic inflammation. *Diabetes Care*, 2011, Vol. 34, no. 8, pp. 1809-1815.
34. Li X.Y., He J.L., Liu H.T., Li W.M., Yu C. Tetramethylpyrazine suppresses interleukin-8 expression in LPS-stimulated human umbilical vein endothelial cell by blocking ERK, p38 and nuclear factor-kappaB signaling pathways. *J. Ethnopharmacol.*, 2009, Vol. 125, no. 1, pp. 83-89.
35. Liang C.F., Liu J.T., Wang Y., Xu A., Vanhoutte P.M. Toll-like receptor 4 mutation protects obese mice against endothelial dysfunction by decreasing NADPH oxidase isoforms 1 and 4. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 2013, Vol. 33, no. 4, pp. 777-784.
36. Lind M., Svensson A.M., Kosiborod M., Gudbjörnsdóttir S., Pivodic A., Wedel H., Dahlqvist S., Clements M., Rosengren A. Glycemic control and excess mortality in type 1 diabetes. *N. Engl. J. Med.*, 2014, Vol. 371, no. 21, pp. 1972-1982.
37. Liu H.T., Li W.M., Li X.Y., Xu Q.S., Liu Q.S., Bai X.F., Yu C., Du Y.G. Chitosan oligosaccharides inhibit the expression of interleukin-6 in lipopolysaccharide-induced human umbilical vein endothelial cells through p38 and ERK1/2 protein kinases. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.*, 2010, Vol. 106, no. 5, pp. 362-371.
38. Liu X., Lu L., Yao P., Ma Y., Wang F., Jin Q., Ye X., Li H., Hu F.B., Sun L., Lin X. Lipopolysaccharide binding protein, obesity status and incidence of metabolic syndrome: a prospective study among middle-aged and older Chinese. *Diabetologia*, 2014, Vol. 57, no. 9, pp. 1834-1841.
39. Ma J., Li H. The role of gut microbiota in atherosclerosis and hypertension. *Front. Pharmacol.*, 2018, Vol. 9, 1082. doi: 10.3389/fphar.2018.01082.
40. Mahmoodpoor F., Rahbar Saadat Y., Barzegari A., Ardalan M., Zununi Vahed S. The impact of gut microbiota on kidney function and pathogenesis. *Biomed. Pharmacother.*, 2017, Vol. 93, pp. 412-419.
41. Meng X.M., Nikolic-Paterson D.J., Lan H.Y. TGF- β : the master regulator of fibrosis. *Nat. Rev. Nephrol.*, 2016, Vol. 12, no. 6, pp. 325-338.
42. Mitchell K., Shah J.P., Tsytsikova L.V., Campbell A.M., Affram K., Symes A.J. LPS antagonism of TGF- β signaling results in prolonged survival and activation of rat primary microglia. *J. Neurochem.*, 2014, Vol. 129, no. 1, pp. 155-168.
43. Mønsted M.Ø., Falck N.D., Pedersen K., Buschard K., Holm L.J., Haupt-Jørgensen M. Intestinal permeability in type 1 diabetes: An updated comprehensive overview. *J. Autoimmun.*, 2021, Vol. 122, 102674. doi: 10.1016/j.jaut.2021.102674.
44. Musso G., Gambino R., Cassader M. Interactions between gut microbiota and host metabolism predisposing to obesity and diabetes. *Annu Rev. Med.*, 2011, Vol. 62, pp. 361-380.
45. Okorokov P.L., Anikhovskaia I.A., Volkov I.E., Iakovlev M.Iu. Intestinal endotoxin in induction of type 1 diabetes. *Fiziol. Cheloveka*, 2011, Vol. 37, no. 2, pp. 138-141. (In Russ.)
46. Petrie D., Lung T.W., Rawshani A., Palmer A.J., Svensson A.M., Eliasson B., Clarke P. Recent trends in life expectancy for people with type 1 diabetes in Sweden. *Diabetologia*, 2016, Vol. 59, no. 6, pp. 1167-1176.
47. Raetz C.R., Whitfield C. Lipopolysaccharide endotoxins. *Annu Rev. Biochem.*, 2002, Vol. 71, pp. 635-700.
48. Rawshani A., Rawshani A., Franzén S., Eliasson B., Svensson A.M., Miftaraj M., McGuire D.K., Sattar N., Rosengren A., Gudbjörnsdóttir S. Range of Risk Factor Levels: Control, Mortality, and Cardiovascular Outcomes in Type 1 Diabetes Mellitus. *Circulation*, 2017, Vol. 135, no. 16, pp. 1522-1531.
49. Sapone A., de Magistris L., Pietzak M., Clemente M.G., Tripathi A., Cucca F., Lampis R., Kryszak D., Carteni M., Generoso M., Iafusco D., Prisco F., Laghi F., Riegler G., Carratu R., Counts D., Fasano A. Zonulin upregulation is associated with increased gut permeability in subjects with type 1 diabetes and their relatives. *Diabetes*, 2006, Vol. 55, no. 5, pp. 1443-1449.
50. Shi Y., Massagué J. Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell*, 2003, Vol. 113, no. 6, pp. 685-700.
51. Sirin F.B., Korkmaz H., Torus B., Bozkurt M., Kumbul D.D. The role of zonulin in the pathogenesis of diabetic retinopathy. *Turk. J. Biochem.*, 2021, Vol. 46, no. 3, pp. 317-322.
52. Soedamah-Muthu S.S., Vergouwe Y., Costacou T., Miller R.G., Zgibor J., Chaturvedi N., Snell-Bergeon J.K., Maahs D.M., Rewers M., Forsblom C., Harjutsalo V., Groop P.H., Fuller J.H., Moons K.G., Orchard T.J. Predicting major outcomes in type 1 diabetes: a model development and validation study. *Diabetologia*, 2014, Vol. 57, no. 11, pp. 2304-2314.
53. Sun L., Xiu M., Wang S., Brigstock D.R., Li H., Qu L., Gao R. Lipopolysaccharide enhances TGF- β 1 signalling pathway and rat pancreatic fibrosis. *J. Cell. Mol. Med.*, 2018, Vol. 22, no. 4, pp. 2346-2356.
54. Tang W.H.W., Li D.Y., Hazen S.L. Dietary metabolism, the gut microbiome, and heart failure. *Nat. Rev. Cardiol.*, 2019, Vol. 16, no. 3, pp. 137-154.
55. Toral M., Romero M., Jiménez R., Robles-Vera I., Tamargo J., Martínez M.C., Pérez-Vizcaino F., Duarte J. Role of UCP2 in the protective effects of PPAR β/δ activation on lipopolysaccharide-induced endothelial dysfunction. *Biochem. Pharmacol.*, 2016, Vol. 110-111, pp. 25-36.
56. van Hecke M.V., Dekker J.M., Stehouwer C.D., Polak B.C., Fuller J.H., Sjolie A.K., Kofinis A., Rottiers R., Porta M., Chaturvedi N., EURODIAB prospective complications study. Diabetic retinopathy is associated with

mortality and cardiovascular disease incidence: the EURODIAB prospective complications study. *Diabetes Care*, 2005, Vol. 28, no. 6, pp. 1383-1389.

57. Vatanen T., Kostic A.D., d'Hennezel E., Siljander H., Franzosa E.A., Yassour M., Kolde R., Vlamakis H., Arthur T.D., Hämmäläinen A.M., Peet A., Tillmann V., Uibo R., Mokurov S., Dorshakova N., Ilonen J., Virtanen S.M., Szabo S.J., Porter J.A., Lähdesmäki H., Huttenhower C., Gevers D., Cullen T.W., Knip M., DIABIMMUNE Study Group, Xavier R.J. Variation in microbiome LPS immunogenicity contributes to autoimmunity in humans. *Cell*, 2016, Vol. 165, no. 4, pp. 842-853.

58. Vistisen D., Andersen G.S., Hansen C.S., Hulman A., Henriksen J.E., Bech-Nielsen H., Jørgensen M.E. Prediction of First Cardiovascular Disease Event in Type 1 Diabetes Mellitus: The Steno Type 1 Risk Engine. *Circulation*, 2016, Vol. 133, no. 11, pp. 1058-1066.

59. Wang Y., Zhang M.X., Meng X., Liu F.Q., Yu G.S., Zhang C., Sun T., Wang X.P., Li L., Wang Y.Y., Ding S.F., Yang J.M., Zhang Y. Atorvastatin suppresses LPS-induced rapid upregulation of Toll-like receptor 4 and its signaling pathway in endothelial cells. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 2011, Vol. 300, no. 5, pp. H1743-H1752.

60. Wood H.L.K., deBoer M.D., Fasano A. Zonulin as a potential putative biomarker of risk for shared type 1 diabetes and celiac disease autoimmunity. *Diabetes Metab. Res. Rev.*, 2020, Vol. 36, no. 5, e3309. doi: 10.1002/dmrr.3309.

61. Yan W., Zhao K., Jiang Y., Huang Q., Wang J., Kan W., Wang S. Role of p38 MAPK in ICAM-1 expression of vascular endothelial cells induced by lipopolysaccharide. *Shock*, 2002, Vol. 17, no. 5, pp. 433-438.

62. Zhao W., Li C., Gao H., Wu Q., Shi J., Chen X. Dihydrotanshinone I attenuates atherosclerosis in apoe-deficient mice: Role of NOX4/NF-κB mediated lectin-like oxidized LDL receptor-1 (LOX-1) of the endothelium. *Front. Pharmacol.*, 2016, Vol. 7, 418. doi: 10.3389/fphar.2016.00418.

63. Zhao W., Ma G., Chen X. Lipopolysaccharide induced LOX-1 expression via TLR4/MyD88/ROS activated p38MAPK-NF-κB pathway. *Vascul. Pharmacol.*, 2014, Vol. 63, no. 3, pp. 162-172.

Авторы:

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

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

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

Authors:

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

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

Ulyanova D.I., Student, Department of Internal Medicine No. 2, S. Georgievsky Medical Academy, V. Vernadsky Crimean Federal University, Simferopol, Republic of Crimea, Russian Federation

Поступила 27.04.2023
Отправлена на доработку 27.04.2023
Принята к печати 04.10.2023

Received 27.04.2023
Revision received 27.04.2023
Accepted 04.10.2023

ЛИГАНДЫ И НОСИТЕЛИ ДЛЯ УЛУЧШЕНИЯ ИММУННОЙ АКТИВНОСТИ: МЕХАНИЗМЫ ДЕЙСТВИЯ И ПЕРСПЕКТИВЫ ПРИМЕНЕНИЯ В МЕДИЦИНЕ И БИОТЕХНОЛОГИИ

Гогина С.С.^{1,2,3}, Стойнова А.М.¹

¹ ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы», Москва, Россия

² АО БТК «Биосервис», Москва, Россия

³ ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова», Москва, Россия

Резюме. Статья посвящена обзору исследований, посвященных роли антител, цитокинов, белков комплемента, молекул основного комплекса гистосовместимости (МНС) и Toll-подобных рецепторов (TLRs) в иммунном ответе, а также их потенциала как мишеней для иммунотерапии. В настоящем обзоре рассматривается влияние различных носителей на иммунную активность белков, с особым акцентом на роли носителей в разработке методов лечения заболеваний, включая онкологические, аутоиммунные и инфекционные. Результаты исследований подчеркивают важность понимания молекулярных механизмов иммунного ответа и роли различных компонентов иммунной системы.

Антитела, как ключевые компоненты адаптивного иммунитета, играют важную роль в нейтрализации патогенов и могут быть использованы в качестве целей для иммунотерапии. Цитокины и белки комплемента выполняют множество функций, включая активацию иммунных клеток, противовирусную активность и регуляцию воспалительных процессов. МНС-молекулы осуществляют презентацию антигенов и активацию адаптивного иммунитета. TLRs, в свою очередь, распознают патоген-ассоциированные молекулярные паттерны и инициируют иммунный ответ. Исследования также показали потенциал использования носителей на основе липидов, белков, углеводов и нуклеиновых кислот для усиления иммунной активности белков.

В обзоре обсуждается использование носителей для улучшения иммунной активности белков, что может быть полезно для создания новых вакцин и других терапевтических препаратов. В последние годы наблюдается растущий интерес к разработке методов лечения на основе белковых молекул, включая моноклональные антитела, цитокины и другие. Данные методы перспективны для лечения целого ряда заболеваний, но на их эффективность влияет выбор молекулы-носителя. Конъюгация белков с другими молекулами, например, наночастицами или липосомами, может повысить стабильность, специфичность и эффективность. Присутствие носителей на поверхности опухолевых клеток способно стимулировать противоопухолевый иммунный ответ. Однако все еще существуют проблемы, требующие решения при разработке методов лечения на основе носителей. Одной из них является потенциальная иммуногенность, индуцируемая носителем, которая может вызвать нежелательный иммунный ответ и ограничить эффективность терапии. Кроме того, сложный выбор подходящего

Адрес для переписки:

Гогина Софья Сергеевна
ФГБНУ «Научно-исследовательский институт
вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова»
105064, Россия, Москва, Малый Казенный пер., 5а.
Тел.: 8 (925) 148-61-77.
E-mail: fominasofya@yandex.ru

Address for correspondence:

Sofia S. Gogina
I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera
5a Mal' Kazenny Ln
Moscow
105064 Russian Federation
Phone: +7 (925) 148-61-77.
E-mail: fominasofya@yandex.ru

Образец цитирования:

С.С. Гогина, А.М. Стойнова «Лиганды и носители для улучшения иммунной активности: механизмы действия и перспективы применения в медицине и биотехнологии» // Медицинская иммунология, 2024. Т. 26, № 6. С. 1149-1162.
doi: 10.15789/1563-0625-LAC-2894

© Гогина С.С., Стойнова А.М., 2024
Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

S.S. Gogina, A.M. Stoinova "Ligands and carriers for enhancing immune activity: Mechanisms of action and prospects for applications in medicine and biotechnology", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2024, Vol. 26, no. 6, pp. 1149-1162.
doi: 10.15789/1563-0625-LAC-2894

© Gogina S.S., Stoinova A.M., 2024
The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License
DOI: 10.15789/1563-0625-LAC-2894

белка-носителя для конкретного терапевтического применения требует дальнейших исследований механизмов, лежащих в основе функции белка-носителя и активации иммунитета.

Авторами проведен анализ научной литературы, в результате чего установлено, что использование носителей и лигандов представляет собой перспективный подход для улучшения иммунной активности белков и разработки новых стратегий вакцинации и иммунотерапии.

Ключевые слова: Toll-подобные рецепторы, антитела, белки комплемента, белки-носители, вирусоподобные частицы, иммунная активность, липосомы, молекулы основного комплекса гистосовместимости, наночастицы, полиэтиленгликоль, цитокины

LIGANDS AND CARRIERS FOR ENHANCING IMMUNE ACTIVITY: MECHANISMS OF ACTION AND PROSPECTS FOR APPLICATIONS IN MEDICINE AND BIOTECHNOLOGY

Gogina S.S.^{a, b, c}, Stoinova A.M.^a

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

^b Biotechnology Company Limited "Bioservice", Moscow, Russian Federation

^c I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation

Abstract. This article provides a comprehensive overview of research focusing on the role of antibodies, cytokines, complement proteins, major histocompatibility complex (MHC) molecules, and Toll-like receptors (TLRs) in the immune response and their potential as targets for immunotherapy. The review specifically examines the influence of various carriers on the immune activity of proteins, with a particular emphasis on the role of carriers in developing therapeutic approaches for diseases including cancer, autoimmune disorders, and infections. The findings highlight the importance of understanding the molecular mechanisms underlying the immune response and the role of different components of the immune system.

Antibodies, as key components of adaptive immunity, play a crucial role in pathogen neutralization and can be utilized as targets for immunotherapy. Cytokines and complement proteins serve multiple functions, including immune cell activation, antiviral activity, and regulation of inflammatory processes. MHC molecules facilitate antigen presentation and activation of adaptive immunity. TLRs recognize pathogen-associated molecular patterns and initiate the immune response. Current research has also demonstrated the potential of lipid-based carriers, proteins, carbohydrates, and nucleic acids for enhancing the immune activity of proteins.

The review discusses the use of carriers to improve the immune activity of proteins, which can be valuable for developing new vaccines and therapeutic agents. In recent years, there has been increasing interest in protein-based therapeutic approaches, including monoclonal antibodies, cytokines, and others. The efficacy of these methods is influenced by the choice of carrier molecule. Conjugation of proteins with other molecules such as nanoparticles or liposomes can enhance stability, specificity, and efficacy. The presence of carriers on the surface of tumor cells can stimulate anti-tumor immune responses. However, challenges remain in the development of carrier-based therapies including potential carrier-induced immunogenicity, which may trigger undesired immune responses and limit therapeutic efficacy. Additionally, the complex selection of appropriate protein carriers for specific therapeutic applications requires further investigation into the underlying mechanisms of carrier function and immune activation.

As based on the analysis of scientific literature, this review establishes that the use of carriers and ligands represents a promising approach for enhancing protein immune activity and developing new vaccination and immunotherapy strategies.

Keywords: Toll-like receptors, antibodies, complement factors, carrier proteins, virus-like particles, immune activity, liposomes, MHC molecules, nanoparticles, polyethylene glycol, cytokines

Введение

Иммунная система — функционально взаимосвязанный комплекс органов, тканей, клеток, специфических белков и регуляторных ком-

понентов, обеспечивающий сохранение антигенного постоянства организма и защиту от чужеродных агентов и измененных собственных макромолекул [1]. Одним из ключевых механизмов проявления иммунной активности белков

является их участие в связывании чужеродных антигенов (АГ), распознавании и презентации клеткам иммунной системы. На эффективность данной активности значительное влияние оказывает выбор молекулы-носителя. В данном случае под «носителем», подразумевается молекула, которая связывается с иммуноактивным белком и транспортирует его по организму. Такие белки-носители участвуют в распознавании чужеродных агентов и их презентации, передаче сигналов другим иммунным клеткам и непосредственном уничтожении патогенов. Изучение и оценка влияния носителей на иммунную активность имеют решающее значение для разработки эффективных методов лечения целого ряда заболеваний, включая онкологические, аутоиммунные и инфекционные.

Основным представителем иммуноактивных белковых носителей являются антитела (АТ), синтезируемые плазмócитами или (активированными В-лимфоцитами) в ответ на чужеродные АГ. Также к белковым носителям можно отнести цитокины, являющиеся сигнальными молекулами в иммунной системе. Белки комплемента функционируют комплексно, уничтожая вторгающиеся патогены, что делает их важным компонентом борьбы организма человека с инфекционными заболеваниями. Молекулы основного комплекса гистосовместимости (МНС) и Toll-подобные рецепторы (TLRs) играют решающую роль в представлении АГ Т-лимфоцитам и распознавании специфических паттернов патогенов.

В данном обзоре обсуждается влияние различных типов носителей на иммунную активность белков и механизмы их действия. Рассмотрены современные исследования иммунной активности белковых носителей и их терапевтический потенциал.

Антитела

АТ, иммуноглобулины (Ig), представляют собой белки, продуцируемые плазматическими клетками (конечный этап дифференцировки В-лимфоцитов), относящиеся к γ -глобулиновой фракции белков крови и являющиеся продуктами специфического ответа [1]. Они специфически распознают комплементарные АГ с образованием комплекса «АГ-АТ», что приводит к их нейтрализации или элиминации.

Одновременно АТ можно отнести к особому типу белка-носителя, который играет важную роль в реакции иммунной системы на вторгающиеся патогены. Современные исследования [4] посвящены разработке рекомбинантных АТ, способных воздействовать на онкоклетки с высокой специфичностью и эффективностью. Некоторые функциональные ограничения МАТ (англ. *monoclonal antibodies*, mAbs) привели к разработке различных рекомбинантных АТ, включая биспецифические АТ, конъюгаты «антитело-лекар-

ственное средство» и Т-клетки с химерным рецептором АГ (англ. *chimeric antigen receptor*, CAR). В последние годы уделяется большое внимание разработке биспецифических АТ, способных одновременно связываться с двумя различными АГ [4, 5, 6, 7, 70]. Это позволяет целенаправленно уничтожать онкоклетки, сводя к минимуму повреждение здоровых. «Блинатумомаб» и «Катумаксомаб» являются примерами одобренных к применению лекарственных препаратов на основе биспецифических АТ [8].

«Блинатумомаб» (англ. *Blinatumomab*) — это биспецифическое АТ, которое связывается как с CD19, маркером В-клеток, так и с CD3, маркер Т-клеток. Связываясь одновременно с Т- и В-лимфоцитами, препарат обеспечивает элиминацию CD19-экспрессирующих В-клеток. Показано, что этот механизм действия эффективен при лечении В-клеточного острого лимфобластного лейкоза, причем клинические исследования продемонстрировали высокую частоту минимального остаточного ответа у детей и взрослых [9].

«Катумаксомаб» (англ. *Removab*) — это биспецифическое АТ, комплементарное как CD3 на Т-клетках, так и ЕpCAM (англ. *Epithelial cell adhesion molecule*, молекула адгезии эпителиальных клеток), экспрессируемому на различных онкоклетках рецептора АГ. «Катумаксомаб» активирует Т-клетки с последующим разрушением ЕpCAM-экспрессирующих клеток. Препарат одобрен для лечения злокачественного асцита — состояния, при котором скопление раковых клеток в брюшной полости вызывает накопление жидкости. Клинические исследования показали, что лечение «Катумаксомабом» способствует уменьшению объема асцитной жидкости и улучшению качества жизни пациентов [80].

Интересным направлением является изучение различных стратегий усиления эффекторной функции Fc-фрагмента рекомбинантных АТ [11], где показано, что использование подобных АТ значительно повышает клиническую эффективность. Установлено [12], что удаление фукозы из Fc-домена АТ значительно повышает его антителозависимую клеточную цитотоксичность — ADCC (англ. *antibody-dependent cellular cytotoxicity*, ADCC) *in vitro* и *in vivo*. Терапевтические АТ против CD20 В-клеток в составе «Ритуксимаб» (англ. *Rituximab*) и АТ против HER2 (англ. *human epidermal growth factor receptor 2*, рецептор эпидермального фактора роста человека 2-го типа), в составе «Трастузумаб» (англ. *Trastuzumab*), с дефукозилированными Fc-доменами проявляют повышенную ADCC [13, 42].

Для усиления терапевтического потенциала АТ исследователи сосредоточились на модификации Fc-фрагмента АТ путем введения специфических аминокислотных остатков, таких как N297Q, S239D/I332E и L234A/L235A [16, 39].

Данные модификации повышают сродство Fc-фрагмента к Fc-рецепторам, усиливая тем самым эффекторные функции.

Модификация N297Q включает удаление сайта гликозилирования на Fc-фрагменте, что увеличивает аффинность его связывания с гамма-рецептором FcγRIIIa (англ. Fc gamma receptors) на естественных киллерах и усиливает ADCC. Модификация S239D/I332E повышает сродство Fc-фрагмента к неонатальному Fc-рецептору (англ. *neonatal FcR*, FcRn), увеличивая тем самым период полураспада АТ в крови. Модификация L234A/L235A снижает сродство Fc-фрагмента к первому компоненту системы комплемента (англ. *the first component of complement*, C1q), что снижает комплемент-зависимую цитотоксичность (англ. *complement dependent cytotoxicity*, CDC) и увеличивает период полувыведения из организма.

В нескольких исследованиях сообщалось об успешном применении этих модификаций Fc-фрагмента для усиления терапевтического потенциала АТ. Например, «Обинутумаб» (англ. *Obinutuzumab*) включает АТ против CD20, содержащие модификацию N297Q для усиления ADCC при лечении неходжкинской лимфомы (НХЛ) [19, 39]. Препарат для лечения множественной миеломы — «Даратумаб» (англ. *Daratumumab*) содержит АТ против CD38 с модификацией S239D/I332E, что увеличивает период их полувыведения из сыворотки [11].

Другая область исследований включает использование конъюгатов антитела-лекарственное средство (англ. *antibody-drug conjugates*, ADCs), состоящих из МАТ «сшитых» через химический линкер с противоопухолевыми цитотоксическими лекарственными молекулами [9, 19]. Такой подход позволяет использовать АТ для доставки лекарств непосредственно к раковым клеткам. Основными цитотоксическими препаратами, используемых для разработки ADCs, являются «Доксорубин» (англ. *Doxorubicin*), «Калихеамицин» (англ. *Calicheamicin*), «Ауристин Е» (англ. *Auristatin E*) и «Майтанзиноид» (англ. *Maytansinoid*) [20]. Выбор препарата зависит от таких факторов, как его эффективность против клеток-мишеней, токсичность для здоровых клеток и стабильность используемого линкера. Применение химического линкера обеспечивает контролируемое высвобождение молекул цитотоксического препарата, сводя к минимуму системную токсичность. Одним из типов линкеров, используемых в ADCs, является cross-linker, образующий ковалентную связь между МАТ и цитотоксической молекулой. Это гарантирует, что лекарственное средство остается присоединенной к МАТ до проникновения в опухолевую клетку, где оно высвобождается и оказывает цитотоксическое действие. АТ специфичны к рецепторам АГ на онкоклетках, а цитотоксиче-

ский препарат их разрушает. На сегодняшний день пять таких конъюгатов одобрены к применению, а более 100 находятся в стадии разработки: «Адцетрис / Adcetris» (действующее вещество брентуксимаб ведотин, которое нацелено на CD30); «Кадсила / Kadcyla» (трастузумаб эмтансин — HER2), «Полайви / Polivy» (полатузумаб ведотин — CD79b); «Энхерту / Enhertu» (трастузумаб дерукстекан — HER2), «Тродельви / Trudelvy» (сацитузумаб говитекан — трансмембранный рецептор Trop-2 (англ. *Trophoblast cell surface antigen 2*) [14, 20].

Показана возможность применения АТ для лечения COVID-19 [24, 30, 44]. Доказана эффективность МАТ в снижении тяжести заболевания у пациентов из групп высокого риска, и несколько фармацевтических компаний разработали методы лечения COVID-19 на их основе. Препарат «Касиривимаб-имдевимаб» (REGENCOV) компании Regeneron, представляет собой комбинацию двух МАТ против спайкового белка (S-белок) вируса SARS-CoV-2 [25, 47, 48]. Его применение снижает уровень смертности пациентов с COVID-19 из группы высокого риска. GlaxoSmithKline и Vir Biotechnology разработали АТ под названием «Сотровимаб» против спайкового белка SARS-CoV-2 [25, 47, 48]. В дополнение к COVID-19 изучаются возможности использования АТ для лечения других вирусных инфекций, включая грипп [71, 72], вируса Эбола [46] и ВИЧ [43].

Разработаны АТ [32], специфичные к поверхностному белку клеток миеломы — «В-клеточный антиген созревания» (англ. *B cell maturation antigen*, BCMA). При множественной миеломе данные АТ связываются с BCMA и запускают каскад иммунных реакций, приводящих к разрушению онкоклеток. АТ «Белантамаб мафодотин / Belantamab mafodotin» продемонстрировали клиническую активность у пациентов с рецидивирующей или рефрактерной множественной миеломой [33].

При разработке терапевтических средств на основе АТ уделяется большое внимание сохранению их стабильности и эффективности на длительный срок. Изучают новые подходы к повышению стабильности АТ с использованием малых молекул, которые могут стабилизировать структуру АТ и предотвращать дегидратацию или агрегацию. Перспективными стабилизаторами являются сахара, аминокислоты и полиолы, такие как трегалоза, сахароза, глицин и маннит [73].

Потенциальные области применения, связанные с использованием АТ в качестве носителей иммунной активности — огромны, исследования продолжаются, так как универсальность и специфичность АТ делают их ценным инструментом для разработки новых методов лечения и диагностики широкого спектра заболеваний.

Цитокины

Цитокины — регуляторные вещества, белковые или полипептидные продукты активированных клеток иммунной системы, обеспечивающие взаимосвязь клеток в динамике иммунного ответа, гемопоэзе и при развитии воспаления [1]. Они помогают координировать иммунные реакции, активируют другие клетки для выполнения определенных функций, участвуют в регуляции иммунного ответа, включая противовирусный, противоопухолевый и противовоспалительный.

Цитокины вырабатываются в ответ на различные раздражители, включая инфекцию, травму и воздействие токсинов. Они действуют локально или системно, связываясь со специфическими рецепторами на клетках-мишенях и инициируя сигнальный каскад, приводящий в конечном итоге к изменениям в экспрессии генов и функционировании клеток.

Существуют различные типы цитокинов: интерлейкины (англ. *interleukin*, IL), интерфероны (англ. *interferon*, IFN), фактор некроза опухоли (англ. *tumor necrosis factor*, TNF) и хемокины [1, 35]. Каждый из них играет определенную роль в регуляции различных аспектов иммунного ответа. Например, интерлейкин-1 (IL-1) участвует в воспалении и лихорадке, в то время как интерферон-гамма (IFN γ) важен для активации иммунных клеток для борьбы с инфекциями, а IFN α применяется для лечения хронического вирусного гепатита С (ХВГС) и злокачественных опухолей. При лечении ХВГС IFN α вводят пациентам подкожно или внутримышечно в комбинации с противовирусными препаратами прямого действия DAAs (англ. *direct-acting antiviral drugs*) («Софосбувир», «Ледипасвир», «Даклатасвир») [37, 38] и другими противовирусными препаратами, такими как «Рибавирин» [36]. Лечение направлено на подавление репликации вируса, улучшение функции печени и предотвращение повреждения печени и цирроза. DAA_s нацелены на специфические белки, участвующие в репликации вируса гепатита С, в то время как IFN α стимулирует противовирусные функции иммунной системы. Использование таких схем лечения в большинстве случаев приводит к эффективному иммунному ответу независимо от анамнеза лечения пациента, генотипа вируса, наличия или отсутствия коинфекций и стадии заболевания [37]. При лечении онкологии IFN α используется в качестве модификатора биологического ответа для усиления способности иммунной системы распознавать и уничтожать онкоклетки [39, 40]. Обычно его вводят в высоких дозах путем внутривенной инфузии или подкожной инъекции, либо отдельно, либо в комбинации с химиотерапией, лучевой терапией или другими иммуномодулирующими средствами.

Цитокины могут использоваться в качестве носителей для доставки иммуноактивных белков. Цитокин IL-2 может быть связан с другими белками, такими как АТ и их фрагменты, факторы роста, для создания слитых белков с улучшенными фармакокинетическими свойствами или повышенной терапевтической активностью. «Пролейкин/Proleukin (Альдеслейкин)» представляет собой рекомбинантный человеческий белок IL-2, конъюгированный с полиэтиленгликолем для увеличения периода его полураспада в организме и периода полувыведения [78].

Цитокины также участвуют в развитии многих заболеваний, включая аутоиммунные расстройства, инфекционные и онкологические заболевания. Чрезмерная выработка цитокинов может привести к состоянию, известному как цитокиновый шторм (ЦШ), который может вызвать сильное воспаление и повреждение органов [42]. Цитокины, участвующие в ЦШ при COVID-19, включают IL-6, TNF α и IFN γ [43]. В настоящее время лечение ЦШ при COVID-19 основано на иммуносупрессивной терапии, включающей применение кортикостероидов, МАТ против цитокинов, например, против IL-6 [24, 44].

Цитокины могут играть определенную роль во взаимодействии между иммунной системой и микробиомом кишечника. Вырабатываемые иммунными клетками в кишечнике цитокины могут влиять на состав и активность микробиома, и наоборот, микробиом может влиять на их синтез и функции. Микробиота кишечника может вырабатывать цитокины, такие как IL-10, обладающие противовоспалительным действием и защищающие от развития хронических воспалительных заболеваний [46, 47]. С другой стороны, дисбактериоз кишечника может привести к выработке провоспалительных цитокинов, таких как TNF α , IL-1 β и IL-6, способствующих развитию хронического воспаления [48, 49].

Использование цитокинов в качестве носителей иммунной активности белков (таких как IL-2, IL-12 и гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (англ. *Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor*, GM-CSF)) имеет несколько преимуществ. Цитокины имеют специфическую способность связываться с определенными рецепторами на клетках, что может обеспечить более точную доставку иммунной активности. Также они имеют короткий период полувыведения, что снижает риск длительной активации и потенциальных побочных эффектов. Цитокины активируют иммунные клетки и стимулируют их пролиферацию и дифференцировку, усиливая иммунный ответ. Они могут усиливать иммунный ответ в месте доставки, так как являются сигнальными молекулами, привлекающими иммунные клетки к месту действия и активирующими их.

Соединение белков с цитокинами является довольно проблематичным из-за потенциальной потери биологической активности, стабильности и растворимости. Для преодоления этих проблем было разработано несколько стратегий, позволяющих эффективно комбинировать их. Один из подходов заключается в использовании методов генной инженерии для получения слитых белков, которые состоят из целевого белка и цитокина. Гены, кодирующие белок и цитокин, соединяют вместе и экспрессируют в клетке, в результате образуется слитый белок, сохраняющий биологическую активность компонентов. Другой подход заключается в химическом конъюгировании интересующего белка с цитокином с использованием стабильной молекулы-линкера. Этот метод включает ковалентное связывание двух белков с образованием стабильного комплекса, поддерживающего биологическую активность компонентов. Кроме того, специфическое связывание цитокинов с их рецепторами также повышает биологическую активность таких комплексов. Это может быть достигнуто путем присоединения к целевому компоненту АТ или лиганда, цитокина, связывающегося со специфическим рецептором [21]. В целом использование методов генной инженерии, химической конъюгации и подходов к адресной доставке способно обеспечить эффективную комбинацию белков с цитокинами при сохранении их биологической активности, стабильности и растворимости.

Ряд исследований посвящен разработке новых ингибиторов цитокинов, более специфичных и эффективных, с меньшим количеством побочных эффектов, по сравнению с существующими препаратами. Ингибиторы цитокинов — это лекарственные средства, блокирующие активность ряда цитокинов в организме. Их используют для лечения различных заболеваний, включая аутоиммунные расстройства, такие как ревматоидный артрит и псориаз [53].

Таким образом, использование цитокинов в качестве носителей для доставки иммуоактивных белков может быть эффективным подходом к лечению различных заболеваний.

Белки комплемента

Белки комплемента (система комплемента) — это совокупность белков крови (более 30 белков и белковых комплексов), циркулирующих в неактивном состоянии и относящихся к гуморальным факторам естественного иммунитета. Они дополняют активность АТ и других компонентов иммунной системы, таких как макрофаги и нейтрофилы, в борьбе против инфекций. В организме человека эти белки работают вместе в сложной серии реакций, называемой каскадом комплемента. Белки комплемента способны запускать каскадную реакцию, приводящую в конечном итоге к разрушению возбудителя ин-

фекции. Кроме того, данные белки могут также усиливать ответ на АГ, повышая эффективность фагоцитоза и активацию иммунных клеток. Белки комплемента активируются несколькими способами, включая классический, альтернативный и лектиновый пути активации [52]. Основное различие между этими путями заключается в способе их инициирования. Классический путь осуществляет за счет связывания АТ (IgG или IgM) с их антигеном-мишенью, что активирует компоненты системы комплемента C1-C9 (при этом центральным белком системы является C3, который, в свою очередь, активирует другие белки комплемента) [52]. Альтернативный путь осуществляют поздние компоненты C3-C9, однако чаще всего он иницируется самопроизвольным гидролизом C3, в результате которого образуется небольшое количество активированного C3 (C3b). Далее C3b связывается с поверхностями, такими как патогены или поврежденные клетки, и рекрутирует другие белки комплемента с образованием C3-конвертазы. Этот путь активируется в отсутствие специфических АТ и считается механизмом «постоянного наблюдения». Лектиновый путь активируется при связывании маннозосвязывающего лектина (англ. *mannose-binding lectin*, MBL) с углеводными фрагментами на поверхности микроорганизмов. Это активирует MBL-ассоциированные сериновые протеазы (англ. *MBL-associated serine proteases*, MASPs), которые, в свою очередь, активируют другие белки комплемента [53]. Как только каскад комплемента активируется, это приводит к различным иммунным реакциям, включая:

- образование мембраноатакующего комплекса (англ. *membrane attack complex*, MAC/МАК) — это комплекс из белков комплемента (молекулы C5b-C9), образующийся на поверхности микроорганизмов или клеток и разрушающий их мембраны;

- фагоцитоз — это процесс поглощения и уничтожения микроорганизмов специализированными клетками (фагоцитами). Активированные белки комплемента могут опсонизировать или маркировать чужеродные частицы для распознавания фагоцитами [67]. Также опсонизация может происходить за счет связывания компонентов комплемента с поверхностью частицы, что усиливает фагоцитарную способность клеток.

- воспалительная реакция — активация белков комплемента высвобождает провоспалительные цитокины. Реакция воспаления помогает уничтожить микроорганизмы и привлекает другие клетки иммунной системы к месту инфекции или повреждения. При этом белки комплемента способствуют активации и миграции иммунных клеток;

— регуляция иммунной реакции — белки комплемента могут связываться с АТ и усиливать цитотоксичность или же ускорять уничтожение микроорганизмов с участием АТ;

— активация каскадов свертывания крови — активация некоторых белков комплемента (С1-С5) способствует образованию тромбов и предотвращению распространения инфекции [55].

Таким образом, иммунные реакции, возникающие в результате активации каскада комплемента, играют важную роль в защите организма от инфекций и других чужеродных агентов.

Исследования системы комплемента привели к разработке новых методов лечения целого ряда заболеваний. Например, разрабатываются препараты, ингибирующие белки комплемента, для лечения таких состояний, как возрастная макулярная дегенерация и пароксизмальная ночная гемоглобинурия [35, 77]. Препарат «Экулизумаб / Eculizumab» одобрен для лечения пароксизмальной ночной гемоглобинурии [35]. Он представляет собой МАТ, которое, специфически связываясь с белком комплемента С5, блокирует его расщепление на фрагменты С5а и С5b и ингибирует образование МАС. Разрабатывается препарат «Лампализумаб / Lampalizumab» для ингибирования белков комплемента при лечении возрастной макулярной дегенерации [77]. Эти МАТ против белкового фактора комплемента D предотвращают активацию альтернативного пути комплемента и уменьшают воспаление и повреждение тканей в области сетчатки.

Использование белков комплемента в качестве носителей для доставки биологически активных молекул, таких как белки или пептиды, улучшает их эффективность.

Исследуется [58, 66] новая функция белков комплемента — регуляция липидного обмена. Обнаружили, что белки комплемента — С3а и С5а способствуют расщеплению жировых клеток у мышей. Исследования показали, что рецепторы С3а и С5а экспрессируются в жировой ткани и играют роль в регуляции дифференцировки адипоцитов и липидного обмена. Активация этих рецепторов белками комплемента приводит к расщеплению триглицеридов и высвобождению жирных кислот — источника энергии. Более того, было установлено, что отсутствие рецептора С3а или С5а приводит к увеличению ожирения и нарушению толерантности к глюкозе у мышей, что указывает на роль белков комплемента в поддержании метаболического гомеостаза. Это может иметь важное значение для разработки новых методов лечения нарушений обмена веществ, таких как ожирение и сахарный диабет II типа.

Таким образом, белки комплемента, являясь важными компонентами иммунной системы, действуют как переносчики белка и участвуют в различных реакциях, включая фагоцитоз, воспа-

ление и лизис клеток. В целом продолжающиеся исследования использования белковых носителей комплемента являются перспективным направлением для разработки эффективных методов лечения онкологических, аутоиммунных и инфекционных заболеваний.

Молекулы основного комплекса гистосовместимости (МНС)

Молекулы основного комплекса гистосовместимости (англ. *Major histocompatibility complex*, МНС) — кластер генов, кодирующий белки, известные как комплекс человеческого лейкоцитарного антигена (англ. *Human Leukocyte Antigen*, HLA), важные для распознавания чужеродных веществ иммунной системой. Это белки, присутствующие на поверхности клеток и помогающие представлять АГ Т-лимфоцитам. Молекулы МНС могут участвовать в презентации АГ внутриклеточных патогенов, таких как вирусы и бактерии, а также раковых клеток. Специфичность молекул МНС позволяет осуществлять высоконаправленные иммунные реакции.

Молекулы МНС кодируются различными вариантами генов и обладают полиморфизмом в их аминокислотной последовательности. Благодаря этому некоторые люди могут иметь разные варианты молекул МНС, что влияет на способность их иммунной системы распознавать и реагировать на определенные инфекции и болезни.

Молекулы МНС класса I экспрессируются на поверхности всех эукариотических клеток и представляют пептиды, полученные из внутриклеточных белков, для цитотоксических клеток (CD8⁺Т-киллеров). Молекулы МНС класса II обнаружены на поверхности специализированных антигенпрезентирующих иммунных клеток, включая дендритные клетки, макрофаги и В-клетки, и представляют пептиды, полученные из внеклеточных белков, для Т-клеток-хелперов (CD4⁺Т-лимфоцитов).

Связывание пептидов с молекулами МНС является высокоспецифичным, а разнообразие генов и аллелей МНС позволяет распознавать широкий спектр чужеродных веществ. Такая специфичность важна для функционирования иммунной системы, поскольку она позволяет распознавать и уничтожать патогены, сводя к минимуму повреждение здоровых тканей.

Молекулы МНС также играют важную роль в трансплантации органов. Они определяют совместимость тканей между донором и реципиентом, поскольку различия в этих молекулах могут привести к иммунному ответу против трансплантата или его отторжению [49]. Таким образом, проверка на совместимость по молекулам МНС между донором и реципиентом является важным фактором в трансплантационной медицине.

Исследования МНС привели к более глубокому пониманию механизмов иммунного распоз-

навания и проложили путь для разработки новых методов иммунотерапии онкологических и аутоиммунных заболеваний. Например, некоторые методы иммунотерапии онкологии нацелены на взаимодействие между молекулами МНС и Т-клетками для усиления иммунного ответа против злокачественных клеток [61]. Этот подход показал многообещающие результаты в клинических испытаниях, особенно при лечении меланомы. Однако некоторые опухолевые клетки могут уклоняться от распознавания иммунной системой, подавляя экспрессию молекул МНС или продуцируя белки, которые препятствуют презентации МНС. Для преодоления этих ограничений разработано несколько стратегий усиления МНС-опосредованных Т-клеточных реакций при иммунотерапии онкологии. Один из подходов заключается в конструировании Т-клеток для распознавания химерных антигенов (англ. *chimeric antigen receptors*, CARs), которые могут взаимодействовать со специфическими опухолевыми АГ и усиливать МНС-опосредованную активацию [62]. Другой подход заключается в использовании ингибиторов иммунных контрольных точек для блокирования тормозных сигналов, ассоциированных с опухолевыми клетками, и подавления МНС-опосредованной активации Т-клеток [1, 63].

Специфические аллели МНС класса II связаны с развитием аутоиммунных заболеваний, поскольку они играют решающую роль в презентации собственных АГ Т-клеткам, активации аутореактивных Т-клеток и повреждении собственных тканей. Например, специфические аллели МНС класса II, такие как HLA-DR2 и HLA-DR4, ассоциированы с повышенным риском развития рассеянного склероза и ревматоидного артрита соответственно [1]. При этих заболеваниях аутореактивные Т-клетки активируются и атакуют миелиновую оболочку в случае рассеянного склероза или суставы в случае ревматоидного артрита. Аналогичным образом определенные аллели МНС класса I связаны с повышенной восприимчивостью к вирусным инфекциям, таким как ВИЧ и вирус гепатита С.

В целом молекулы МНС являются важнейшими компонентами иммунной системы, играющими жизненно важную роль в распознавании антигенных пептидов и реакции на них. Изучение МНС имеет решающее значение для понимания функционирования иммунной системы и разработки новых методов лечения различных заболеваний.

Toll-подобные рецепторы (TLRs)

Toll-подобные рецепторы (англ. *Toll-like receptors*, TLRs) – семейство трансмембранных белков иммунных клеток, распознающих патогенные микроорганизмы и связывающихся с ними по определенным паттернам (схемам). Они полу-

чили свое название благодаря сходству со структурой рецептора Toll, который был изучен у дрозофилы (*Drosophila melanogaster*). Toll-подобные рецепторы (Toll-рецепторы) имеют решающее значение для активации врожденных иммунных реакций, а также они могут стимулировать адаптивные иммунные реакции. TLRs экспрессируются на поверхности различных иммунных клеток, включая макрофаги, дендритные клетки и В-клетки, а также на неиммунных клетках, таких как эпителиальные клетки.

У человека известно десять типов TLRs, каждый из которых распознает различные молекулярные паттерны, ассоциированные с патогеном (англ. *pathogen-associated molecular patterns*, PAMPs). Например, TLR2 распознает липополисахариды, TLR3 распознает двухцепочечную РНК, TLR4 распознает поверхностные липополисахариды грамотрицательных бактерий, в то время как TLR9 распознает неметилированные CpG-мотивы в бактериальной и вирусной ДНК. Показано, что Toll-рецепторы не только играют важную роль при врожденном иммунитете, но и вовлечены в тканевой гомеостаз, заживление ран и восстановление тканей. Например, TLR4 способствует восстановлению тканей печени, кожи и сердца. Кроме того, TLR участвуют в поддержании микробиоты кишечника и регуляции метаболических путей.

Когда TLRs распознает PAMPs, они инициируют сигнальный каскад, активирующий различные факторы транскрипции, включая ядерный (транскрипционный) фактор «каппа би» (англ. *nuclear factor kappa B*, NF-κB) и регуляторные факторы интерферона (англ. *interferon regulatory factors*, IRFs). Это приводит к выработке провоспалительных цитокинов, хемокинов, интерферонов типа I и других иммунных медиаторов, а также к усилению регуляции молекул МНС и ко-стимулирующих молекул.

В дополнение к распознаванию PAMPs, TLRs могут также распознавать эндогенные молекулы, высвобождаемые поврежденными или подвергшимся стрессу клетками, называемые молекулярными паттернами, связанными с повреждением (англ. *damage-associated molecular patterns*, DAMPs) [65]. Эта активация TLRs с помощью DAMPs может способствовать развитию хронического воспаления и аутоиммунных заболеваний (системная красная волчанка, ревматоидный артрит, рассеянный склероз и воспалительные заболевания кишечника) [66]. Например, при ревматоидном артрите TLR активируются эндогенными лигандами, такими как белки теплового шока и компонентами внеклеточного матрикса, что приводит к выработке провоспалительных цитокинов [20].

Обнаружена аномальная передача сигналов TLRs в патогенезе множества заболеваний,

включая инфекционные, онкологические и аутоиммунные. Например, показано, что передача сигналов TLR4 способствует развитию сепсиса путем распознавания бактериальных липополисахаридов (англ. *lipopolysaccharides*, LPS). Когда TLR4 распознает LPS, он запускает сигнальный каскад, приводящий к выработке провоспалительных цитокинов, включая IL-1 β и TNF α и развитию воспалительной реакции. В то время как TLR7 и TLR9 участвуют в распознавании собственных нуклеиновых кислот и развитии аутоиммунных заболеваний, таких как системная красная волчанка. При этом собственные нуклеиновые кислоты высвобождаются из поврежденных или отмирающих клеток и активируют TLR7 и TLR9, что запускает циклический синтез аутоантител и провоспалительных цитокинов.

Toll-рецепторы изучаются в качестве потенциальных мишеней для иммунотерапии. Агонисты TLRs исследованы в качестве адъювантов для вакцин [36], поскольку они могут усиливать иммунный ответ на АГ. Агонисты TLRs также изучали как средство терапии онкологических заболеваний [36], поскольку они могут индуцировать гибель опухолевых клеток. Когда TLR на иммунных клетках, таких как дендритные клетки, активируются агонистами TLR, они продуцируют провоспалительные цитокины и хемокины, которые привлекают другие иммунные клетки к участку опухоли [20]. Затем эти иммунные клетки могут непосредственно уничтожать опухолевые клетки или помогать другим иммунным клеткам, таким как Т-клетки, распознавать и атаковать злокачественные клетки.

В качестве носителя агонисты TLRs могут доставлять белковые АГ к иммунным клеткам и активировать их, способствуя выработке стимулирующих молекул и цитокинов. Активированные ими Т-клетки распознают белковый АГ и реагируют на него, что приводит к усилению иммунного ответа. Их применение может стимулировать гибель опухолевых клеток и усиливать противоопухолевый иммунный ответ. Агонисты TLR могут активировать иммунные клетки, такие как дендритные клетки, макрофаги и естественные клетки-киллеры, которые непосредственно разрушают опухолевые клетки. Более того, использование агонистов TLRs в качестве носителей белковых АГ для доставки их к иммунным клеткам и понимание их функции может привести к разработке новых иммунотерапевтических стратегий, а соответственно, и к модернизации или разработке новых методов лечения целого ряда заболеваний.

Влияние лиганд-носителей на иммунную активность белков

Множество исследований посвящено влиянию присоединения лигандов-носителей на иммунную активность белков. Например, присое-

единение полиэтиленгликоля (англ. *polyethylene glycol*, PEG) к белку может уменьшить его иммуногенность и повысить его стабильность, что улучшает его фармакокинетические свойства и минимизирует возможные нежелательные эффекты. PEG является гидрофильным, биосовместимым полимером, который, присоединяясь к белку, образует защитный слой вокруг него, предотвращает его связывание или разрушение другими молекулами, включая ферменты. Это может увеличить стабильность белка и период полураспада в кровотоке. Кроме того, PEG может маскировать или модифицировать эпитопы белка, делая их менее узнаваемыми для иммунной системы. Этот процесс известен как пегилирование [69]. Некоторые белки были пегилированы для снижения иммуногенности, например, IFN α , фактор VIII (известный как антигемофильный фактор) и эритропоэтин [63, 70, 71, 72]. Исследования также показывают, что использование в качестве носителей белков комплемента или молекул МНС может усилить иммунный ответ. Использование Toll-подобных рецепторов в качестве носителей может также усилить иммунный ответ на белковый АГ. Таким образом, присоединение лигандов-носителей к белкам может оказывать значительное влияние на их иммунную активность, что может быть использовано для улучшения их фармакологических свойств и повышения эффективности лечения иммунных и инфекционных заболеваний.

Различные типы молекул-носителей изучаются и на предмет их способности усиливать иммунную активность белков. Сравнение природы лигандов-носителей является важным аспектом в данном направлении исследований. Носители классифицируют в зависимости от их природы: липиды, белки, углеводы и нуклеиновые кислоты. Например, белки комплемента, молекулы МНС и Toll-рецепторы являются природными носителями и могут быть использованы для усиления иммунного ответа на белок как это было описано ранее. Также широко используют искусственные лиганды для присоединения к носителям. PEG является искусственным лигандом, широко используемым для улучшения фармакокинетических свойств белков. Важно отметить, что использование искусственных лигандов может привести к нежелательным побочным эффектам, таким как нежелательная иммуногенность или токсичность, поэтому в выборе лигандов необходимо учитывать их безопасность и эффективность.

Было показано, что носители на основе липидов, такие как липосомы и твердые липидные наночастицы, повышают иммуногенность АГ [69, 75] за счет улучшения их стабильности и растворимости, а также их способности воздействовать на поверхность антигенпрезентирующих клеток,

что приводит к более эффективной активации иммунной системы. Например, липосомы использовались для доставки АГ к дендритным клеткам, что приводило к усиленной его презентации и активации Т-клеток [74]. Исследования показали, что липидные наночастицы могут значительно улучшить иммуногенность белков, используемых в вакцинах. Липидные наночастицы также могут улучшить устойчивость белков к ферментативному распаду, что может увеличить их эффективность и продолжительность действия. В целом использование липидных наночастиц в качестве носителей для белков значительно улучшает их иммунную активность и эффективность, что может быть полезно для создания новых вакцин и других терапевтических препаратов.

Широко изучены носители на основе белков, таких как гемоцианин (англ. *keyhole limpet hemocyanin*, KLH) и бычий сывороточный альбумин (англ. *bovine serum albumin*, BSA). Эти белки использовались для повышения иммуногенности присоединенных АГ путем индукции реакции специфичных АТ [61, 76]. Эти белки-носители, обладая собственной высокой иммуногенностью и в сочетании с АГ, действуют как иммуностимулирующие молекулы [78]. Кроме того, исследователи указывают, что рекомбинантные слитые белки, которые содержат молекулы-носители и АГ, индуцируют более выраженные иммунные реакции, чем сами по себе АГ. Изучают и другие носители на основе белков: вирусоподобные частицы (англ. *virus-like particle*, VLPs) [79], везикулы внешней мембраны бактерий (англ. *bacterial outer membrane vesicles*, OMVs) [80] и наночастицы ферритина [81, 82]. Преимущество этих носителей состоит в том, что они способны представлять АГ в поливалентной форме, что усиливает их иммуногенность. Например, VLPs — это самосборные структуры, состоящие из вирусных белков, имитирующих нативный вирус, но не содержащие вирусного генетического материала. Из-за своего сходства с вирусом VLPs эффективно запускают противовирусный иммунный ответ [54]. Они могут быть получены в больших количествах с использованием технологии рекомбинантной ДНК. В структуру VLPs можно включать различные АГ и разрабатывать поливалентные вакцины против нескольких штаммов вируса или даже разных вирусов. VLP также изучались на предмет их потенциала в качестве средств доставки лекарств и других терапевтических молекул [51]. Их высокая биосовместимость и способность к биологическому разложению делают их привлекательными для доставки лекарственных средств.

Также были исследованы носители на основе углеводов, такие как гликопротеины и полисахариды.

Например, бактериальные полисахариды использовались в качестве носителей для повышения иммуногенности вакцин против инфекционных заболеваний, таких как менингит и пневмококковые инфекции.

Носители на основе нуклеиновых кислот, такие как плазмиды и вирусные векторы, были изучены на предмет их способности усиливать иммунную активность кодируемых белков. Эти носители могут быть использованы для доставки генов, кодирующих АГ, что приводит к экспрессии АГ *in vivo* и последующей индукции иммунного ответа.

Таким образом, при выборе носителей-лигандов для улучшения иммунной активности белков, необходимо учитывать как природу носителя, так и природу используемых лигандов, чтобы достичь максимальной эффективности и безопасности. В целом выбор молекулы-носителя зависит от конкретного применения и требуемой выраженности иммунного ответа.

Заключение

Белки, играющие важную роль в иммунной системе, могут выступать в качестве носителей иммунной активности. Антитела, цитокины, белки комплемента, липидные наночастицы, молекулы МНС и TLR и др. — все эти типы молекул-носителей способствуют распознаванию и элиминации чужеродных патогенов. Дальнейшие исследования механизмов опосредованной белками иммунной активности могут привести к разработке новых методов лечения целого ряда заболеваний. Однако белки часто нестабильны и подвержены деградации, что может ограничить их эффективность в качестве терапевтических средств.

Использование белков-носителей может преодолеть некоторые из этих ограничений путем стабилизации белка и доставки его к соответствующему месту действия в организме. Белки-носители также могут усиливать иммунный ответ, повышая эффективность презентации АГ и активируя иммунную систему различными путями, в том числе через активацию комплемента и передачу сигналов Toll-подобными рецепторами.

Однако все еще существуют проблемы, требующие решения при разработке методов лечения на основе носителей. Одной из них является потенциальная иммуногенность, индуцируемая носителем, которая может вызвать нежелательный иммунный ответ и ограничить эффективность терапии.

В целом использование белков-носителей для иммунной активности белков потенциально способно предоставить более эффективные и целенаправленные методы лечения широкого спек-

тра заболеваний. Несмотря на наличие проблем, требующих решения, текущие исследования и разработки в этой области несомненно улучшают результаты лечения пациентов и продвигают область иммунотерапии.

Эта область исследований является многообещающей для улучшения фармакологических свойств применяемых лекарств и повышения эффективности лечения различных заболеваний.

Список литературы / References

1. Козлов В.А., Борисов А.Г., Смирнова С.В., Савченко А.А. Практические аспекты диагностики и лечения иммунных нарушений: руководство для врачей. Новосибирск: Наука, 2009. С. 208-209. [Kozlov V.A., Borisov A.G., Smirnova S.V., Savchenko A.A. Practical aspects of diagnosis and treatment of immune disorders: a guide for doctors.] Novosibirsk: Nauka, 2009, pp. 208-209.
2. Титов Л.П. Иммунология: Терминологический словарь. М.: Медицинское информационное агентство, 2008. 512 с. [Titov L.P. Immunology: Terminological Dictionary]. M.: Meditsinskoye informatsionnoye agentstvo, 2008. 512 p.
3. Al Naqbi H., Mawart A., Alshamsi J., Al Safar H., Tay G.K. Major histocompatibility complex (MHC) associations with diseases in ethnic groups of the Arabian Peninsula. *Immunogenetics*, 2021, Vol. 73, no. 2, pp. 131-152.
4. Almagro J.C., Daniels-Wells T.R., Perez-Tapia S.M., Penichet M.L. Progress and challenges in the design and clinical development of antibodies for cancer therapy. *Front. Immunol.*, 2018, Vol. 8, 1751. doi: 10.3389/fimmu.2017.01751.
5. Anand S.P., Ding S., Tolbert W.D., Prévost J., Richard J., Gil H.M., Gendron-Lepage G., Cheung W.F., Wang H., Pastora R., Saxena H., Wakarchuk W., Medjahed H., Wines B.D., Hogarth M., Shaw G.M., Martin M.A., Burton D.R., Hangartner L., Evans D.T., Pazgier M., Cossar D., McLean M.D., Finzi A. Enhanced ability of plant-derived PGT121 glycovariants to eliminate HIV-1-infected cells. *J. Virol.*, 2021, Vol. 95, no. 18, e0079621. doi: 10.1128/jvi.00796-21.
6. Anzaghe M., Schülke S., Scheurer S. Virus-like particles as carrier systems to enhance immunomodulation in allergen immunotherapy. *Curr. Allergy Asthma Rep.*, 2018, Vol. 18, no. 12, 71. doi: 10.1007/s11882-018-0827-1.
7. Aricò E., Castiello L., Capone I., Gabriele L., Belardelli F. Type I interferons and cancer: an evolving story demanding novel clinical applications. *Cancers*, 2019, Vol. 11, no. 12, 1943. doi: 10.3390/cancers11121943.
8. Austin R.J., Straube J., Bruedigam C., Pali G., Jacquelin S., Vu T., Green J., Gräsel J., Lansink L., Cooper L., Lee S.J., Chen N.T., Lee C.W., Haque A., Heidel F.H., d'Andrea R., Hill G.R., Mullally A., Milsom M.D., Bywater M., Lane S.W. Distinct effects of ruxolitinib and interferon-alpha on murine JAK2V617F myeloproliferative neoplasm hematopoietic stem cell populations. *Leukemia*, 2020, Vol. 34, no. 4, pp. 1075-1089.
9. Bargh J.D., Isidro-Llobet A., Parker J.S., Spring D.R. Cleavable linkers in antibody-drug conjugates. *Chem. Soc. Rev.*, 2019, Vol. 48, no. 16, pp. 4361-4374.
10. Bossard M.J., Vicent M.J. PEGylated proteins: A rational design for mitigating clearance mechanisms and altering biodistribution. *Polymer-Protein Conjugates*, 2020, pp. 23-40.
11. Cai X., Han Y., Gu M., Song M., Wu X., Li Z., Li F., Goulette T., Xiao H. Dietary cranberry suppressed colonic inflammation and alleviated gut microbiota dysbiosis in dextran sodium sulfate-treated mice. *Food Funct.*, 2019, Vol. 10, no. 10, pp. 6331-6341.
12. Chahine E.B., Guirguis E.H., Derrick C.B. Management of hepatitis C in the older adult. *Sr. Care Pharm.*, 2020, Vol. 35, no. 1, pp. 13-28.
13. Chau C.H., Steeg P.S., Figg W.D. Antibody-drug conjugates for cancer. *Lancet*, 2019, Vol. 394, no. 10200, pp. 793-804.
14. Dean A.Q., Luo S., Twomey J.D., Zhang B. Targeting cancer with antibody-drug conjugates: Promises and challenges. *Mabs*, 2021, Vol. 13, no. 1, 1951427. doi: 10.1080/19420862.2021.1951427.
15. Demel I., Bago J.R., Hajek R., Jelinek T. Focus on monoclonal antibodies targeting B-cell maturation antigen (BCMA) in multiple myeloma: update 2021. *Br. J. Haematol.*, 2021, Vol. 193, no. 4, pp. 705-722.
16. Fan S., Li W., Zhang K., Zou X., Shi W., Liu Z., Tang C., Huang W., Tang F. Enhanced antibody-defucosylation capability of α -L-fucosidase by proximity-based protein fusion. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2023, Vol. 645, pp. 40-46.
17. Francis J.E., Skacic I., Dekiwadia C., Shukla R., Taki A.C., Walduck A., Smooker P.M. Solid lipid nanoparticle carrier platform containing synthetic TLR4 agonist mediates non-viral DNA vaccine delivery. *Vaccines*, 2020, Vol. 8, no. 3, 551. doi: 10.3390/vaccines8030551.
18. Gao T., Zhu L., Liu H., Zhang X., Wang T., Fu Y., Li H., Dong Q., Hu Y., Zhang Z., Jin J., Liu Z., Yang W., Liu Y., Jin Y., Li K., Xiao Y., Liu J., Zhao H., Liu Y., Li P., Song J., Zhang L., Gao Y., Kang S., Chen S., Ma Q., Bian X., Chen W., Liu X., Mao Q., Cao C. Highly pathogenic coronavirus N protein aggravates inflammation by MASP-2-mediated lectin complement pathway overactivation. *Signal Transduct. Target. Ther.*, 2022, Vol. 7, no. 1, 318. doi: 10.1038/s41392-022-01133-5.
19. Gogesch P., Dudek S., van Zandbergen G., Waibler Z., Anzaghe M. The Role of Fc receptors on the effectiveness of therapeutic monoclonal antibodies. *Int. J. Mol. Sci.*, 2021, Vol. 22, no. 16, 8947. doi: 10.3390/ijms22168947.

20. 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. 95-12.
21. Hao S., Jin D., Zhang S., Qing R. QTY Code-designed Water-soluble Fc-fusion cytokine receptors bind to their respective ligands. *QRB Discovery*, 2020, Vol. 1, e4. doi: 10.1017/qrđ.2020.4
22. He Q., Jiang X., Zhou X., Weng J. Targeting cancers through TCR-peptide/MHC interactions. *J. Hematol. Oncol.*, 2019, Vol. 12, no. 1, 139. doi: 10.1186/s13045-019-0812-8.
23. Hong S., Choi D.W., Kim H.N., Park C.G., Lee W., Park, H.H. Protein-based nanoparticles as drug delivery systems. *Pharmaceutics*, 2020, Vol. 12, no. 7, 604. doi: 10.3390/pharmaceutics12070604.
24. Huang Q., Wu X., Zheng X., Luo S., Xu S., Weng J. Targeting inflammation and cytokine storm in COVID-19. *Pharmacol. Res.*, 2020, Vol. 159, 105051. doi: 10.1016/j.phrs.2020.105051.
25. Hurt A.C., Wheatley A.K. Neutralizing antibody therapeutics for COVID-19. *Viruses*, 2021, Vol. 13, no. 4, 628. doi: 10.3390/v13040628.
26. Im J.H., Yeo I.J., Hwang C.J., Lee K.S., Hong J.T. PEGylated erythropoietin protects against brain injury in the MCAO-induced stroke model by blocking NF- κ B activation. *Biomol. Ther. (Seoul)*, 2020, Vol. 28, no. 2, pp. 152-162.
27. Indolfi G., Nicastro E. Hepatitis during childhood. In: Comprehensive Guide to Hepatitis Advances. Academic Press, 2023, pp. 603-628.
28. Iqbal H., Yang T., Li T., Zhang M., Ke H., Ding D., Deng Y., Chen H. Serum protein-based nanoparticles for cancer diagnosis and treatment. *J. Control. Release*, 2021, Vol. 329, pp. 997-1022.
29. Jeong S.H., Jang J.H., Cho H.Y., Lee Y.B. Soft- and hard-lipid nanoparticles: a novel approach to lymphatic drug delivery. *Arch. Pharm. Res.*, 2018, Vol. 41, pp. 797-814.
30. Jiang S., Zhang X., Yang Y., Hotez, P.J., Du L. Neutralizing antibodies for the treatment of COVID-19. *Nat. Biomed. Eng.*, 2020, Vol. 4, no. 12, pp. 1134-1139.
31. Jiang Z., Zhao M., Zhang H., Li Y., Liu M., Feng F. Antimicrobial emulsifier-glycerol monolaurate induces metabolic syndrome, gut microbiota dysbiosis, and systemic low-grade inflammation in low-fat diet fed mice. *Mol. Nutr. Food Res.*, 2018, Vol. 62, no. 3, 1700547. doi: 10.1002/mnfr.201700547.
32. Joubert N., Beck A., Dumontet C., Denevault-Sabourin C. Antibody-drug conjugates: the last decade. *Pharmaceutics*, 2020, Vol. 13, no. 9, 245. doi: 10.3390/ph13090245.
33. Kang Y., Yang G., Zhang S., Ross C.F., Zhu M.J. Goji Berry Modulates Gut Microbiota and Alleviates Colitis in IL-10-Deficient Mice. *Mol. Nutr. Food Res.*, 2018, Vol. 62, no. 22, 1800535. doi: 10.1002/mnfr.201800535.
34. Kouli A., Horne C.B., Williams-Gray C.H. Toll-like receptors and their therapeutic potential in Parkinson's disease and α -synucleinopathies. *Brain Behav. Immun.*, 2019, Vol. 81, pp. 41-51.
35. Kulasekararaj A.G., Lazana I. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: Where are we going. *Am. J. Hematol.*, 2023, Vol. 98, pp. S33-S43.
36. Kumar S., Sunagar R., Gosselin E. Bacterial Protein Toll-like-receptor agonists: a novel perspective on vaccine adjuvants. *Front. Immunol.*, 2019, Vol. 10, 1144. doi: 10.3389/fimmu.2019.01144.
37. Labrijn A.F., Janmaat M.L., Reichert J.M., Parren P.W.H.I. Bispecific antibodies: a mechanistic review of the pipeline. *Nat. Rev. Drug Discov.*, 2019, Vol. 18, no. 8, pp. 585-608.
38. Lewczuk N., Zdebik A., Bogusławska J. Interferon Alpha 2a and 2b in Ophthalmology: A Review. *J. Interferon Cytokine Res.*, 2019, Vol. 39, no. 5, pp. 259-272.
39. Liu R., Oldham R.J., Teal E., Beers S.A., Cragg M.S. Fc-engineering for modulated effector functions-improving antibodies for cancer treatment. *Antibodies*, 2020, Vol. 9, no. 4, 64. doi: 10.3390/antib9040064.
40. Locatelli F., Zugmaier G., Rizzari C., Morris J.D., Gruhn B., Klingebiel T., Parasole R., Linderkamp C., Flotho C., Petit A., Micalizzi C., Mergen N., Mohammad A., Kormany W. N., Eckert C., Möricke A., Sartor M., Hrusak O., Peters, C., Saha V., Vinti L., von Stackelberg A. Effect of Blinatumomab vs chemotherapy on event-free survival among children with high-risk first-relapse B-cell acute lymphoblastic leukemia: a randomized clinical trial. *JAMA*, 2021, Vol. 325, no. 9, pp. 843-854.
41. Mandikian D., Takahashi N., Lo A.A., Li J., Eastham-Anderson J., Slaga D., Ho J., Hristopoulos M., Clark R., Totpal K., Lin K., Joseph S.B., Dennis M.S., Prabhu S., Junttila T.T., Boswell C.A. Relative target affinities of T-cell-dependent bispecific antibodies determine biodistribution in a solid tumor mouse model. *Mol. Cancer Ther.*, 2018, Vol. 17, no. 4, pp. 776-785.
42. Mandó P., Rivero S.G., Rizzo M.M., Pinkasz M., Levy E.M. Targeting ADCC: A different approach to HER2 breast cancer in the immunotherapy era. *Breast*, 2021, Vol. 60, pp. 15-25.
43. Margolis D.M., Koup R.A., Ferrari G. HIV antibodies for treatment of HIV infection. *Immunol. Rev.*, 2017, Vol. 275, no. 1, pp. 313-323.
44. Marovich M., Mascola J.R., Cohen M.S. Monoclonal antibodies for prevention and treatment of COVID-19. *JAMA*, 2020, Vol. 324, no. 2, pp. 131-132.
45. Mellado-Sánchez G., Lázaro-Rodríguez J.J., Avila S., Vallejo-Castillo L., Vázquez-Leyva S., Carballo-Uicab G., Velasco-Velázquez M., Medina-Rivero E., Pavón L., Chacón-Salinas R., Pérez-Tapia S.M. Development of functional antibodies directed to human dialyzable leukocyte extract (Transferron). *J. Immunol. Res.*, 2019, 2754920. doi: 10.1155/2019/2754920.
46. Moekotte A.L., Huson M.A.M., van der Ende A.J., Agnandji S.T., Huizenga E., Goorhuis A., Grobusch M.P. Monoclonal antibodies for the treatment of Ebola virus disease. *Expert Opin. Investig. Drugs*, 2016, Vol. 25, no. 11, pp. 1325-1335.

47. Mullard A. 2020 FDA drug approvals. *Nat. Rev. Drug Discov.*, 2021, Vol. 20, no. 2, pp. 85-91.
48. Mullard A. First antibody against COVID-19 spike protein enters phase I. *Nat. Rev. Drug Discov.*, 2020, Vol. 19, no. 7, pp. 435-436.
49. Nakamura T., Shirouzu T., Nakata K., Yoshimura N., Ushigome H. The role of major histocompatibility complex in organ transplantation - donor specific anti-major histocompatibility complex antibodies analysis goes to the next stage. *Int. J. Mol. Sci.*, 2019, Vol. 20, no. 18, 4544. doi: 10.3390/ijms20184544.
50. Njonkou R., Jackson C.M., Woodworth G.F., Hersh D.S. Pediatric glioblastoma: mechanisms of immune evasion and potential therapeutic opportunities. *Cancer Immunol. Immunother.*, 2022, Vol. 71, no. 8, pp. 1813-1822.
51. Nooraie S., Bahrulolom H., Hoseini Z.S., Katalani C., Hajizade, A., Easton A.J., Ahmadian G. Katalani C., Hajizade A., Easton A.J., Ahmadian G. Virus-like particles: preparation, immunogenicity and their roles as nanovaccines and drug nanocarriers. *J. Nanobiotechnology*, 2021, Vol. 19, no. 1, pp. 1-27.
52. Nussbaumer O., Koslowski M. The emerging role of $\gamma\delta$ T cells in cancer immunotherapy. *Immunooncol. Technol.*, 2019, Vol. 1, pp. 3-10.
53. Parab S., Doshi G. An update on emerging immunological targets and their inhibitors in the treatment of psoriasis. *Int. Immunopharmacol.*, 2022, Vol. 113, 109341. doi: 10.1016/j.intimp.2022.109341.
54. Perciani C.T., Liu L.Y., Wood L., MacParland S.A. Enhancing immunity with nanomedicine: employing nanoparticles to harness the immune system. *ACS Nano*, 2021, Vol. 15, no. 1, pp. 7-20.
55. Perico L., Benigni A., Casiraghi F., Ng L.F.P., Renia L., Remuzzi G. Immunity, endothelial injury and complement-induced coagulopathy in COVID-19. *Nat. Rev. Nephrol.*, 2021, Vol. 17, no. 1, pp. 46-64.
56. Popat R., Warcel D., O'Nions J., Cowley A., Smith S., Tucker W.R., Yong K., Esposti S.D. Characterization of response and corneal events with extended follow-up after belantamab mafodotin (GSK2857916) monotherapy for patients with relapsed multiple myeloma: a case series from the first-time-in-human clinical trial. *Haematologica*, 2020, Vol. 105, no. 5, pp. e261-e263.
57. Roshanravan N., Seif F., Ostadrahimi A., Pouraghaei M., Ghaffari S. Targeting cytokine storm to manage patients with COVID-19: A Mini-Review. *Arch. Med. Res.*, 2020, Vol. 51, no. 7, pp. 608-612.
58. Saferding V., Blüml S. Innate immunity as the trigger of systemic autoimmune diseases. *J. Autoimmun.*, 2020, Vol. 110, 102382. doi: 10.1016/j.jaut.2019.102382.
59. Saleh J., Al-Maqbali M., Abdel-Hadi D. Role of complement and complement-related adipokines in regulation of energy metabolism and fat storage. *Compr. Physiol.*, 2019, Vol. 9, no. 4, pp. 1411-1429.
60. Scaria P.V., Rowe C.G., Chen B.B., Muratova O.V., Fischer E.R., Barnafo E.K., Anderson C.F., Zaidi I.U., Lambert, L.E., Lucas B.J., Nahas D.D., Narum D.L., Duffy P.E. Outer membrane protein complex as a carrier for malaria transmission blocking antigen Pfs230. *NPJ Vaccines*, 2019, Vol. 4, no. 1, 24. doi: 10.1038/s41541-019-0121-9.
61. Schijns V., Fernández-Tejada A., Barjaktarović Ž., Bouzalas I., Brimnes J., Chernysh S., Gizurarson S., Gursel I., Jakopin Ž., Lawrenz M., Nativi C., Paul S., Pedersen G. K., Rosano C., Ruiz-de-Angulo A., Slütter B., Thakur A., Christensen D., Lavelle E.C. Modulation of immune responses using adjuvants to facilitate therapeutic vaccination. *Immunol. Rev.*, 2020, Vol. 296, no. 1, pp. 169-190.
62. Sedykh S.E., Prinz V.V., Buneva V.N., Nevinsky G.A. Bispecific antibodies: design, therapy, perspectives. *Drug Des. Devel. Ther.*, 2018, Vol. 12, pp. 195-208.
63. Shah A., Coyle T., Lalezari S., Fischer K., Kohlstaedde B., Delesen H., Radke S., Michaels L.A. BAY 94-9027, a PEGylated recombinant factor VIII, exhibits a prolonged half-life and higher area under the curve in patients with severe haemophilia A: Comprehensive pharmacokinetic assessment from clinical studies. *Haemophilia*, 2018, Vol. 24, no. 5, pp. 733-740.
64. Shi D., Beasock D., Fessler A., Szebeni J., Ljubimova J.Y., Afonin K.A., Dobrovolskaia M.A. To PEGylate or not to PEGylate: Immunological properties of nanomedicine's most popular component, polyethylene glycol and its alternatives. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2022, Vol. 180, 114079. doi: 10.1016/j.addr.2021.114079.
65. Shi W., Yao X., Fu Y., Wang Y. Interferon α and its effects on cancer cell apoptosis (Review). *Oncol. Lett.*, 2022, Vol. 24, no. 1, 235. doi: 10.3892/ol.2022.13355.
66. Shim K., Begum R., Yang C., Wang H. Complement activation in obesity, insulin resistance, and type 2 diabetes mellitus. *World J. Diabetes*, 2020, Vol. 11, no. 1, pp. 1-12.
67. Sicca F., Neppelenbroek S., Huckriede A. Effector mechanisms of influenza-specific antibodies: neutralization and beyond. *Expert Rev. Vaccines*, 2018, Vol. 17, no. 9, pp. 785-795.
68. Siemieniuk R.A., Bartoszko J.J., Martinez J.P.D., Kum E., Qasim A., Zeraatkar D., Izcovich A., Mangala S., Ge L., Han M.A., Agoritsas T., Arnold D., Ávila C., Chu D.K., Couban R., Cusano E., Darzi A.J., Devji T., Foroutan F., Ghadimi M., Khamis A., Lamontagne F., Loeb M., Miroshnychenko A., Motaghi S., Murthy S., Mustafa R.A., Rada G., Rochwerg B., Switzer C., Vandvik P.O., Vernooij R.W., Wang Y., Yao L., Guyatt G.H., Brignardello-Petersen R. Antibody and cellular therapies for treatment of Covid-19: A living systematic review and network meta-analysis. *BMJ*, 2021, Vol. 374, 2231. doi: 10.1136/bmj.n2231.
69. Sinha P., Matthay M.A., Calfee C.S. Is a "Cytokine Storm" Relevant to COVID-19? *JAMA Intern. Med.*, 2020, Vol. 180, no. 9, pp. 1152-1154.
70. Strohl W.R. Current progress in innovative engineered antibodies. *Protein Cell*, 2018, Vol. 9, no. 1, pp. 86-120.
71. Sun X., Ling Z., Yang Z., Sun B. Broad neutralizing antibody-based strategies to tackle influenza. *Curr. Opin. Virol.*, 2022, Vol. 53, 101207. doi: 10.1016/j.coviro.2022.101207.

72. Sun X., Liu C., Lu X., Ling Z., Yi C., Zhang Z., Li Z., Jin M., Wang W., Tang S., Wang F., Wang F., Wangmo S., Chen S., Li L., Ma L., Zhang Y., Yang Z., Dong X., Qian Z., Ding J., Wang D., Cong Y., Sun B. Unique binding pattern for a lineage of human antibodies with broad reactivity against influenza A virus. *Nat. Commun.*, 2022, Vol. 13, no. 1, 2378. doi: 10.1038/s41467-022-29950-w.
73. Thakral S., Sonje J., Munjal B., Suryanarayanan R., Suryanarayanan R. Stabilizers and their interaction with formulation components in frozen and freeze-dried protein formulations. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2021, Vol. 173, pp. 1-19.
74. van der Horst H.J., Nijhof I.S., Mutis T., Chamuleau M.E. Fc-engineered antibodies with enhanced Fc-effector function for the treatment of B-cell malignancies. *Cancers*, 2020, Vol. 12, no. 10, 3041. doi: 10.3390/cancers12103041.
75. Wang X., Mathieu M., Brezski R.J. IgG Fc engineering to modulate antibody effector functions. *Protein Cell*, 2018, Vol. 9, no. 1, pp. 63-73.
76. Wang Y., Xie Q., Zhang Y., Ma W., Ning K., Xiang J.Y., Cui J., Xiang H. Combination of probiotics with different functions alleviate DSS-induced colitis by regulating intestinal microbiota, IL-10, and barrier function. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2020, Vol. 104, no. 1, pp. 335-349.
77. Wu J., Sun X. Complement system and age-related macular degeneration: drugs and challenges. *Drug Des. Devel. Ther.*, 2019, Vol. 13, pp. 2413-2425.
78. Xue D., Hsu E., Fu Y.X., Peng H. Next-generation cytokines for cancer immunotherapy. *Antib. Ther.*, 2021, Vol. 4, no. 2, pp. 123-133.
79. Zeng X., Wang H., Huang C., Logue C.M., Barbieri N.L., Nolan L.K., Lin J. Evaluation of the immunogenic response of a novel enterobactin conjugate vaccine in chickens for the production of enterobactin-specific egg yolk antibodies. *Front. Immunol.*, 2021, Vol. 12, 629480. doi: 10.3389/fimmu.2021.629480.
80. Zhang Y., Qian L., Chen K., Gu S., Wang J., Meng Z., Li Y., Wang P. Intraperitoneal oncolytic virotherapy for patients with malignant ascites: Characterization of clinical efficacy and antitumor immune response. *Mol. Ther. Oncolytics*, 2022, Vol. 25, pp. 31-42.
81. Zhao H., Wu L., Yan G., Chen Y., Zhou M., Wu Y., Li Y. Inflammation and tumor progression: signaling pathways and targeted intervention. *Signal Transduct. Target. Ther.*, 2021, Vol. 6, no. 1, 263. doi: 10.1038/s41392-021-00658-5.
82. Zhao M. Cytokine storm and immunomodulatory therapy in COVID-19: Role of chloroquine and anti-IL-6 monoclonal antibodies. *Int. J. Antimicrob. Agents*, 2020, Vol. 55, no. 6, 105982. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2020.105982.

Авторы:

Гогина С.С. — магистр института биохимической технологии и нанотехнологии ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы»; специалист АО БТК «Биосервис»; младший научный сотрудник ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова», Москва, Россия

Стойнова А.М. — к.х.н., ассистент института биохимической технологии и нанотехнологии ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы», Москва, Россия

Authors:

Gogina S.S., Master Student, Research Institute of Biochemical Technology and Nanotechnology, P. Lumumba Peoples' Friendship University of Russia; Specialist, Biotechnology Company Limited "Bioservice"; Junior Research Associate, I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation

Stoinova A.M., PhD (Chemistry), Assistant Professor, Research Institute of Biochemical Technology and Nanotechnology, P. Lumumba Peoples' Friendship University of Russia, Moscow, Russian Federation

Поступила 27.07.2023
Принята к печати 05.10.2023

Received 27.07.2023
Accepted 05.10.2023

НОВЫЕ СТРАТЕГИИ ИММУНОТЕРАПИИ СОЛИДНЫХ ОПУХОЛЕЙ НА ОСНОВЕ НК-КЛЕТОК

Воробьева И.Г.¹, Абакушина Е.В.^{1, 2}

¹ ООО «Текон МП», Москва, Россия

² ГНЦ РФ ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр эндокринологии» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Резюме. Одна из основных сложностей терапии солидных опухолей связана с разнообразием и быстрой адаптацией механизмов иммуносупрессии, проявляемых клетками иммунитета, перепрограммированных опухолью. Ассоциированные с опухолью макрофаги (ТАМ), нейтрофилы, инфильтрирующие опухоль лимфоциты, теряют способность защищать здоровые ткани и перестают уничтожать злокачественные клетки, активируя арсенал средств для блокады иммуннадзора и терапевтических воздействий. Привлеченные хемокинами и перепрограммированные опухолью клетки иммунитета снабжают злокачественные клетки недостающими питательными веществами (например, производя аргиназу), поддерживают выживание новых «рекрутов» при низком рН (ацидозе) вокруг малигнизированных тканей, производят повышенное количество ангиогенных факторов, способствуя усилению кровоснабжения опухоли. Продуктивное воспаление — как один из главных типов иммунного ответа, уничтожающий опухолевые патогены при прогрессировании опухолевого процесса, переходит в хроническое воспаление, что вызывает иммуносупрессию. Восстановление воспалительных иммунных реакций после резекции опухоли, химиотерапии, радиотерапии необходимо для достижения ремиссии без рецидива или как минимум увеличения времени до следующего эпизода возникновения признаков прогрессирования болезни.

НК-клеточный трансплантат имеет ряд преимуществ перед Т-лимфоцитами, для восстановления продуктивного воспаления, однако и он требует дополнительных терапевтических воздействий, так как разнообразные механизмы иммуноускользания блокируют противоопухолевый иммунитет. Для выраженного терапевтического эффекта важно соотношение между активностью и количеством НК-клеток, поддерживающих их терапевтических средств, и агрессивностью и распространением самой опухоли. Одно из разрабатываемых направлений, поддерживающих НК-клетки — это создание «усилителей» (NKCE) — инженерных белков, и делающих клеточную терапию более селективной и адресной. NKCE может активировать целевую миграцию НК-клеток одновременно блокируя ингибирующие лиганды. Блокада ингибирующих сигналов для борьбы с метастатическими опухолями изучается в настоящее время для рецепторов KIR, NKG2A, TIGIT, TIM-3, EGFR, PD1 и PDL1, лигандов NKG2D, что описано в ряде исследований. Повышение специфичности терапии также достигается за счет использования антител нового поколения — наноантител, направленной блокировки экзосом злокачественного происхождения (TDE), а также доменов некоторых белков, усиливающих целевую миграцию НК-клеток, и терапевтических наночастиц.

Ключевые слова: НК-клетки, белок-усилитель НК-клеток, мультиспецифические антитела, наноантитела, целевая миграция, ингибирование контрольных точек

Адрес для переписки:

Воробьева Ива Глебовна
ООО «Текон МП»
123298, Россия, Москва,
ул. 3-я Хорошевская, 16, корп. 1, стр. 1.
E-mail: iva1647@yandex.ru

Address for correspondence:

Iva G. Vorobyova
LLC “Tecon MP”
16 3rd Khoroshevskaya St, Bldg 1
Moscow
123298 Russian Federation
E-mail: iva1647@yandex.ru

Образец цитирования:

И.Г. Воробьева, Е.В. Абакушина «Новые стратегии иммунотерапии солидных опухолей на основе НК-клеток» // Медицинская иммунология, 2024. Т. 26, № 6. С. 1163–1176.
doi: 10.15789/1563-0625-NSF-2938

© Воробьева И.Г., Абакушина Е.В., 2024
Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

I.G. Vorobyova, E.V. Abakushina “New strategies for solid tumor immunotherapy based on NK cells”, *Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2024, Vol. 26, no. 6, pp. 1163–1176.
doi: 10.15789/1563-0625-NSF-2938

© Vorobyova I.G., Abakushina E.V., 2024
The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License
DOI: 10.15789/1563-0625-NSF-2938

NEW STRATEGIES FOR SOLID TUMOR IMMUNOTHERAPY BASED ON NK CELLS

Vorobyova I.G.^a, Abakushina E.V.^{a, b}

^a LLC "Tecon MP", Moscow, Russian Federation

^b National Medical Research Center for Endocrinology, Moscow, Russian Federation

Abstract. A major issue in treatment of solid malignancies is associated with multiplicity and rapid adaptation of immunosuppressive effects exerted by immune cells reprogrammed by the tumor. Tumor-associated macrophages (TAM), neutrophils, and tumor-infiltrating lymphocytes lose their ability to protect healthy tissues and to destroy malignant cells by activating a number of tools causing blockage of immune surveillance and reduction of therapeutic effects. Immune cells attracted by chemokines and reprogrammed by the tumor supply the malignant cells with missing nutrients (e.g., by producing arginase), support the survival of *de novo* recruited cells at low pH (acidosis) around malignant tissues, produce increased amounts of angiogenic factors thus contributing to increased blood supply to the tumor. Productive inflammation, being among the main types of immune response, destroys tumor pathogens and moves into chronic inflammation with progression of the tumor, thus causing immune suppression. Restoration of inflammatory immune reactions after tumor resection, chemotherapy, and radiotherapy is necessary to achieve remission without relapse or, at least, increases the time period until next episode of the disease progression.

Transplantation of NK cells has a number of advantages over T lymphocytes in order of restored productive inflammation. However, it also requires additional therapeutic impacts, since various mechanisms of tumor immune escape block anti-tumor immunity. To achieve a pronounced therapeutic effect, the optimal ratio is important between the activity and number of NK cells, supporting therapeutic agents, with regard of aggressiveness and spread of malignant tumor. Among the developing areas of NK cells support, one may consider the NK cell "enhancers" (NKCE), engineered proteins that make cell therapy more selective and targeted. NKCE may activate the targeted migration of NK cells, along with blockage of inhibitory ligands. Currently, the blockage of inhibitory signals is studied in order to control metastatic tumors via KIR, NKG2A, TIGIT, TIM-3, EGFR, PD1 receptors, PDL1 and NKG2D ligand, as reported in a number of clinical and preclinical trials. The increased specificity of therapy is also achieved by usage of new-generation antibodies — nanoantibodies, aimed for targeted blocking of tumor-derived exosomes (TDE), as well as protein domains that enhance targeted migration of NK cells and therapeutic nanoparticles.

Keywords: NK cells, NK enhancer protein, multispecific antibody, nanoantibody, targeted migration, control point inhibition

Статья подготовлена на основании результатов, полученных в ходе реализации Соглашения о предоставлении гранта в форме субсидий из федерального бюджета на осуществление государственной поддержки создания и развития научных центров мирового уровня, выполняющих исследования и разработки по приоритетам научно — технологического развития от 20 апреля 2022 года № 075-15- 2022-310.

Введение

НК-терапия как безопасный способ клеточной терапии солидных опухолей

Одна из основных сложностей терапии солидных опухолей связана с разнообразием и быстрой адаптацией механизмов иммуносупрессии, проявляемых клетками иммунитета, перепрограммированных опухолью. Ассоциированные с опухолью макрофаги (TAM), нейтрофилы, инфильтрирующие опухоль лимфоциты, теряют способность защищать здоровые ткани и перестают уничтожать злокачественные клет-

ки, активируя арсенал средств для блокады иммуннадзора и терапевтических воздействий. Привлеченные хемокинами и перепрограммированные опухолью клетки иммунитета снабжают злокачественные клетки недостающими питательными веществами (например, производя аргиназу), поддерживают выживание новых «рекрутов» при низком pH (ацидозе) вокруг малигнизированных тканей, производят повышенное количество ангиогенных факторов, способствуя усилению кровоснабжения опухоли [23]. Продуктивное воспаление — как один из главных типов иммунного ответа, уничтожающий опухолевые патогены, переходит в хроническое воспаление, что вызывает иммуносупрессию [6]. При лечении солидных опухолей необходимо восстановление воспалительных иммунных реакций после резекции опухоли, химиотерапии, радиотерапии для достижения ремиссии без рецидива или, как минимум, увеличения времени до следующего эпизода возникновения признаков прогрессирования болезни.

Для преодоления этих негативных свойств тестируется множество методов, в том числе в стадии клинических испытаний, включая использование цитокинов (IFN γ , TNF α , IL-1 β), эпигенетическое ингибирование TGF- β и AHR, таргетное воздействие на молекулы, привлекающие НК-клетки, использование генных каркасов, разнообразных наночастиц, инженерные модификации самих клеток (CAR-NK), ингибиторы иммунных контрольных точек и другие (табл. 1). Обзор посвящен разрабатываемым методам генной и клеточной инженерии, помогающим аутологичным НК-клеткам преодолеть барьеры солидных опухолей.

Преимущества в безопасности НК-клеток относительно Т-лимфоцитов

Для восстановления иммунных функций, клеточная терапия на основе НК-лимфоцитов все чаще рассматривается как эффективный и безопасный способ лечения [28]. Известно, что в уничтожении инфицированных и опухолевых клеток ведущая роль принадлежит цитотоксическим Т-лимфоцитам (CTL) и НК-клеткам. Оба эти типа клеток-убийц могут образовывать цитотоксические иммунологические синапсы — связи между лигандом на злокачественной клетке и рецептором на иммунной клетке. Связавшись активирующим рецептором с лигандом на патогенной клетке и не получив значимого сигнала от своих ингибирующих рецепторов, иммунная клетка уничтожает свою мишень [22]. Активация Т-лимфоцитов, их пролиферация, секреция цитокинов воспаления происходят, когда клональный рецептор Т-клеток (TCR) связывается с опухолевым антигеном, представленным в комплексе с HLA-I класса. В отличие от Т-лимфоцитов, НК-клетки не экспрессируют TCR, но вместо этого имеют много активирующих рецепторов — распознающих патогены, и ингибирующих рецепторов — распознающих основные комплексы МНС-I класса, чтобы не атаковать собственные, здоровые клетки [26]. Экспрессия молекул МНС-I часто подавляется в злокачественных клетках, из-за чего они не могут быть уничтожены Т-лимфоцитами, зато отсутствие комплекса гистосовместимости позволяет ликвидировать такой патоген НК-клетке. Поэтому НК-клеточный трансплантат имеет преимущества перед использованием Т-лимфоцитов как в безопасности, так и эффективности.

Источники НК-клеток для трансплантации

Для применения в клинической практике, производство клеточного продукта должно соответствовать нормам GMP — иметь строгий уровень доказательной базы, воспроизводимость, безопасность, контроль качества [17]. Документация необходима как на источник получения НК-клеток, так и на технологии культивирования, активации и схемы лечения. Источниками НК-клеток для терапии служат: мононуклеары

периферической крови (PBMC), пуповинной крови (CB); дифференцировка НК-клеток из пуповинной крови (CB), костного мозга (BM), стволовых клеток (hESC) или индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (iPS).

Аутологичный и аллогенный клеточный продукт

По типу донора источники клеток для противоопухолевой терапии делятся на: аутологичные — клетки самого пациента и аллогенные — клетки донора [4]. Любой из этих клеточных продуктов может быть не лишен примеси Т-лимфоцитов. Аутологичный клеточный продукт имеет такое важное преимущество перед аллогенным, как повышенная безопасность из-за заведомого отсутствия реакции трансплантат против хозяина (РТПХ) — потенциально опасного состояния, вызванного разрушением тканей хозяина донорскими Т-клетками [38]. Также донорные клетки могут быть не свободны от латентных вирусов, которых нет у пациента, что также создает потенциальную угрозу для пациента и исхода терапии.

Недостатки аутологичного продукта, выделенных из крови пациента мононуклеаров — это сниженное количество лимфоцитов после химиотерапии (лимфоцитопения), зачастую измененная цитотоксичность и пролиферативная активность. Обедненный потенциал НК-клеток ухудшает возможности аутологичного клеточного продукта, о чем свидетельствуют клинические испытания аутологичной НК-клеточной иммунотерапии солидных опухолей [21]. Такие свойства появляются у НК-клеток из-за иммуносупрессии, вызванной ростом опухоли или после проведения химиотерапии [41].

Способы активации и генерации НК-клеточной популяции

НК-клеточный продукт как аутологичный, так и аллогенный, нуждается в стандартизованных методиках экспансии и активации *in vitro*. Количество и качество выделяемых естественных киллеров из периферической крови пациентов или доноров может страдать из-за иммуносупрессии и/или ограниченного количества биоматериала. Для генерации используют несколько цитокинов, таких как интерлейкины IL-2/IL-15 и их модификации, IL-12, IL-21 и IL-18, IFN γ , а также фидерные (кормящие) клеточные линии [10].

Интерлейкины IL-2 и IL-15 тестировались для получения клеточного продукта в лаборатории, а также для инфузии совместно с НК-клетками, влияя на весь пул естественных киллеров пациента (NCT02118415, NCT03539406, NCT03539406). Инфузии НК со стимулирующими дозами IL-2 при трансплантации показали не только экспансию естественных киллеров, но и несколько побочных эффектов, таких как синдром капиллярной утечки [36], апоптоз НК-клеток при контакте с эндотелием сосудов, активация иммуносупрессирующих Т-лимфоцитов (Treg), которые, так же как НК, экспрессируют CD25 рецептор к

ТАБЛИЦА 1. КЛИНИЧЕСКИЕ ИСПЫТАНИЯ РАЗЛИЧНЫХ СТРАТЕГИЙ НК-ТЕРАПИИ СОЛИДНЫХ ОПУХОЛЕЙ

TABLE 1. CLINICAL TRIALS OF VARIOUS STRATEGIES FOR NK THERAPY OF SOLID TUMORS

Тип опухоли Tumor	Тип клеток для терапии Cell type for therapy	Номер исследования Identification number
Гастроинтестинальная стромальная опухоль Gastrointestinal stromal tumor	Смесь DC и NK-клеток A mixture of DC and NK cells	NCT05461235
Солидные опухоли Solid tumors	Аутологичные NK-клетки Autologous NK cells	NCT05143125
Рак яичников IV стадии Рецидивирующий рак эндометрия Ovarian cancer IV stage Recurrent endometrial cancer	Аутологичные CAR NK-клетки Autologous CAR NK cells	NCT05410717
Рак поджелудочной железы Немелкоклеточный рак легкого метастазирующий Рецидивирующая карцинома печени Pancreatic cancer Metastatic non-small cell lung cancer Recurrent liver carcinoma	NK с необратимой электропорацией (ИРЭ) Аутологичные CIK NK with irreversible electroporation (IRE) Autologous CIK	NCT02718859 NCT02843815 NCT02845856 NCT03008343
Немелкоклеточный рак легкого Non-small cell lung cancer	Аутологичные NK-клетки Autologous NK cells	NCT03958097
Мелкоклеточный рак легкого Small Cell Lung Cancer	Аутологичные естественные клетки-киллеры Autologous NK cells	NCT03410368
Рефрактерный метастатический колоректальный рак Refractory metastatic colorectal cancer	NKG2D CAR-NK	NCT05213195
Гепатоцеллюлярная карцинома Hepatocellular carcinoma	Аллогенные NK-клетки пуповинной крови + химиотерапия Allogeneic NK cells of umbilical cord blood + chemotherapy	NCT05171309 NCT04162158
Рак яичников Ovarian cancer	Антимезотелиновые CAR NK-клетки Anti-mesothelin CAR NK cells	NCT03692637
Солидные опухоли Solid tumors	Аллогенные NK Allogeneic NK cells	NCT03619954
Прогрессирующий рак желудка Рак желудочно-кишечного тракта Progressive stomach cancer Cancer of the gastrointestinal tract	Гаплоидентичные UCB-NK-клетки Allogeneic UCB-NK cells haploidentical donor	NCT04385641
Рак почки Kidney cancer	Аллогенные NK-клетки Allogeneic NK cells	NCT02843607
Прогрессирующий рак Advanced neoplasms	Аутологичные NK-клетки Autologous NK cells	NCT03554889
Немелкоклеточный рак легкого Колоректальный рак Плоскоклеточный рак головы и шеи Non-small cell lung cancer Colorectal cancer Squamous cell carcinoma of the head and neck	Аутологичные активированные цитокинами CIK-NK ex vivo (SNK01) Autologous cytokine-activated CIK-NK ex vivo (SNK01)	NCT05099549 NCT03941262 NCT04464967
Опухоли головного мозга у детей Pediatric brain tumors	Аллогенные CIK NK TGF- β i CIK NK TGF- β i Allogeneic CIK NK TGF- β i CIK NK TGF- β i	NCT05887882

Таблица 1 (продолжение)
Table 1 (continued)

Тип опухоли Tumor	Тип клеток для терапии Cell type for therapy	Номер исследования Identification number
Прогрессирующая почечно-клеточная карцинома Прогрессирующая мезотелиома Прогрессирующая остеосаркома Progressive renal cell carcinoma Progressive mesothelioma Progressive osteosarcoma	(CAR)-трансдуцированные НК-клетки (CAR)-transduced NK cells	NCT05703854
Рецидивирующая глиосаркома Рецидивирующая супратенториальная глиобластома Супратенториальная глиосаркома Recurrent gliosarcoma Recurrent supratentorial glioblastoma Supratentorial gliosarcoma	Аллогенные НК, полученные из пуповинной крови, НК-клетки, содержащие удаленные TGF-βR2 и NR3C Allogeneic NK cells derived from umbilical cord blood, NK cells containing deleted TGF- β R2 and NR3C	NCT04991870
HER2-положительный рак желудка HER2-положительный метастатический рак молочной железы HER2-positive stomach cancer HER2-positive metastatic breast cancer	ACE1702 (анти-HER2 оНК) клетки ACE1702 (anti-HER2 oNK)	NCT04319757
Плоскоклеточный рак головы и шеи Рецидивирующий плоскоклеточный рак головы и шеи Squamous cell carcinoma of the head and neck Recurrent squamous cell carcinoma of the head and neck	Аллогенные НК CIML от гаплоидентичного донора Allogeneic NK CIML from a haploidentical donor	NCT04290546
Глиома Glioma	Аллогенные НК от гаплоидентичного донора Allogeneic NK cells haploidentical donor	NCT04254419
Рак яичников, фаллопиевых труб или первичный рак брюшины Ovarian, fallopian tube, or primary peritoneal cancer	Аллогенные естественные клетки-киллеры, подобные CTL Allogeneic natural killer cell-like CTLs	NCT03735589
Прогрессирующая солидная опухоль Solid tumors	Аллогенные НК-клетки гаплоидентичные Allogeneic NK cells haploidentical donor	NCT04106167
Нейробластома Neuroblastoma	Аллогенные НК-клетки гаплоидентичные Allogeneic NK cells haploidentical donor	NCT01857934 NCT01576692
Плоскоклеточный рак головы и шеи Метастатический колоректальный рак Squamous cell carcinoma of the head and neck Metastatic colorectal cancer	WU-NK-101 – неинженерная НК-клетки из PBMC, Аллогенные CIK NK WU-NK-101 – Non-engineered NK cells from PBMC, Allogeneic CIK NK	NCT05674526
Детская остеосаркома Pediatric osteosarcoma	Аллогенные НК импринтинг-β (TGF-βi) во время активации и экспансии НК-клеток Allogeneic NK imprinting- β (TGF- β i) during activation and expansion of NK cells	NCT05634369

Таблица 1 (продолжение)
Table 1 (continued)

Тип опухоли Tumor	Тип клеток для терапии Cell type for therapy	Номер исследования Identification number
Карцинома толстой кишки Аденокарцинома прямой кишки Миелопролиферативные синдромы Саркома Юинга Colon carcinoma Adenocarcinoma of the rectum Myeloproliferative syndromes Ewing sarcoma	Аллогенные NK HLA-совместимые в комбинации с ALT-803 Allogeneic NK HLA-compatible in combination with ALT-803	NCT02890758
Рецидивирующая или рефрактерная нейробластома Рецидивирующая или рефрактерная остеосаркома Recurrent or refractory neuroblastoma Recurrent or refractory osteosarcoma	CIK K562-mbIL15-41 млн аллогенных NK-клеток от гаплоидентичного донора CIK K562-mbIL15-41 млн CIK K562-mbIL15-41BBL allogeneic NK cells haploidentical donor CIK K562-mbIL15-41BBL	NCT03209869
Нейробластома Neuroblastoma	Аллогенные NK гаплоидентичные с IL-2 Allogeneic NK haploidentical with IL-2	NCT00698009
Новообразования по гистологическому типу Мультиформная глиобластома Neoplasms by histological type Glioblastoma multiforme	NK-клетки, полученные из плацентарных CD34 ⁺ клеток человека NK cells derived from human placental CD34 ⁺ cells	NCT04309084 NCT04489420
Нейробластома костного мозга, Нейробластома Bone marrow neuroblastoma, Neuroblastoma	Гуманизированное антитело к GD2 Hu3F8 и аллогенных естественных клеток-киллеров Humanized antibody to GD2 Hu3F8 and allogeneic natural killer cells	NCT02650648 NCT00877110
Нейробластома Neuroblastoma	Аутологичные NK-клетки в сочетании со стандартной дозировкой динутуксимаба Autologous NK cells in combination with the standard dosage of dinutuximab	NCT02573896
Остеосаркома, саркома Юинга, нейробластома, рабдомиосаркома, опухоли ЦНС Osteosarcoma, Ewing's Sarcoma, Nephroblastoma, Rhabdomyosarcoma, Central Nervous System Tumors	Иммунотерапии солидных опухолей с использованием HLA- гаплоидентичного трансплантата и донорских NK Immunotherapy of solid tumors using HLA- haploidentical graft and donor NK	NCT02100891
Рецидивирующая/рефрактерная множественная миелома Recurrent/refractory multiple myeloma	Аллогенные NK-клетки (GIC-102) Allogeneic NK cells (GIC-102)	NCT05880043
Саркома мягких тканей Остеосаркома Саркома Юинга Гепатоцеллюлярная карцинома Soft-Tissue Sarcoma Osteosarcoma Ewing's sarcoma Hepatocellular carcinoma	Гаплоидентичные стволовые и NK-клетки Allogeneic stem and NK cells haploidentical donor	NCT01807468 NCT02008929
Рак желчевыводящих путей Biliary tract carcinoma	Аллогенные NK-клеток (SMT-NK) в комбинации с пембролизумабом Allogeneic NK cells (SMT-NK) in combination with pembrolizumab	NCT03937895

Таблица 1 (окончание)
Table 1 (continued)

Тип опухоли Tumor	Тип клеток для терапии Cell type for therapy	Номер исследования Identification number
Немелкоклеточный рак легкого (НМРЛ) Non-small cell lung cancer (NSCLC)	PB103 представляет собой аллогенные НК-клетки, полученные от здорового донора PB103 is an allogeneic NK cell obtained from a healthy donor	NCT04616209
Рак толстой кишки I стадии Colon cancer stage I	Аутологичные CIK НК-клетки Autologous CIK NK cells	NCT05394714
Рецидивирующая мультиформная глиобластома Recurrent glioblastoma multiforme	Аутологичные CIK НК-клетки Autologous CIK NK cells	NCT05108012
Новообразования молочной железы Breast neoplasms	Инфузии активируемых <i>ex vivo</i> аллогенных НК-клеток Infusions of <i>ex vivo</i> activated allogeneic NK cells	NCT05385705
Немелкоклеточный рак легкого (НМРЛ) на стадиях III A и III B Non-small cell lung cancer на стадиях III A и III B	CIK активированные аутологичные НК-клетки Autologous CIK-NK cells	NCT02118415
Солидные опухоли Solid tumors	Аутологичные НК-клетки Autologous NK cells	NCT05237206
Саркома Юинга Рабдомиосаркома Ewing's sarcoma Rhabdomyosarcoma	Активированные гаплоидентичные НК-клетки Autologous CIK-NK cells haploidentical donor	NCT02409576

IL-2 [2]. IL-15 также активирует жизнеспособность и пролиферацию НК-клеток и защищает их от активационно-индуцированной гибели (AICD) и имеет меньше побочных эффектов, чем IL-2. Однако было показано, что для получения значительных противоопухолевых эффектов требуются высокие дозы IL-15 [8].

Монотерапия IL-12 стимулирует продукцию IFN γ в НК-клетках и активирует апоптоз злокачественных клеток через индукцию TRAIL-/FasL [30]. Стимулированная повышением титра IFN γ воспалительная реакция подавляет экспрессию TGF- β и IL-10 в клетках TME [5].

IL-21 описывают как один из цитокинов, активирующих противоопухолевый иммунитет НК-клеток. Он способствует экспрессии генов, запускающих воспалительные реакции, и дифференцировку НК-клеток в цитотоксические CD56^{dim}/CD16⁺ [18]. Однако эффективность IL-21 в монотерапии оказалась ниже, чем предполагалось, поэтому он используется в схемах для лечения злокачественных новообразований в сочетании с другими цитокинами [44].

Альтернативой естественным цитокинам, как инженерное решение, был сконструирован химерный рекомбинантный белок ALT-803, который нарабатывается в клетках CHO [20] и представляет собой растворимый комплекс про-

теинов, состоящий из 2 вариантов IL-15 человека, связанный с димерным доменом рецептора IL-15R слитым с Fc-частью иммуноглобулина G1 (IgG1) человека. В проведенных клинических испытаниях (NCT02890758) ALT-803 поддерживал терапию аллогенными НК-клетками у пациентов с рецидивом. Показано, что ALT-803 стимулирует активацию и пролиферацию НК-клеток, не оказывая значительного влияния на увеличение количества Treg в крови пациента, а следовательно, не вызывая иммуносупрессию. По результатам испытаний 19% из 33 пациентов показали положительный результат терапии, включая одну полную ремиссию продолжительностью 7 месяцев (NCT01885897). Нежелательными явлениями были симптомы, связанные с временным повышением сывороточного IL-6 и IFN γ после внутривенного введения [24].

Активную пролиферацию и дифференцировку НК-клеток в средах для культивирования получили, используя фидерные клеточные линии. Преимущества перед методами добавления только цитокинов показывают более высокие уровни НК-клеток в крови после инфузии и повышенную цитотоксичность НК-клеток как *in vitro*, так и *in vivo*. Чаще всего для получения фидерных клеток используют линию K562 и созданные на ее основе генно-инженерные клетки, экспресси-

рующие химерные белки, состоящие из доменов цитокинов и молекул адгезии для экспонирования на клеточной мембране. Генно-инженерные фидерные линии созданы с повышенной экспрессией мембрано-связанных химерных рецепторов молекул IL-2 и IL-15, а также IL-12, IL-21 и IL-18. Клинические испытания (NCT03209869) генерированных NK-клеток с использованием таких методов совместного культивирования показывают их высокую эффективность.

Антитела как инженерный вариант преодоления злокачественной иммуносупрессии

Методики успешных клинических испытаний NK-терапии примененные к неоплазиям крови невозможно перенести на схемы лечения солидных опухолей из-за защиты опухоли микроокружением (TME). Поэтому одно из разрабатываемых направлений иммунотерапии — это создание «усилителей» или биологических инженерных решений, поддерживающих NK-терапию и делающих ее более селективной и адресной. Инженерные рекомбинантные белки направлены взаимодействовать с мишенями киллеров, блокируя ингибирующие сигналы опухоли или увеличивая вероятность образования иммунологических синапсов.

Антитела — усилители NKCE

Разработаны антитела — усилители (NKCE), состоящие из разных фрагментов моноклональных антител (mAbs). Эти фрагменты — эпитопы различных антител, а также доменов, связывающих «усилитель» с клеткой-киллером. Для этих целей используют эпитопы антител и связывающие домены белков: CD16, CD20, CD33, PD1 и PDL1, TRAIL/FasL, специфичные для злокачественных клеток лиганды MICA/B, HER-2/neu, CEA, MAGE 2, MAGE 3 и p53 [9]. Такие химерные белки могут взаимодействовать с несколькими лигандами на поверхности клетки и, следовательно, лучше удерживаться и «помечать» злокачественную клетку для белкового синапса с NK-клетками. Такие антитела обозначаются в соответствии с количеством доменов как биспецифические (BiKE), триспецифические киллеры (TriKE) или как усилители ROCK-engagers.

Антитела BiKE содержат два одноцепочечных вариабельных фрагмента и были разработаны для связывания с молекулой CD16 и опухолевыми антигенами. Антитела TriKE (NCT03214666) с тремя фрагментами scFv также необходимы для связи с CD16, опухолевым антигеном и содержат фрагмент IL-15 человека. Трифункциональные МАВ состоят из фрагментов, нацеленных на CD16, NKp46 и ассоциированных с опухолью антигенов CD19, CD20 или EGFR. Например, NKCE, состоящий из домена NKp46, который взаимодействует с опухолевым лигандом NKp44L, фрагмент, связывающийся с CD16 и опухолевый антиген (ТА) (NKp46/CD16А/ТА), показал большую противоопухолевую эффек-

тивность относительно ксенотрансплантатов В-клеточной лимфомы у мышей, чем МАВ-индуцирующие ADCC, только через рецептор CD16 на NK-клетках.

Также проходят клинические испытания химерные четырехвалентные антитела (NCT05883449, NCT04074746, NCT02321592, NCT02665650, NCT05883449). Так, AFM13 является первым четырехвалентным биспецифическим белком, состоящим из фрагментов антител к CD30/CD16А для иммунотерапии лейкозов NK-клетками [43]. Одно плечо AFM13 связывается с антигеном CD30 на опухолевых клетках, а другое — с антигеном CD16А на NK-клетках. Специфика этого инженерного белка не позволяет использовать его для солидных опухолей, которые не экспрессируют CD30.

Задачи, на решение которых направлено создание таких химерных молекул, можно разделить на три группы. Первая — неспецифичность терапии — разнообразные побочные эффекты, связанные с распознаванием и элиминацией структур трансплантата, в том числе приводящее к дополнительной разбалансировке работы иммунной системы. Вторая — преодоление иммуносупрессии TME и связанное с ней отсутствие или критичное снижение миграции терапевтических клеток к опухоли, а также изменение их активности, цитотоксичности при взаимодействии с опухолью и ее окружением. Третья — нестабильность или быстрая утилизация таких дополнительных компонентов NK-клеточного продукта, как полноразмерные антитела, а также их низкая способность проникать в строму опухоли.

Неспецифичность терапии может быть связана как с самим индивидуальным типом рака — экспрессией лигандов на злокачественных клетках, на которые нацелена терапия, так и с общими механизмами защиты опухоли иммуносупрессивным микроокружением, включая подавление экспрессии лиганда, что приводит к «нецелевой» терапии МАТ. Также неспецифичный иммунный ответ могут вызвать любые компоненты терапии, которые иммунная система пациента будет воспринимать как чужеродные. Организм пациента при введении в кровь рекомбинантных белков может распознавать их как антигены и вырабатывать на них иммунную защиту — антитела на препарат. Количество вырабатываемых антител зависит от размера, аминокислотного состава, строения и размера белка. Большие рекомбинантные белки со сложными эпитопами могут быть более удачной целью для аффинного связывания с антителом и, следовательно, вызывать более сильную иммунную реакцию. Для снижения такой реакции при дизайне белковых компонентов терапии обращают внимание на длину белковой цепи, аминокислотный состав, наличие чужеродных для организма человека сахаров

(например фукозы), аффинность к целевым и нецелевым лигандам, стабильность конструкции.

Наноантитела

Средний вес полноразмерных антител плацентарных млекопитающих около 150 kDa. Хрящевые рыбы вырабатывают антитела только с тяжелой цепью, эти антитела и названы наноантителами и обозначаются VHH. Верблюды, ламы и альпаки вырабатывают кроме полноразмерных антител также иммуноглобулины только с тяжелой цепью. Наноантитела имеют размеры в 4-10 раз меньше, чем полноразмерные, уровень распознавания иммунной системой такого белка, выделенного из сыворотки верблюда, значительно ниже, чем МАВ, выделенного из сыворотки мыши, благодаря аминокислотному составу, близкому к составу антител человека. Кроме размера, такие наноантитела имеют ряд преимуществ перед полноразмерными иммуноглобулинами. Даже участок, непосредственно связывающийся с эпитопом целевого лиганда (Fab-фрагмент), имеет большие размеры и менее стабилен, чем вариабельный фрагмент белков иммунной защиты. Они значительно стабильнее, не теряют биологической активности несколько суток, в отличие от традиционных из-за более простой структуры, отсутствия гликозилирования (сахара не отщепляются в процессе «жизни» белка в крови, не изменяя его свойства), мономерной димеризации. Показано, что наноантитела активно инфильтрируют строму опухоли, при этом значительно меньше распознаются иммунной системой. Некоторые из проходящих клинические испытания наноантител показывают сниженную иммунную реактивность относительно полноразмерных антител, даже при повторных введениях [45]. Так, клинические испытания NCT03214666 при наличии положительных результатов были прекращены «в связи с разработкой второго поколения препарата TriKE на основе верблюдовых наноантител».

Второй вариант снижения иммуногенности инженерного белка «усилителя» — использование в конструкции генетических последовательностей доменов белков *homo sapiens*, связывающихся с лигандами опухоли. К таким доменам относят: NKG2D, NKp46, NKp30 (NCT05734898, NCT03415100, NCT05213195, NCT02615665). NKCE, включающие такие домены антитела, проходят клинические и доклинические испытания. Кроме размера и стабильности на эффективность действия антител в строме опухоли влияет экспрессия лигандов на злокачественных клетках. Например, NKCE может воздействовать на опухоль, блокируя или используя для активирующего связывания лиганды, ингибирующие NK-клетки.

Инженерия Fc-фрагмента антител

Большинство инженерных NKCE для связи с NK-клетками содержат Fc-участок антитела,

который состоит из нескольких доменов, CH3, CH2, и, в зависимости от строения и сочетания структурных единиц, связывается с разными рецепторами иммунных клеток. Рецептор Fc-фрагментов антитела (FcR) подразделяется на несколько видов, в зависимости от типа антитела, которое распознают. Fc-гамма-рецепторы (FcγR) — одни из основных доменов, распознающих иммуноглобулины гамма. Они расположены на внешней мембране клетки, и этот тип рецепторов включает несколько видов, характерных для клеток иммунитета: FcγRI (CD64), FcγRII (CD32), FcγRIII (CD16) [14]. Fcγ-рецепторы отличаются своим сродством к Fc-участку IgG. Стабильность и распознавание Fc-рецептором участка иммуноглобулина также зависит от сахара, связанного с CH2 участком Fc-области полноразмерного IgG. Фукоза снижает сродство IgG к FcγRIII, а N-ацетилглюкозамин (GlcNAc) повышает адгезию к FcγRIII. Активация FcγRIII IgG вызывает высвобождение IFNγ, перфорина и гранзима — белков, которые попадают в клетку-мишень и вызывают ее апоптоз [34]. Такой тип реакции называется антителозависимая клеточная цитотоксичность (ADCC). Однако удачные инженерные решения, изменившие аминокислотный состав Fc-фрагмента, которые позволили в десятки раз повысить ADCC, как оказалось, несут высокие клинические риски. Описано, что все пациенты, участвующие в исследовании I фазы безопасности моноклонального антитела против CD28 TGN1412, погибли от цитокинового шторма [37]. Апробирование новых, безопасных инженерных вариантов связывания с рецептором CD16 NK-клеток поддерживает ряд клинических испытаний: NCT04551885, NCT04630769, NCT05069935, NCT04050709, NCT04927884. Однако если FcγRIII на NK-клетках распознает IgG, который не связан с антигеном, происходит ингибирование активности NK-клетки. Поэтому присутствие избыточного количества антител *in vitro* или *in vivo*, которые не «нашли» нужный агент на трансформированных клетках, будут подавлять активность клеток иммунитета. При целевом взаимодействии антитела с лигандами злокачественной клетки усиливается противоопухолевая активность иммунной системы.

NKG2D служит одним из основных активирующих рецепторов NK-клеток, который принимает участие во взаимодействии с клеткой-мишенью. Лигандами рецептора NKG2D являются белки, связывающиеся с экспонированными на поверхности клетки молекулами MHC I, MICА/MICВ и UL16-связывающимися белками (ULBP-1- ULBP-6) [32]. Эти лиганды почти отсутствуют в здоровых тканях, но их экспрессия индуцируется такими процессами, как повреждение ДНК, тепловой шок или злокачественная трансформация. При прогрессировании опухоли повышенная экспрессия лигандов рецептора

NKG2D и другие механизмы ускользания от иммунного надзора способствуют появлению высоких титров растворимых форм молекул sMICA/B в крови, что ассоциировано с плохим прогнозом [42]. Лиганды NKG2D рассматриваются в том числе как мишени для таргетной терапии, из-за чего использование этого рецептора входит в дизайн ряда клинических испытаний с участием модифицированных Т-клеток (NCT05248048, NCT05213195, NCT04623944) и испытания (NCT05462873) с усилителями NK-клеточной терапии.

Блокада ингибирующих сигналов для борьбы с метастатическими опухолями (рецепторы KIR (NCT01248455), NKG2A [1], TIGIT (NCT05327530), TIM-3 [7], EGFR (NCT05597839) и PD1 (NCT05461235, NCT05069935, NCT02843204) также изучается в ряде клинических и доклинических испытаний.

Для решения второй задачи — преодоление иммуносупрессии ТМЕ — в инженерную конструкцию вводят элементы, способные помочь NK-трансплантату преодолеть защитные механизмы опухоли, сбивающие хемокиновую систему «самонаведения», отвечающие за миграцию иммунных клеток и их проникновение в строму опухоли. Подавление активности экспрессии таких белков, как TGF- β и AHR в ткани опухоли, исследуется в ряде клинических испытаний.

Фактор TGF- β способен ключевым образом снижать продуктивное воспаление, подавлять цитотоксические свойства иммунных клеток, усиливать фиброз тканей, что создает механические препятствия для инфильтрации терапевтическими средствами опухоли [39]. Поэтому элементы терапии против TGF- β также часто включаются в дизайн иммунотерапии. К клиническим испытаниям таких конструкций можно отнести: NCT04991870 — исследование делеций рецептора TGF- β в инженерных NK-клетках, NCT05634369, NCT05887882 — устойчивое подавление реакции NK-клеток на TGF- β эпигенетическими (культуральными) методами.

Другая цель иммунотерапии — снижение иммуносупрессии ТМЕ за счет регуляции арилуглеводородного рецептора (AHR). AHR — это транскрипционный фактор, активируемый лигандом, который влияет на различные биологические функции, включая клеточную дифференцировку, злокачественную трансформацию, метаболизм и иммунную регуляцию. Антагонизм AHR повышает восприимчивость опухолевых клеток к цитотоксичности, опосредованной NK-клетками, и усиливает ADCC [46]. Также было показано, что активация AHR агонистами не влияет на индуцированную пролиферацию или продукцию цитокинов, но значительно подавляет литическую функцию NK-клеток. Проводятся два клинических испытания NCT04069026 и NCT04200963,

направленных на подавление экспрессии этого рецептора. Исследование по определению дозы ингибитора AhR проходит у пациентов с распространенными формами рака, метастатическими солидными опухолями и уротелиальной карциномой. Предполагается, что множественные цели NKCE в одной молекуле автоматически должны повышать «адресность» терапии белками-«усилителями» и снижать ингибирующее действие иммуносупрессирующих факторов, что в свою очередь будет уменьшать побочные эффекты.

CAR-NK-клетки

Взаимодействие NK-клеток с клетками злокачественных новообразований усиливают, создавая CAR-NK — модифицированные естественные киллеры, экспонирующие на поверхности белки с системой «самонаведения». Для неоплазий крови в состав CAR-клеток вводят элементы для взаимодействия с трансформированными лимфоцитами, экспрессирующими CD20, CD30, CD33, что обычно не применимо для солидных опухолей [31]. Эффект иммунотерапии CAR-NK зависит от эффективной миграции этих клеток к опухоли. Свежевыделенные NK-клетки, которые никогда не подвергались воздействию цитокинов, NK, активированные в течение ночи, менее чувствительны к индукции миграции некоторыми факторами, например семейства SDF. SDF-1 α необходим для рекрутирования CXCR4-экспрессирующих NK-клеток. EGFRvIII-специфические CAR-NK-клетки сравнили с аналогичными клетками CAR-NK, которые были сконструированы с доменом хемокинового рецептора CXCR4 [27]. Включение CXCR4 привело к специфическому хемотаксису к клеткам, экспрессирующим CXCL12/SDF1 α , и, как следствие, значительному увеличению выживаемости и длительной ремиссии у мышей с опухолевыми ксенотрансплантатами по сравнению с клетками CAR-NK без экспрессии CXCR4.

Иммунотерапия CAR-NK зависит от эффективной миграции этих клеток к опухоли, однако разработка генно-инженерных технологий целевой миграции пока находится в стадии доклинических испытаний, в том числе комбинированная терапия с использованием хемокинов, например CX3CL1 [11].

Таксис и инфильтрация NK-клетками опухолевой ткани с помощью наночастиц

Доставка в строму опухоли разнообразных частиц с поверхностным белковым или магнитным якорем — альтернативный подход к использованию стимулирующей активности иммунных агонистов без системной токсичности. Клинические испытания (NCT04751786) проходит PRECIOUS-01 — терапевтическое средство на основе синтезированных наночастиц полимолочной кислоты (PLGA). Эти наночастицы со-

четают два действующих вещества: активатор iNKT-клеток — IMM60 (треитолцерамид-6) и антиген к белку NY-ESO-1. PLGA биоразлагаемый полимер с минимальной системной токсичностью, одобренный FDA в США, для *in vivo* переноса лекарств [29]. Белок NY-ESO-1 — антиген рака яичка NY-ESO-1 также обнаруживается при ряде онкологических заболеваний. Наиболее часто экспрессирующими этот маркер опухолями являются липосаркома (89-100%), нейробластома (82%), синовиальная саркома (80%), меланома (46%), рак яичников (43%), опухоли молочной железы (46%) [40]. Поскольку в норме этот белок представлен в сердце, плаценте и яичках, такие факторы, как минимальная концентрация лекарства и его адресная доставка к ткани злокачественной опухоли, что можно сделать при использовании наночастиц, будут определять успех терапии и минимизацию побочных эффектов.

Другой из разрабатываемых технологий с искусственными наночастицами является применение внешнего магнитного поля, обеспечивающего таксис NK-клеток с магнитным якорем к опухолевой ткани [15]. Например, флуорофор Cu5.5, конъюгированный с магнетитом с кремнеземным покрытием ($\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$), в качестве магнитного якоря загружают в NK-клетки [33]. Внешнее магнитное поле создает возможность управлять движением клеток, содержащих наночастицы железа, а флуорофор визуализирует их миграцию. Исследователи показали, что инфильтрация стромы и противоопухолевая цитотоксичность меченных наночастицами NK-клеток увеличилась в 17 раз.

Экзосомы как инструмент для биотерапии

Наночастицы, полученные из NK-клеток — экзосомы, могут использоваться для доставки терапевтических веществ в опухолевую ткань [35]. Эти секретируемые клетками наноразмерные везикулы, которые переносят белки, липиды и нуклеиновые кислоты, в частности регуляторные микро-РНК, действуют как медиаторы в передаче сигналов между клетками [3]. Экзосомы осуществляют межклеточную коммуникацию между NK и клетками опухоли [28]. Физиологические изменения, включая гипоксию, ацидоз, провоспалительные механизмы, связанные с микроокружением опухоли, могут увеличивать скорость секреции экзосом. В различных доклинических исследованиях они использовались для доставки биологических таргетных и диагностических агентов [47]. В исследовании, когда IL-15 был включен в экзосомы, выделенные из клеток линии NK-92, наблюдался более сильный противоопухолевый эффект у мышей, несущих ксено-трансплантированные клетки глиобластомы, чем у экзосом и свободного IL-15 [48].

Экзосомы, происходящие из злокачественных клеток (TDE), влияют на активность NK-клеток. Иммунные клетки чувствительны к ре-

гуляторным эффектам, опосредованным TDE, и играют значительную роль в прогрессировании заболевания [13]. Экзосомы, полученные как из NK-клеток (NK-Exos), так и из злокачественных клеток (TDE), содержат высокие концентрации регуляторных молекул. NK-Exos включают CD16, CD69, NKp44, NKG2D, DNAM1, цитотоксические перфорин, гранулизин и гранзимы A и B [16]. Кроме того, NK-Exos индуцируют апоптоз раковых клеток, активируя каскад каспаз, взаимодействуя с рецепторами Fas/Fas-L [47]. В противовес этому TDE производят широкий ряд факторов, позволяющий им защищать опухоль, снижать активность NK-клеток и подготавливать метастатические ниши. Как потенциальные цели для анти-TDE-терапии изучаются Rab27a/b, EGFR, HMGB1, интегрины, HIF1a и другие мишени [19, 25]. Показано, что экзосомальные интегрины $\alpha_6\beta_4$ и $\alpha_6\beta_1$ способствуют метастазированию в легкие, $\alpha_v\beta_5$ связан с метастазированием в печень [12]. Эти интегрины рассматриваются не только как цель для блокировки, но и как маркер образования предметастатической ниши, и вызывают особый интерес исследователей при заболеваниях с высокими показателями метастазирования. Отсутствие блокады TDE позволяет опухоли подготавливать ниши иммуносупрессии для развития метастазов. Поэтому так важно соотношение между активностью и количеством NK-клеток, поддерживающих их терапевтических средств и агрессивностью и распространением самой опухоли.

Результаты различных клинических испытаний наночастиц показывают, что они позволяют эффективно снизить концентрацию терапевтического агента, биоразлагаемые частицы практически не оказывают системной токсичности, из-за малых размеров они легче проникают в строму опухоли, чем сами NK-клетки. Эти свойства позволяют наночастицам поддерживать терапию NK-клетками и инженерными антителами.

Заключение

Успех NK-клеточной иммунотерапии при лечении гемобластозов поддерживает интерес к поиску и разработке новых вариантов инженерных молекул, увеличивающих возможности этих клеток уничтожать или как минимум сдерживать рост солидных опухолей. Предположения о том, что множественные цели НКСЕ в одной молекуле будут повышать «адресность» терапии рекомбинантными белками, инициировали ряд клинических и доклинических исследований. Повышение специфичности терапии также достигается за счет использования антител нового поколения — наноантител, целевой блокировки TDE, а также доменов белков, усиливающих направленную миграцию NK-клеток, и терапевтических наночастиц.

Список литературы / References

1. André P., Denis C., Soulas C., Bourbon-Caillet C., Lopez J., Arnoux T., Bléry M., Bonnafous C., Gauthier L., Morel A., Rossi B., Remark R., Bresó V., Bonnet E., Habif G., Guia S., Lalanne A.I., Hoffmann C., Lantz O., Fayette J., Boyer-Chammard A., Zerbib R., Dodion P., Ghadially H., Jure-Kunkel M., Morel Y., Herbst R., Narni-Mancinelli E., Cohen R.B., Vivier E. Anti-NKG2A mAb is a checkpoint inhibitor that promotes anti-tumor immunity by unleashing both T and NK cells. *Cell*, 2018, Vol. 175, no. 7, pp. 1731-1743.e13.
2. Bachanova V., Cooley S., Defor T.E., Verneris M.R., Zhang B., McKenna D.H., Curtsinger J., Panoskaltsis-Mortari A., Lewis D., Hippen K., McGlave P., Weisdorf D.J., Blazar B.R., Miller J.S. Clearance of acute myeloid leukemia by haploidentical natural killer cells is improved using IL-2 diphtheria toxin fusion protein. *Blood*, 2014, Vol. 123, no. 25, pp. 3855-3863.
3. Batista I.A., Quintas S.T., Melo S.A. The interplay of exosomes and NK Cells in Cancer Biology. *Cancers (Basel)*, 2021, Vol. 13, 473. doi: 10.3390/cancers13030473.
4. Becker P.S., Suck G., Nowakowska P., Ullrich E., Seifried E., Bader P., Tonn T., Seidl C. Selection and expansion of natural killer cells for NK cell-based immunotherapy. *Cancer Immunol. Immunother.*, 2016, Vol. 65, no. 4, pp. 477-484.
5. Bogdan C., Vodovotz Y., Letterio J. TGF β and IL-10: inhibitory cytokines regulating immunity and the response to infection. In: Higgs G.A., Henderson B. (eds). *Novel Cytokine Inhibitors. Progress in Inflammation Research*. Birkhäuser, Basel, 2000, pp. 217-242.
6. Bremnes R.M., Al-Shibli K., Donnem T., Sirera R., Al-Saad S., Andersen S., Stenvold H., Camps C., Busund L.T. The role of tumor-infiltrating immune cells and chronic inflammation at the tumor site on cancer development, progression, and prognosis: emphasis on non-small cell lung cancer. *J. Thorac. Oncol.*, 2011, Vol. 6, no. 4, pp. 824-833.
7. de Mingo Pulido Á., Hänggi K., Celas D.P., Gardner A., Li J., Batista-Bittencourt B., Mohamed E., Trillo-Tinoco J., Osunmakinde O., Peña R., Onimus A., Kaisho T., Kaufmann J., McEachern K., Soliman H., Luca V.C., Rodriguez P.C., Yu X., Ruffell B. The inhibitory receptor TIM-3 limits activation of the cGAS-STING pathway in intra-tumoral dendritic cells by suppressing extracellular DNA uptake. *Immunity*, 2021, Vol. 54, no. 6, pp. 1154-1167.e7.
8. Hangasky J.A., Chen W., Dubois S.P., Daenthanasanmak A., Müller J.R., Reid R., Waldmann T.A., Santi D.V. A very long-acting IL-15: implications for the immunotherapy of cancer. *J. Immunother. Cancer*, 2022, Vol. 10, no. 1, e004104. doi: 10.1136/jitc-2021-004104.
9. Harwardt J., Carrara S.C., Bogen J.P., Schoenfeld K., Grzeschik J., Hock B., Kolmar H. Generation of a symmetrical trispecific NK cell engager based on a two-in-one antibody. *Front. Immunol.*, 2023, Vol. 14, 1170042. doi: 10.3389/fimmu.2023.1170042.
10. Hawke L.G., Mitchell B.Z., Ormiston M.L. TGF- β and IL-15 Synergize through MAPK pathways to drive the conversion of human NK cells to an innate lymphoid Cell 1-like phenotype. *J. Immunol.*, 2020, Vol. 204, no. 12, pp. 3171-3181.
11. Hertwig L., Hamann I., Romero-Suarez S., Millward J.M., Pietrek R., Chanvillard C., Stuis H., Pollok K., Ransohoff R.M., Cardona A.E., Infante-Duarte C. CX3CR1-dependent recruitment of mature NK cells into the central nervous system contributes to control autoimmune neuroinflammation. *Eur. J. Immunol.*, 2016, Vol. 46, pp. 1984-1996.
12. Hoshino A., Costa-Silva B., Shen T.L., Rodrigues G., Hashimoto A., Tesic Mark M., Molina H., Kohsaka S., di Giannatale A., Ceder S., Singh S., Williams C., Slop N., Uryu K., Pharmed L., King T., Bojmar L., Davies A.E., Ararso Y., Zhang T., Zhang H., Hernandez J., Weiss J.M., Dumont-Cole V.D., Kramer K., Wexler L.H., Narendran A., Schwartz G.K., Healey J.H., Sandstrom P., Labori K.J., Kure E.H., Grandgenett P.M., Hollingsworth M.A., de Sousa M., Kaur S., Jain M., Mallya K., Batra S.K., Jarnagin W.R., Brady M.S., Fodstad O., Muller V., Pantel K., Minn A.J., Bissell M.J., Garcia B.A., Kang Y., Rajasekhar V.K., Ghajar C.M., Matei I., Peinado H., Bromberg J., Lyden D. Tumour exosome integrins determine organotropic metastasis. *Nature*, 2015, Vol. 527, no. 7578, pp. 329-335.
13. Hosseini R., Sarvnaz H., Arabpour M., Ramshe S.M., Asef-Kabiri L., Yousefi H., Akbari M.E., Eskandari N. Cancer exosomes and natural killer cells dysfunction: biological roles, clinical significance and implications for immunotherapy. *Mol. Cancer*, 2022, Vol. 21, no. 1, 15. doi: 10.1186/s12943-021-01492-7.
14. Indik Z.K., Park J.G., Hunter S., Schreiber A.D. Structure/function relationships of Fc gamma receptors in phagocytosis. *Semin. Immunol.*, 1995, Vol. 7, no. 1, pp. 45-54.
15. Jang E.S., Shin J.H., Ren G., Park M.J., Cheng K., Chen X., Wu J.C., Sunwoo J.B., Cheng Z. The manipulation of natural killer cells to target tumor sites using magnetic nanoparticles. *Biomaterials*, 2012, Vol. 33, no. 22, pp. 5584-5592.
16. Jong A.Y., Wu C.H., Li J., Sun J., Fabbri M., Wayne A.S., Seeger R.C. Large-scale isolation and cytotoxicity of extracellular vesicles derived from activated human natural killer cells. *J. Extracell. Vesicles*, 2017 Vol. 6, 1294368. doi: 10.1080/20013078.2017.1294368.
17. Koehl U., Brehm C., Huenecke S., Zimmermann S.Y., Kloess S., Bremm M., Ullrich E., Soerensen J., Quaiser A., Erben S., Wunram C., Gardlowski T., Auth E., Tonn T., Seidl C., Meyer-Monard S., Stern M., Passweg J., Klingebiel T., Bader P., Schwabe D., Esser R. Clinical grade purification and expansion of NK cell products for an optimized manufacturing protocol. *Front. Oncol.*, 2013, Vol. 17, no. 3, 118. doi: 10.3389/fonc.2013.00118.
18. Li Q., Ye L.J., Ren H.L., Huan T., Li J., Shi J.L., Huang Q.S. Multiple effects of IL-21 on human NK cells in ex vivo expansion. *Immunobiology*, 2015, Vol. 220, no. 7, pp. 876-888.

19. Li Y., Chen Z.K., Duan X., Zhang H.J., Xiao B.L., Wang K.M., Chen G. Targeted inhibition of tumor-derived exosomes as a novel therapeutic option for cancer. *Exp. Mol. Med.*, 2022, Vol. 54, no. 9, pp. 1379-1389.
20. Liu B., Kong L., Han K., Hong H., Marcus W.D., Chen X., Jeng E.K., Alter S., Zhu X., Rubinstein M.P., Shi S., Rhode P.R., Cai W., Wong H.C. A Novel Fusion of ALT-803 (Interleukin (IL)-15 Superagonist) with an Antibody Demonstrates Antigen-specific Antitumor Responses. *J. Biol. Chem.*, 2016, Vol. 291, no. 46, pp. 23869-23881.
21. Lizana-Vasquez G.D., Torres-Lugo M., Dixon R.B., Powderly J.D. 2nd, Warin R.F. The application of autologous cancer immunotherapies in the age of memory-NK cells. *Front. Immunol.*, 2023, Vol. 14, 1167666. doi: 10.3389/fimmu.2023.1167666.
22. Machuldova A., Holubova M., Caputo V.S., Cedikova M., Jindra P., Houdova L., Pitule P. Role of polymorphisms of NKG2D receptor and its ligands in acute myeloid leukemia and human stem cell transplantation. *Front Immunol*, 2021, Vol. 30, no. 12, 651751. doi: 10.3389/fimmu.2021.651751.
23. Mahdavi Firouzabadi B., Gigliobianco M.R., Joseph J.M., Censi R., Di Martino P. Design of nanoparticles in cancer therapy based on tumor microenvironment properties. *Pharmaceutics*, 2022, Vol. 14, no. 12, 2708. doi: 10.3390/pharmaceutics14122708.
24. Miller D., Egan J.O., Jeng E.K., Rock A., Wong H.C., Fehniger T.A., Miller J.S. First-in-human phase 1 clinical study of the IL-15 superagonist complex ALT-803 to treat relapse after transplantation. *Blood*, 2018, Vol. 13, no. 23, pp. 2515-2527.
25. Morrissey S.M., Zhang F., Ding C., Montoya-Durango D.E., Hu X., Yang C., Wang Z., Yuan F., Fox M., Zhang H.G., Guo H., Tieri D., Kong M., Watson C.T., Mitchell R.A., Zhang X., McMasters K.M., Huang J., Yan J. Tumor-derived exosomes drive immunosuppressive macrophages in a pre-metastatic niche through glycolytic dominant metabolic reprogramming. *Cell Metab.*, 2021, Vol. 3, no. 10, pp. 2040-2058.e10.
26. Morton L.T., Wachsmann T.L.A., Meeuwse M.H., Wouters A.K., Remst D.F.G., van Loenen M.M., Falkenburg J.H.F., Heemskerk M.H.M. T cell receptor engineering of primary NK cells to therapeutically target tumors and tumor immune evasion. *J. Immunother. Cancer*, 2022, Vol. 10, no. 3, e003715. doi: 10.1136/jitc-2021-003715.
27. Müller N., Michen S., Tietze S., Töpfer K., Schulte A., Lamszus K., Schmitz M., Schackert G., Pastan I., Temme A. Engineering NK cells modified with an EGFRvIII-specific chimeric antigen receptor to overexpress CXCR4 improves immunotherapy of CXCL12/SDF-1 α -secreting glioblastoma. *J. Immunother.*, 2015, Vol. 38, no. 5, pp. 197-210.
28. Myers J.A., Miller J.S. Exploring the NK cell platform for cancer immunotherapy. *Nat. Rev. Clin. Oncol.*, 2021, Vol. 18, no. 2, pp. 85-100.
29. Nimesh S. 15 – Poly(D,L-lactide-co-glycolide)-based nanoparticles. In Woodhead Publishing Series in Biomedicine, Gene Therapy, Woodhead Publishing, 2013, pp. 309-329.
30. Oka N., Markova T., Tsuzuki K., Li W., El-Darawish Y., Pencheva-Demireva M., Yamanishi K., Yamanishi H., Sakagami M., Tanaka Y., Okamura H. IL-12 regulates the expansion, phenotype, and function of murine NK cells activated by IL-15 and IL-18. *Cancer Immunol. Immunother.*, 2020, Vol. 69, no. 9, pp. 1699-1712.
31. Raponi S., De Propriis M.S., Intoppa S., Milani M.L., Vitale A., Elia L., Perbellini O., Pizzolo G., Foà R., Guarini A. Flow cytometric study of potential target antigens (CD19, CD20, CD22, CD33) for antibody-based immunotherapy in acute lymphoblastic leukemia: analysis of 552 cases. *Leuk. Lymphoma*, 2011, Vol. 52, no. 6, pp. 1098-107.
32. Raulet D.H., Gasser S., Gowen B.G., Deng W., Jung H. Regulation of ligands for the NKG2D activating receptor. *Annu. Rev. Immunol.*, 2013, Vol. 31, pp. 413-441.
33. Savitsky K., Yu X. Combined strategies for tumor immunotherapy with nanoparticles. *Clin. Transl. Oncol.*, 2019, Vol. 21, no. 11, pp. 1441-1449.
34. Saxena A., Wu D. Advances in Therapeutic Fc Engineering – modulation of IgG-associated effector functions and serum half-life. *Front. Immunol.*, 2016, Vol. 7, 580. doi: 10.3389/fimmu.2016.00580.
35. Shen M., Ren X. New insights into the biological impacts of immune cell-derived exosomes within the tumor environment. *Cancer Lett.*, 2018, Vol. 431, pp. 115-122. doi: 10.1016/j.canlet.2018.05.040.
36. Sivakumar P.V., Garcia R., Waggle K.S., Anderson-Haley M., Nelson A., Hughes S.D. Comparison of vascular leak syndrome in mice treated with IL21 or IL2. *Comp. Med.*, 2013, Vol. 63, no. 1, pp. 13-21.
37. Suntharalingam G., Perry M.R., Ward S., Brett S.J., Castello-Cortes A., Brunner M.D., Panoskaltsis N. Cytokine storm in a Phase I trial of the anti-CD28 monoclonal antibody TGN1412. *N. Engl. J. Med*, 2006, Vol. 355, no. 10, pp. 1018-1028.
38. Szyska M., Na I.K. Bone Marrow GvHD after Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Front. Immunol.*, 2016, Vol. 30, no. 7, 118. doi: 10.3389/fimmu.2016.00118.
39. Thomas B.J., Kan-O K., Loveland K.L., Elias J.A., Bardin P.G. In the shadow of fibrosis: innate immune suppression mediated by transforming growth factor- β . *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, 2016, Vol. 55, no. 6, pp. 759-766.
40. Thomas R., Al-Khadairi G., Roelands J., Hendrickx W., Dermime S., Bedognetti D., Decock J. NY-ESO-1 based immunotherapy of cancer: current perspectives. *Front. Immunol.*, 2018, Vol. 9, 947. doi: 10.3389/fimmu.2018.00947.
41. Viel S., Marçais A., Guimaraes F.S., Loftus R., Rabilloud J., Grau M., Degouve S., Djebali S., Sanlaville A., Charrier E., Bienvenu J., Marie J.C., Caux C., Marvel J., Town L., Huntington N.D., Bartholin L., Finlay D., Smyth M.J., Walzer T. TGF- β inhibits the activation and functions of NK cells by repressing the mTOR pathway. *Sci. Signal.*, 2016, Vol. 9, no. 415, ra19. doi: 10.1126/scisignal.aad1884.

42. von Lilienfeld-Toal M., Frank S., Leyendecker C., Feyler S., Jarmin S., Morgan R., Glasmacher A., Märten A., Schmidt-Wolf I.G., Brossart P., Cook G. Reduced immune effector cell NKG2D expression and increased levels of soluble NKG2D ligands in multiple myeloma may not be causally linked. *Cancer Immunol. Immunother.*, 2010, Vol. 59, no. 6, pp. 829-839. doi: 10.1007/s00262-009-0807-3.
43. Wu J., Fu J., Zhang M., Liu D. AFM13: a first-in-class tetravalent bispecific anti-CD30/CD16A antibody for NK cell-mediated immunotherapy. *J. Hematol. Oncol.*, 2015, Vol. 8, 96. doi: 10.1186/s13045-015-0188-3.
44. Wu S., Sun R., Tan B., Chen B., Zhou W., Gao D.S., Zhong J., Huang H., Jiang J., Lu B. The half-life-extended IL21 can be combined with multiple checkpoint inhibitors for tumor immunotherapy. *Front. Cell Dev. Biol.*, 2021, Vol. 9, 779865. doi: 10.3389/fcell.2021.779865.
45. Wu Y., Jiang S., Ying T. Single-domain antibodies as therapeutics against human viral diseases. *Front. Immunol.*, 2017, Vol. 8, 1802. doi: 10.3389/fimmu.2017.01802.
46. Xue P., Fu J., Zhou Y. The aryl hydrocarbon receptor and tumor immunity. *Front. Immunol.*, 2018, Vol. 9, 286. doi: 10.3389/fimmu.2018.00286.
47. Zhu L., Kalimuthu S., Gangadaran P., Oh J.M., Lee H.W., Baek S.H., Jeong S.Y., Lee S.W., Lee J., Ahn B.C. Exosomes derived from natural killer cells exert therapeutic effect in melanoma. *Theranostics*, 2017, Vol. 7, no. 10, pp. 2732-2745.
48. Zhu L., Kalimuthu S., Oh J.M., Gangadaran P., Baek S.H., Jeong S.Y., Lee S.W., Lee J., Ahn B.C. Enhancement of antitumor potency of extracellular vesicles derived from natural killer cells by IL-15 priming. *Biomaterials*, 2019, Vol. 190-191, pp. 38-50.

Авторы:

Воробьева И.Г. — к.б.н., старший научный сотрудник отдела по разработке и исследованиям в области иммунологии компании ООО «Текон МП», Москва, Россия

Абакушина Е.В. — д.м.н., руководитель отдела по разработке и исследованиям в области иммунологии компании, заместитель генерального директора ООО «Текон МП»; заведующая лабораторией иммунологии и аутоиммунных заболеваний отдела молекулярной онкологии и иммунологии ГНЦ РФ ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр эндокринологии» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Authors:

Vorobyova I.G., PhD (Biology), Senior Research Associate, Department for Development and Research in the Field of Immunology, LLC "Tecon MP", Moscow, Russian Federation

Abakushina E.V., PhD, MD (Medicine), Head, Department for Development and Research in the Field of Immunology, Deputy General Director, LLC "Tecon MP"; Head, Laboratory of Immunology and Autoimmune Diseases, Department of Molecular Oncology and Immunology, National Medical Research Center for Endocrinology, Moscow, Russian Federation

Поступила 29.11.2023
Принята к печати 09.03.2024

Received 29.11.2023
Accepted 09.03.2024

ИНТЕРЛЕЙКИН-40 – НОВЫЙ ЦИТОКИН

Монирех Аскарзаде¹, Мохаммад Реза Атаоллахи²,
Закра Шокролахи², Мохаммад Реза Аташхар²

¹ Школа медицины, Медицинский университет Мазандаран, г. Сари, Иран

² Школа медицины, Медицинский университет Фаса, г. Фаса, Иран

Резюме. IL-40, известный также как C17orf99, является интересным недавно открытым цитокином — новым белком, секретируемым В-клетками. Он экспрессируется у некоторых млекопитающих и продуцируется в костном мозге и фетальной печени. Помимо первичной роли поддержания гомеостаза, созревания и развития В-клеток, IL-40 играет также важную роль в гуморальном иммунном ответе, в частности в продукции антител, особенно класса IgA. Имеется также взаимосвязь между IL-40 и экспрессией маркеров внеклеточных нейтрофильных ловушек (NETosis). Кроме участия в нормальном функционировании В-клеток, IL-40 вовлечен в патогенез ряда заболеваний. Исследования предполагают связь между IL-40 и ревматоидным артритом, гепатоцеллюлярной карциномой, неходжкинскими лимфомами, синдромом Шегрена, рSS-ассоциированными лимфомами, аутоиммунной патологией щитовидной железы, сахарным диабетом 2-го типа, анкилозирующим спондилитом, хронической обструктивной болезнью легких и системной красной волчанкой. Это предполагает возможность применения IL-40 в качестве биомаркера в диагностике и лечении этих заболеваний. Однако, несмотря на эти важные результаты, следует еще многое понять относительно цитокина IL-40. Необходимы дальнейшие исследования для выяснения других свойств и функций этого цитокина. Дальнейшие работы направлены на уточнение механизмов, по которым IL-40 влияет на биологию В-клеток и гуморальный иммунитет, а также его роли в патогенезе заболеваний. Эти исследования помогут определить потенциальные области его терапевтического применения и использования в качестве диагностического маркера. Цель данного мини-обзора — обсуждение современных результатов, касающихся IL-40.

Ключевые слова: IL-40, C17orf99, орфанные цитокины, биомаркер

INTERLEUKIN 40, A NOVEL CYTOKINE

Monireh Askarzadeh^a, Mohammad Reza Ataollahi^b,
Zahra Shokrolahi^b, Mohammad Reza Atashzar^b

^a School of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

^b School of Medicine, Fasa University of Medical Sciences, Fasa, Iran

Abstract. IL-40, also known as C17orf99, is an intriguing cytokine that has recently been discovered as a novel protein secreted by B cells. It is expressed in specific mammals and is derived from the bone marrow and

Адрес для переписки:

Мохаммад Реза Аташхар
Школа медицины, Медицинский университет Фаса
Тел.: +98 917 332 9588.
E-mail: mr.atashzar@yahoo.com

Address for correspondence:

Mohammad Reza Atashzar
School of Medicine, Fasa University of Medical Sciences
Phone: +98 917 332 9588.
E-mail: mr.atashzar@yahoo.com

Образец цитирования:

Монирех Аскарзаде, Мохаммад Реза Атаоллахи,
Закра Шокролахи, Мохаммад Реза Аташхар
«Интерлейкин 40 – новый цитокин» // Медицинская
иммунология, 2024. Т. 26, № 6. С. 1177-1182.
doi: 10.15789/1563-0625-IAN-2892

© Монирех Аскарзаде и соавт., 2024
Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

Monireh Askarzadeh, Mohammad Reza Ataollahi,
Zahra Shokrolahi, Mohammad Reza Atashzar "Interleukin
40, a novel cytokine", Medical Immunology (Russia)/
Meditsinskaya Immunologiya, 2024, Vol. 26, no. 6,
pp. 1177-1182.
doi: 10.15789/1563-0625-IAN-2892

© Monireh Askarzadeh et al., 2024
The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License
DOI: 10.15789/1563-0625-IAN-2892

fetal liver. While its primary role is in maintaining B cell homeostasis and promoting B cell maturation and development, IL-40 also plays a crucial role in humoral immunity, particularly in the production of antibodies, with a specific emphasis on IgA production. As well as there are relationship between IL-40 and neutrophil extracellular traps externalization (NETosis) markers. In addition to its involvement in normal B cell functions, IL-40 has been found to have significant implications in the pathogenesis of several diseases. Research has linked IL-40 to rheumatoid arthritis, hepatocellular carcinoma, non-Hodgkin B cell lymphoma, Sjogren's syndrome, pSS-associated NHL, autoimmune thyroid disease, Type 2 diabetes mellitus, ankylosing spondylitis, chronic obstructive pulmonary disease, and systemic lupus erythematosus. This suggests that IL-40 could potentially serve as a diagnostic or treatment biomarker for these conditions. However, despite these exciting findings, there is still much to be learned about IL-40. Further research is necessary to uncover additional properties and functions of this cytokine. Ongoing studies aim to elucidate the mechanisms by which IL-40 contributes to B cell biology and humoral immunity, as well as its role in disease pathogenesis. These investigations will help determine the potential therapeutic applications of IL-40 and its utility as a diagnostic marker. In this minireview, we aim to discuss the recent findings surrounding IL-40.

Keywords: IL-40, C17orf99, orphan cytokines, biomarker

Introduction

Cytokines are regulator proteins or glycoproteins that play crucial roles in the regulation, activation, and development of the immune response, inflammation, cell differentiation, cell growth, cell death, development, angiogenesis, and homeostasis. They are either membrane-bound or secreted [4, 24, 25].

Cytokines have been divided into diverse family groups based on their structural homologies, receptors, function, and cellular source; for example, they have been classified into interleukins (ILs), tumor necrosis factors (TNFs), lymphokines, monokines, interferons (IFNs), and transforming growth factors (TGFs), or categorized as type 1 cytokines that produced by T helper 1 (Th1) cells, including IL-2, TNF β , IFN γ and IL-12; and type 2 cytokines that produced by Th2 cells, including IL-4, IL-5, IL-10, and IL-13, or categorized as pro-inflammatories including TNF α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12 and interferons or anti-inflammatories such as IL-1 receptor antagonist (IL-1RA), TGF- β and IL-4, IL-6, IL-10, IL-11, IL-13 [16]. Cytokines with shared structural features belong to the same family and are developed through gene duplication from ancient precursors [4].

Interleukin production is self-limited because of the transient synthesis of messenger RNA. They can up and down-regulate intracellular mechanisms by inducing genes that encode for cytokine receptor inhibitors [34]. Interleukin 40, which was discovered in 2017 by Catalan-Dibene et al., is the most recent of the forty interleukins that have been identified to date [4, 6, 25]. They examined a big database of genes expressed by human immune system organs, including tonsils, thymus, bone marrow, fetal liver, spleen and lymph node. The researchers then hypothesized that the C17orf99 gene could encode a

protein (27 kDa) that could be expressed and secreted by activated B cells, bone marrow, and fetal liver. They found that the source of mouse C17orf99 is stromal cells (Lin⁻CD45⁺CD51⁻ cells) in the bone marrow [4]. CD45⁺CD51⁻ cells consist of mature stromal cells that facilitate lymphopoiesis and hematopoiesis [8]. Therefore, lymphopoiesis-participating stromal cells produce mouse C17orf99. Additionally, fewer B220⁺ and pre-B cells were detected in the bone marrow of C17orf99^{-/-} mice [4]. On the other hand, lymphopoiesis occurs in the fetal liver and bone marrow, both of which express C17orf99 or IL-40 so C17orf99 is involved in development of B cell and has function in the bone marrow and fetal liver [4].

Characterization of Interleukin 40 and sources

IL-40, also known as C17orf99 (chromosome 17 open reading frame 99), is a secreted protein associated with the C17orf99 gene by small size of approximately 27 kD [4, 20]. It consists of 265 amino acids, and 20-amino acid signal peptide [6] and is only expressed in mammals [4, 20]. IL-40 is considered a cytokine associated with B cells [2].

It is derived from activated B cells, bone marrow and fetal liver. Catalan-Dibene et al. demonstrated that mouse spleen B cells and murine B cell lymphoma A20-2J could also produce it [4, 6]. Human B cells express IL-40 when stimulated by TGF-1, IL-4, anti-IgM and anti-CD40 mAb [4, 6, 20].

IL-40 has unique structural properties and does not belong to any cytokine family; therefore, it is one of the few "orphan" cytokines, along with IL-32 and IL-34 [6].

Functions of IL-40

Bioinformatics analyses revealed that the C17orf99 gene is exclusive to mammals, indicating that its functions are related to a mammalian-specific func-

tion, such as a mammalian-specific immune system. IL-40^{-/-} mice lacked B220⁺ cells (pre-B cells) in the bone marrow and all B cell populations including follicular, transitional, and marginal zone in the spleen, compared to wild-type mice. These findings confirm that IL-40 plays a role in the homeostasis and maturation of B cells in the bone marrow and periphery. A general IgA deficiency and a significant reduction in the IgA concentration of the milk of lactating IL-40^{-/-} mice are also observed. The lack of IL-40 in the gut of IL-40^{-/-} mice resulted in a significantly decreased number of IgA⁺ B cells in Peyer's patches (PPs) and dysregulated microbiota, which decreased the number and size of PPs. IL-40^{-/-} mice demonstrated a significant decrease in Firmicutes and an increase in Bacteroidetes compared to wild type. These results suggested that IgA production, particularly at the mucosal barriers, and decreased IgA levels in the gut of IL-40^{-/-} mice influence the diversity of the gut microbiome [4, 6, 7].

IL-40 and diseases

Rheumatoid arthritis (RA)

RA is a long term autoimmune disorder marked by joint inflammation and multiple extraarticular manifestations. It is marked by a progressive joint disorder, severe pain, functional disability [30, 31, 33, 36]. The complex pathogenesis of RA involves Th1 and Th17, activated B cells, plasma cells, synovial cell proliferation, fibrosis is focused in the synovial joint [12, 13, 19].

Adela Navratilova and colleagues evaluated expression levels of IL-40 in the synovial fluid and serum of systemic lupus erythematosus (SLE), osteoarthritis (OA) and RA patients. The researchers analyzed the relationship between IL-40 and neutrophil extracellular traps externalization (NETosis) markers, cytokines, autoantibodies, and disease activity as well as the changes in expression levels of IL-40 in RA patients after B cell depletion with rituximab. The researchers discovered that the expression of IL-40 was elevated in the synovial fluid and serum of RA patients compared to those of OA, HC, and SLE patients. After 16 and 24 weeks of treatment with rituximab, the serum level of IL-40 in RA patients decreased relative to HC, OA, and SLE. IL-40 serum and synovial fluid levels were correlated with anti-cyclic citrullinated peptide (anti-CCP) and rheumatoid factor-IgM. IL-40 levels in synovial fluid were also associated with neutrophil attractants IL-8, markers of NETosis including proteinase 3 and neutrophil elastase, MIP-1, synovial fluid leukocyte count, and disease activity score DAS28. Synovial fibroblasts secreted more MMP-13, MCP-1, and IL-8 in response to IL-40. These findings indicate

that IL-40 has important roles in the pathogenesis, inflammation and tissue destruction of RA [20]. In addition, Zahraa A.G. Al Ghuraibawi et al. demonstrated that IL-40 is a potential biomarker for RA patients [2].

Hepatocellular carcinoma (HCC)

HCC is a prevalent form of primary liver cancer that arises from hepatocytes. Cirrhosis, hepatitis B and C, and fibrosis resulting from metabolic liver disease are major risk factors in the development of HCC [3, 21, 22]. Chronic inflammation in the liver alters the innate and adaptive immune response, resulting in the development of tumors. The interaction between regulatory T cells with Tumor-Associated Macrophages (TAMs) and also Myeloid-Derived Suppressor Cells (MDSCs) generates several changes in MHCII expression, downstream T cell activation and chemokine production that are associated with immunosuppression and also development of HCC. During the progression of HCC, signaling pathways of IL-10 and TGF and long noncoding RNAs (lncRNAs) also activate Tregs [32].

Noha Mohamed Said found a significant amplification in IL-40 serum levels in patients with HCC compared to the control group. Therefore, their findings suggested a potential relationship between IL-40 and early HCC diagnosis, but the role of IL-40 in HCC development and pathogenesis remains unclear [35].

Lymphoma

Multiple human non-Hodgkin B cell lymphoma cell lines, including Val, HL-2 and OCI-Ly1 contained IL-40, suggesting it may play a role in lymphoma pathogenesis. The high levels of B cell activation Ag TSPAN33 in peripheral blood B cells activated with IL-4 and anti-CD40 confer a "activated" B cell phenotype to IL40⁺ lymphomas [4]. However, Ovidiu Farc denied any known association between IL-40 and cancer [7].

Sjogren's syndrome (pSS) and pSS-related lymphoma

SS is autoimmune disease characterized by lymphoplasmacytic infiltration of the exocrine glands that results in keratoconjunctivitis sicca and xerostomia [15]. In addition to the classic sicca syndrome, systemic manifestations of the disease, such as arthritis, interstitial lung disease, neurological disorders, and an increased risk of lymphoma, have been reported [18, 29]. Primary systemic sclerosis (pSS), which occurs in the absence of other autoimmune diseases, and secondary systemic sclerosis (sSS), which is associated with other autoimmune diseases such as systemic lupus erythematosus (SLE), systemic

sclerosis (SSc) and rheumatoid arthritis (RA) are the two types of SS [10, 26].

C. Rizzo et al. obtained minor salivary gland biopsies or Paraffine-embedded samples from patients with pSS, pSS-associated non-Hodgkin lymphoma (NHL), and non-specific chronic sialoadenitis (nSCS) as controls. Measuring IL-4, IL-40, and TGF- β 1 and serum levels of IL-40 by ELISA, and cellular sources of IL-40 revealed that both the IL-40 mRNA and protein level were significantly elevated in the inflamed salivary glands and serum of patients with pSS and parotid glands of pSS-associated NHL and was correlated with the presence of TGF- β and IL-4 that both were significantly increased in pSS patients. Among infiltrating cells, CD68⁺ macrophages, CD4⁺CD8⁺T cells and CD19⁺B cells are sources of IL-40. Consequently, their findings revealed the significance of IL-40 in the pathogenesis of pSS and pSS-associated NHL [9].

Chronic obstructive pulmonary disease (COPD)

In a rat model of COPD, there is a correlation between SIgA deficiency and the severity of airflow obstruction. Under the influence of hydrogen inhalation, IL-40, along with other components (IL-4, IL-5, and PIgR), could increase the production of IgA, thereby alleviate the symptoms of COPD [8].

Conclusion

IL-40, a novel B lymphocyte cell cytokine with a unique structure, has an important role in B cell homeostasis, B cell development, antibody production, particularly IgA production, humoral immunity, and barrier functions. Also, IL-40 may also involve in the pathogenesis of several diseases, including RA, HCC, non-Hodgkin B cell lymphoma, pSS, and pSS-associated NHL. More research is required to clarify the functions and signaling pathways of IL-40.

Compliance with ethical standards

Funding

The authors received no financial support for the research, authorship, or publication of this article.

Conflict of interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Ethical approval

This article does not contain any studies with human participants or animals performed by any of the authors.

Data availability statement

Data sharing is not applicable to this article as no new data were created or analyzed in this study.

References

1. Abed R.M., Abdulmalek H.W., Yaaqoob L.A., Altaee M.F., Kamona Z.K. Serum level and genetic polymorphism of IL-38 and IL-40 in autoimmune thyroid disease. *Iraqi J. Sci.*, 2023, Vol. 64, no. 6, pp. 2786-2797.
2. Al Ghuraibawi Z.A., Sharquie I.K., Gorial F.I. Diagnostic potential of interleukin-40 (IL-40) in rheumatoid arthritis patients. *Egypt. Rheumatol.*, 2022, Vol. 44, no. 4, pp. 377-280.
3. Balogh J., Victor D. III, Asham E.H., Burroughs S.G., Boktour M., Saharia A., Li X., Ghobrial R.M., Monsour H.P. Jr. Hepatocellular carcinoma: a review. *J. Hepatocell. Carcinoma*, 2016, Vol. 3, pp. 41-53.
4. Catalan-Dibene J., McIntyre L.L., Zlotnik A. Interleukin 30 to interleukin 40. *J. Interferon Cytokine Res.*, 2018, Vol. 38, no. 10, pp. 423-439.
5. Catalan-Dibene J., Vazquez M.I., Luu V.P., Nuccio S.-P., Karimzadeh A., Kastenschmidt J.M., Villalta S.A., Ushach I., Pone E.J., Casali P., Raffatellu M., Burkhardt A.M., Hernandez-Ruiz M., Heller G., Hevezi P.A., Zlotnik A. Identification of IL-40, a novel B cell-associated cytokine. *J. Immunol.*, 2017, Vol. 199, no. 9, pp. 3326-3335.
6. Chan C.K., Seo E.Y., Chen J.Y., Lo D., McArdle A., Sinha R., Tevlin R., Seita J., Vincent-Tompkins J., Wearda T., Lu W.-J., Senarath-Yapa K., Chung M.T., Marecic O., Tran M., Yan K.S., Upton R., Walmsley G.G., Lee A.S., Sahoo D., Kuo C.J., Weissman I.L., Longaker M.T. Identification and specification of the mouse skeletal stem cell. *Cell*, 2015, Vol. 160, no. 1, pp. 285-298.
7. Farc O., Cristea V. Pro-and antitumor role of the interleukins 1 to 41. *Rom. Arch. Microbiol. Immunol.*, 2019, Vol. 78, pp. 149-162.
8. Fox R.I., Kang H.-I. Pathogenesis of Sjögren's syndrome. *Rheum. Dis. Clin. North Am.*, 1992, Vol. 18, no. 3, pp. 517-538.
9. Fox R.I., Michelson P. Approaches to the treatment of Sjögren's syndrome. *J. Rheumatol. Suppl.*, 2000, Vol. 61, pp. 15-21.
10. Goules A.V., Tzioufas A.G. Lymphomagenesis in Sjögren's syndrome: predictive biomarkers towards precision medicine. *Autoimmun. Rev.*, 2019, Vol. 18, no. 2, pp. 137-143.

11. Guggino G., Rizzo C., Mohammadnezhad L., Pizzo M.L., Lentini V.L., Di Liberto D., La Barbera L., Raimondo S., Azgomi M.S., Urzì O., Berardicurti O., Campisi G., Alessandro R., Giacomelli R., Dieli F., Ciccica F. Possible role for IL-40 and IL-40-producing cells in the lymphocytic infiltrated salivary glands of patients with primary Sjögren's syndrome. *RMD Open*, 2023, Vol. 9, no. 2, e002738. doi: 10.1136/rmdopen-2022-002738.
12. Guo Q., Wang Y., Xu D., Nossent J., Pavlos N.J., Xu J. Rheumatoid arthritis: pathological mechanisms and modern pharmacologic therapies. *Bone Res.*, 2018, Vol. 6, no. 1, 15. doi: 10.1038/s41413-018-0016-9.
13. Hwang S.-Y., Kim J.-Y., Kim K.-W., Park M.-K., Moon Y., Kim W.-U., Kim H.-Y. IL-17 induces production of IL-6 and IL-8 in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts via NF- κ B- and PI3-kinase/Akt-dependent pathways. *Arthritis Res. Ther.*, 2004, Vol. 6, pp. 1-9.
14. Jaber A.S., Ad'hiah A.H. A novel signature of interleukins 36 α , 37, 38, 39 and 40 in ankylosing spondylitis. *Cytokine*, 2023, Vol. 162, 156117. doi: 10.1016/j.cyto.2022.156117.
15. Lawal G., Xiao Y., Rahnemai-Azar A.A., Tsilimigras D.I., Kuang M., Bakopoulos A., Pawlik T.M. The immunology of hepatocellular carcinoma. *Vaccines*, 2021, Vol. 9, no. 10, 1184. doi: 10.3390/vaccines9101184.
16. Liu C., Chu D., Kalantar-Zadeh K., George J., Young H.A., Liu G. Cytokines: from clinical significance to quantification. *Adv. Sci.*, 2021, Vol. 8, no. 15, 2004433. doi: 10.1002/adv.202004433.
17. Ma Y., Li Z., Zhao Y., Sun M., Sun W., Wang J. Effect of hydrogen inhalation on IL-40 and SIgA in a rat model of pulmonary mucosal immunity. *bioRxiv*, 2020, 2020.06.29.177345. doi: 10.1101/2020.06.29.177345.
18. Mariette X., Criswell L.A. Primary Sjögren's syndrome. *N. Engl. J. Med.*, 2018, Vol. 378, no. 10, pp. 931-939.
19. McInnes I.B., Schett G. Cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Nat. Rev. Immunol.*, 2007, Vol. 7, no. 6, pp. 429-442.
20. Navrátilová A., Andrés Cerezo L., Hulejová H., Bečvář V., Tomčík M., Komarc M., Veigl D., Tegzová D., Závada J., Olejárová M., Pavelka K., Vencovský J., Šenolt L. IL-40: a new B cell-associated cytokine up-regulated in rheumatoid arthritis decreases following the rituximab therapy and correlates with disease activity, autoantibodies, and netosis. *Front. Immunol.*, 2021, Vol. 12, 745523. doi: 10.3389/fimmu.2021.745523.
21. Navrátilová A., Bečvář V., Hulejová H., Tomčík M., Štolová L., Mann H., Růžicková O., Šléglová O., Závada J., Pavelka K., Vencovský J., Šenolt L., Cerezo L.A. New pro-inflammatory cytokine IL-40 is produced by activated neutrophils and plays a role in the early stages of seropositive rheumatoid arthritis. *RMD Open*, 2023, Vol. 9, no. 2, e002894. doi: 10.1136/rmdopen-2022-002894.
22. Navrátilová A., Prajzlerová K., Petrovská N., Pavelka K., Vencovský J., Šenolt L., Filková M., Cerezo L.A. POS1049 Interleukin 40 is increased in the serum of individuals at risk of rheumatoid arthritis and stimulates an inflammatory response in mononuclear cells via NF κ B. *Ann. Rheum. Dis.*, 2023, Vol. 82, p. 842.
23. Nussrat S.W., Ad'hiah A.H. Interleukin-40 is a promising biomarker associated with type 2 diabetes mellitus risk. *Immunol. Lett.*, 2023, Vol. 254, pp. 1-5.
24. Oldham R.K., Dillman R.O. Principles of cancer biotherapy: Springer Science & Business Media, 2009.
25. Oppenheim JJ. Cytokines: past, present, and future. *Int. J. Hematol.*, 2001, Vol. 74, pp. 3-8.
26. Parisi D., Chivasso C., Perret J., Soyfoo M.S., Delporte C. Current state of knowledge on primary Sjögren's syndrome, an autoimmune exocrinopathy. *J. Clin. Med.*, 2020, Vol. 9, no. 7, 2299. doi: 10.3390/jcm9072299.
27. Rizzo C., La Barbera L., Pizzo M.L., Mohammadnezhad L., Lentini V., Donzella D., Ciccica F., Fasano S., Guggino G. POS101 potential involvement of IL-40 and IL-40 producing cells in systemic lupus erythematosus and lupus associated nephritis. *Ann. Rheum. Dis.*, 2022, Vol. 81, p. 273.
28. Rizzo C., Pizzo M.L., Mohammadnezhad L., Lentini V., Di Liberto D., Grasso G., Ruscitti P., Giacomelli R., Ciccica F., Guggino G. POS177 potential involvement of IL-40 and IL-40-producing cells in primary Sjögren's syndrome (Pss) and Pss-associated lymphoma. *Ann. Rheum. Dis.*, 2021, Vol. 80, pp. 301-302.
29. Said N.M., Yassin F., Esh A.M., Saeed E. Association between serum level of pentraxin-3 and interleukin-40 with HCC disease in Egypt. *BLJ*, 2020, Vol. 16, no. 1, pp. 50-62.
30. Smolen J.S., Aletaha D., McInnes I.B. Rheumatoid arthritis. *Lancet*, 2016, Vol. 388, no. 10055, pp. 2023-2038.
31. Strand V., Khanna D. The impact of rheumatoid arthritis and treatment on patients' lives. *Clin. Exp. Rheumatol.*, 2010, Vol. 28, no. 3, pp. S32-S40.
32. Townsend C.M., Beauchamp R.D., Evers B.M., Mattox K.L. Sabiston textbook of surgery: the biological basis of modern surgical practice: Elsevier Health Sciences, 2016.
33. Vaghef-Mehrabany E., Alipour B., Homayouni-Rad A., Sharif S.-K., Asghari-Jafarabadi M., Zavvari S. Probiotic supplementation improves inflammatory status in patients with rheumatoid arthritis. *Nutrition*, 2014, Vol. 30, no. 4, pp. 430-435.
34. Vaillant A.A.J., Qurie A. Interleukin. StatPearls [Internet]: StatPearls Publishing, 2022. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK499840/>.

35. Yang J.D., Hainaut P., Gores G.J., Amadou A., Plymoth A., Roberts L.R. A global view of hepatocellular carcinoma: trends, risk, prevention and management. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.*, 2019, Vol. 16, no. 10, pp. 589-604.
36. Zyrianova Y. Rheumatoid arthritis: a historical and biopsychosocial perspective. Lemmey A. (ed.). Rheumatoid arthritis-etiology, consequences and co-morbidities. InTech, 2012, pp. 189-214. Available at: <https://www.intechopen.com/chapters/25403>.

Авторы:

Монирех Аскарзаде — аспирант, отдел иммунологии, Школа медицины, Медицинский университет Мазандаран, г. Сари, Иран

Мохаммад Реза Атаолахи — доцент, отдел иммунологии, Школа медицины, Медицинский университет Фаса, г. Фаса, Иран

Закра Шокролахи — доктор медицины, отдел иммунологии, Школа медицины, Медицинский университет Фаса, г. Фаса, Иран

Мохаммад Реза Аташхар — доцент, отдел иммунологии, Школа медицины, Медицинский университет Фаса, г. Фаса, Иран

Authors:

Monireh Askarzadeh, Immunology PHD, Student, Department of Immunology, School of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

Mohammad Reza Ataollahi, Immunology PHD, Associate Professor, Department of Immunology, School of Medicine, Fasa University of Medical Sciences, Fasa, Iran

Zahra Shokrolahi, MD, GP, Department of Immunology, School of Medicine, Fasa University of Medical Sciences, Fasa, Iran

Mohammad Reza Atashzar, Immunology PHD, Associate Professor, Department of Immunology, School of Medicine, Fasa University of Medical Sciences, Fasa, Iran

Поступила 12.07.2023
Принята к печати 08.10.2023

Received 12.07.2023
Accepted 08.10.2023

ВЛИЯНИЕ ВОСПАЛЕНИЯ НА ТЕЧЕНИЕ АСЕПТИЧЕСКОГО НЕКРОЗА ГОЛОВКИ БЕДРЕННОЙ КОСТИ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

Шабалдин Н.А.¹, Синицкая А.В.², Богданов Л.А.², Шабалдин А.В.^{1,2}

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

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

Резюме. Асептический некроз головки бедренной кости представляет собой стадийный процесс, при котором остеодеструкция сменяется остеорепарацией. Исход данного заболевания может характеризоваться тяжелой дисконгруэнтностью области тазобедренного сустава, инвалидностью больного. В последнее время значительно возрос интерес к изучению молекулярно-клеточных механизмов нарушения костного гомеостаза и способов его коррекции. Ряд исследований продемонстрировали роль неспецифического воспаления в патогенезе асептического некроза, однако требуется более детальное изучение динамики изменения активности сигнальных путей остеогенеза. Целью настоящего исследования являлась оценка роли молекулярных паттернов развития воспаления и остеогенеза в течение асептического некроза головки бедренной кости в модельном эксперименте. Проведена хирургическая индукция асептического некроза головки бедренной кости у 16 крыс, которые выводились из эксперимента по 4 особи каждые 2 недели в течение 8 недель. Исследована экспрессия генов, кодирующих белки, участвующие в регуляции остеогенеза, методом кПЦР с обратной транскрипцией, а также концентрация белков VCAM1, MMP9 методом иммуноблоттинга. Результаты исследования продемонстрировали гетерогенность динамики изменений молекулярно-клеточных нарушений регуляции костного гомеостаза в патогенезе асептического некроза. Так, первые две недели после хирургической индукции в качестве предикторных факторов определялась экспрессия гена *HIF1α* и *TNFα*, а также концентрация белков MMP9 и VCAM1. Через 1 месяц в качестве протекторов выступали концентрация белка VCAM1 и экспрессия гена *TNFα*, а предикторов — ген *IL6* и белок MMP9. Через 6 недель развитию асептического некроза способствовала экспрессия гена *IL4*, а через 8 недель — гена *IL6*. Таким образом, важная роль в регуляции остеорезорбции принадлежит неспецифическому воспалению, триггером которого может служить острая тканевая гипоксия. Значимое влияние процесса воспаления сохраняется до 8 недель после манифестации аваскулярного некроза головки бедренной кости. Патогенез костной деструкции связан не только с усилением активности остеокластогенеза, но и снижением интенсивности остеобластогенеза. При этом ведущий молеку-

Адрес для переписки:

Шабалдин Никита Андреевич
ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный
медицинский университет»
650056, Россия, г. Кемерово, ул. Ворошилова, 22а.
Тел.: 8 (950) 576-36-82.
E-mail: Shabaldin.nk@yandex.ru

Address for correspondence:

Nikita A. Shabaldin
Kemerovo State Medical University
22a Voroshilov St
Kemerovo
650056 Russian Federation
Phone: +7 (950) 576-36-82.
E-mail: Shabaldin.nk@yandex.ru

Образец цитирования:

Н.А. Шабалдин, А.В. Синицкая, Л.А. Богданов,
А.В. Шабалдин «Влияние воспаления на течение
асептического некроза головки бедренной кости
в эксперименте» // Медицинская иммунология, 2024.
Т. 26, № 6. С. 1183–1196.
doi: 10.15789/1563-0625-TEO-2885

© Шабалдин Н.А. и соавт., 2024

Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

N.A. Shabaldin, A.V. Sinitskaya, L.A. Bogdanov,
A.V. Shabaldin "The effect of inflammation on the course
of experimental aseptic necrosis of femoral head", *Medical
Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2024,
Vol. 26, no. 6, pp. 1183–1196.
doi: 10.15789/1563-0625-TEO-2885

© Shabaldin N.A. et al., 2024

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

DOI: 10.15789/1563-0625-TEO-2885

лярно-клеточный патологический паттерн нарушения костного гомеостаза меняется в зависимости от стадии течения асептического некроза.

Ключевые слова: асептический некроз, иммуноблоттинг, молекулярные предикторы, сигнальный путь

THE EFFECT OF INFLAMMATION ON THE COURSE OF EXPERIMENTAL ASEPTIC NECROSIS OF FEMORAL HEAD

Shabaldin N.A.^a, Sinitskaya A.V.^b, Bogdanov L.A.^b, Shabaldin A.V.^{a, b}

^a Kemerovo State Medical University, Kemerovo, Russian Federation

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

Abstract. Aseptic necrosis of the femoral head is a staged process in which osteodestruction is replaced by the bone repair. The outcome of this disease may be characterized by severe discongruence of the hip joint area, disability of the patient. Recently, the research interest is drawn to molecular and cellular mechanisms of bone homeostasis disorders and ways of its correction. A number of studies have demonstrated the role of nonspecific inflammation in pathogenesis of aseptic necrosis. However, a more detailed study of dynamic changes in the activity of osteogenesis signaling pathways is required. The aim of this study was to assess the role of molecular patterns of inflammation and osteogenesis during aseptic necrosis of femoral head in experimental model. Surgical induction of aseptic necrosis of the femoral head was performed in 16 rats, which were removed biweekly from experiment (by 4 animals), for 8 weeks. The expression of genes encoding proteins involved in osteogenesis regulation was studied by qPCR with reverse transcription. Concentration of VCAM1, MMP9 proteins was assessed by immunoblotting. The results of our study demonstrated heterogenous dynamics of changes in molecular and cellular disorders associated with bone homeostasis regulation in pathogenesis of aseptic necrosis. For the first two weeks after surgical procedure, the expression of *HIF1α* and *TNFα* genes, as well as the concentration of MMP9 and VCAM1 proteins, were determined as predictor factors. After 1 month, VCAM1 protein concentration and *TNFα* gene expression acted as protector factors, whereas *IL6* gene and MMP9 protein were considered predictive factors. After 6 weeks, the development of aseptic necrosis was promoted by expression of the *IL4* gene, and after 8 weeks, by *IL6* gene. Thus, an important role in regulation of osteoresorption belongs to nonspecific inflammation, which can be triggered by acute tissue hypoxia. A significant effect of the inflammation process persists up to 8 weeks after induction of avascular necrosis of femoral head. Pathogenesis of bone destruction is associated not only with an increased activity of osteoclastogenesis, but also with a decreased intensity of osteoblastogenesis. In general, the molecular and cellular pattern of bone homeostasis disorders varies depending on the stage of aseptic necrosis.

Keywords: aseptic necrosis, inflammation, immunoblotting, molecular predictors, signaling pathway

Исследование выполнено за счет финансирования гранта «Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских ученых — кандидатов наук», МК-4132.2022.3.

Введение

Одним из ведущих направлений современной медицины является разработка таргетной терапии, направленной на управление воспалительным процессом. Асептическое воспаление является ведущим звеном патогенеза хронических заболеваний, в том числе костно-мышечной системы человека. Вопрос нарушения регуляции костного гомеостаза при развитии остеодеструкции активно изучается среди широкого круга

специалистов. Одной из тяжелых форм, сопровождающейся прогрессирующей костной резорбцией с развитием дисконгруэнтности в области тазобедренного сустава, стойким болевым синдромом и, как следствие, снижением качества жизни является асептический некроз головки бедренной кости.

Костная ткань под воздействием внутренних и внешних факторов подвергается постоянно-му динамическому процессу ремоделирования (обновления), при котором остеорезорбция сменяется формированием кости. Процесс носит стадийный характер и включает в себя фазы активации, резорбции, реверсии, формирования и покоя, каждая из которых регулируется большим количеством медиаторов и сигнальных путей [3].

При этом баланс между резорбцией устаревших участков кости и образованием новых обеспечивается за счет взаимодействия между основными клетками костной ткани: остеобластами, остеокластами, остеоцитами.

Манифестация асептического некроза головки бедренной кости связана с возникновением сосудистого коллапса, созданием зоны локальной гипоперфузии, которая рассматривается как триггерный фактор дальнейших патологических процессов [12]. Гипоксия влияет на все биохимические процессы в организме. При этом адаптация к кислородному голоду на клеточном уровне регулируется с помощью протеинкиназы mTOR, играющей фундаментальную роль в физиологии сигнальных внутриклеточных сетей, а также развернутыми белковыми реакциями в эндоплазме, транскрипцией, опосредованной NF- κ B, или семейством транскрипционных факторов, индуцируемых гипоксией (HIF) [21]. Биологическое действие HIF-1 α может быть направлено как на усиление остеокластогенеза, так и остеобластогенеза. Так, ряд исследований связывают повышение концентрации HIF-1 α с усилением экспрессии провоспалительных цитокинов, в то время как другие работы отображают влияние HIF-1 α на усиление синтеза костного морфогенетического белка (BMP2) [11]. Однако механизм межклеточного взаимодействия опосредованный. Так, модельный эксперимент на поросятах обнаружил, что гипоксия индуцировала выработку свободных кислородных радикалов, преобразовывающихся в H₂O₂. При этом хондроциты гиалинового хряща в условиях дефицита кислорода усиливали синтез супероксиддисмутазы 2 (SOD₂). Взаимодействие H₂O₂/SOD₂ приводило к увеличению уровня BMP2.

Последующее развитие аваскулярного некроза сопровождается нарушением баланса между остеорезорбцией и остеорепарацией, с усилением остеолизиса на ранних стадиях и активацией восстановления костной ткани на более поздних. Особенности молекулярно-клеточной регуляции данных процессов зависят от стадии заболевания [4].

Дифференцировка и активизация остеокластов и остеобластов контролируется несколькими сигнальными путями. Основным сигнальным путем остеокластогенеза является система рецептора активатора ядерного фактора κ B (RANK), его лиганда (RANKL) и остеопротегерина (OPG). Установлено, что экспрессия RANKL регулируется рядом медиаторов, таких как провоспалительные цитокины, белки окислительного, гипоксического стресса, при этом связывание RANKL с RANK через ряд внутриклеточных сигнальных путей, таких как JAK-STAT, MAPK, приводит к

транскрипции ядерного фактора κ B (NF- κ B) в ядро преостеокластов, с дальнейшей дифференцировкой в зрелые остеокласты и их активацией [17]. При этом ряд исследовательских работ рассматривают активацию остеокластогенеза в качестве ключевого компонента прогрессирующей остеодеструкции при развитии асептического некроза головки бедренной кости [18].

Остеобластогенез регулируется локальными факторами роста, внутриклеточными сигнальными путями, в том числе каноническим wnt/ β -катенин сигнальным путем. Взаимодействие wnt с трансмембранным белком Frizzled и липопротеидами низкой плотности LRP5/LRP6 на поверхности мультипотентных мезенхимальных стволовых клеток приводит к угнетению убиквитилирования β -катенина, проникновению последнего в ядро и активацию остеобластогенеза [1].

Одним из актуальных вопросов является роль неспецифического воспаления в процессе развития асептического некроза. Известно, что выброс большого количества медиаторов воспаления приводит к усилению остеокластогенеза, смещению баланса костного гомеостаза в сторону преобладания резорбции [5, 6]. Среди протеинов, участвующих в регуляции остеогенеза при развитии неспецифического воспаления на фоне острой тканевой гипоксии можно выделить белки матриксной металлопротеиназы-9 (MMP9) и молекулы адгезии эндотелия сосудов-1 (VCAM1) [14, 19].

MMP9 играет важную роль в ремоделировании костной ткани и участвует во взаимодействии между процессами неспецифического воспаления и активацией прогениторных клеток остеогенеза [19]. Известно, что металлопротеиназы экспрессируются как в остеокластах, так и в иммунокомпетентных клетках. Экспериментальные работы с мышами, нокаутированными по гену MMP9, показали большее скопление Т-клеток, макрофагов в зонах консолидации переломов, чем у мышей дикого типа [13]. Ряд научно-исследовательских работ выявили влияние молекулы MMP9 на архитектуру костных трабекул. Так, показано, что у мышей, нокаутированных по гену MMP9, плотность связанности костных трабекул увеличена, однако общая масса костной ткани уменьшалась [16].

VCAM1 является иммуноглобулином, участвующим во взаимодействии прогениторных лимфоцитарных клеток со стромальными клетками костного мозга, адгезии лейкоцитов к эндотелию. Известна роль VCAM1 в усилении миграции лимфоцитов в зону воспаления [9]. Кроме того, взаимодействие VCAM1 с интегрином α 4 β 1 приводит

к активации дифференцировки остеокластов из моноцитарных клеток-предшественников [14].

Также ряд научно-исследовательских работ продемонстрировали взаимосвязь между концентрацией белка VCAM1 и функционированием канонического сигнального пути wnt/ β -катенин [15]. Передача сигнала wnt в стромальных клетках, через связывание бета-киназа гликогенсинтазы-3 (GSK3b) с лигандом wnt3a, подавляет экспрессию VCAM1. При этом axin, как ингибитор канонического сигнального пути wnt/ β -катенин, частично снимает это «блокирование».

Влияние тех или иных молекулярных паттернов на процессы регуляции остеогенеза зависят от стадии патологического процесса. Так, более перспективным представляется изучение динамики изменения маркеров костного гомеостаза по мере развития асептического некроза головки бедренной кости.

Цель исследования — оценить роль молекулярных паттернов развития неспецифического воспаления и остеогенеза в течение асептического некроза головки бедренной кости в модельном эксперименте.

Материалы и методы

Выполнен модельный эксперимент на 16 самцах крыс линии Wistar, массой 250 ± 25 г, возрастом 3 мес. Хирургическая индукция асептического некроза головки бедренной кости проведена путем наложения плотной лигатуры из рассасывающегося шовного материала викрил вокруг шейки бедренной кости, для создания зоны гипоперфузии, а также введения в полость сустава 1,5 мл 2%-ного раствора реополиглюкина, для увеличения внутрисуставного давления. Животные выводились из эксперимента путем декапитации по 4 особи, каждые 2 недели, в течение 2 месяцев. Эксперимент выполнялся согласно «Конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей», принятой Советом Европы (Strasbourg, Франция, 1986) и Директивой Совета 86/609/ЕЕС от 24.11.1986 «По согласованию законов, правил и административных распоряжений стран-участниц в отношении защиты животных, используемых в экспериментальных и научных целях» на базе ФГБОУ ВО КемГМУ и НИИ КПССЗ г. Кемерово.

Выделение РНК и белка

После выведения животных из эксперимента выполнялась экстирпация бедренных костей с двух сторон. Бедренная кость после хирургической индукции асептического некроза относилась к основной группе. Интактная бедренная

кость с коллатеральной стороны относилась к группе сравнения.

Для выделения белка была забрана часть головки бедренной кости (50–70 мг), которая помещалась в охлажденный буфер T-PER с ингибиторами протеаз и фосфатаз Halt™ (Thermo Scientific, США) в соотношении 1:100 (10 мкл коктейля ингибиторов на 990 мкл буфера для выделения белка), после чего их гомогенизировали на приборе FastPrep-24 5G (MP Biomedicals, США) с режимом 4 цикла по 40 секунд с интервалом в 300 секунд между циклами. Затем, гомогенат центрифугировали при 14 000xg (Microfuge 20R, Beckman Coulter, Германия) в течение 10 минут. Полученный супернатант центрифугировали при 200 000 g на ультрацентрифуге Optima MAX-XP (Beckman Coulter, США) в течение 30 мин. Количество белка определяли при помощи набора BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific, США) в соответствии с протоколом производителя на спектрофотометре Multiskan Sky (Thermo Scientific, Сингапур). Другая часть головки бедренной кости, как пораженной асептическим некрозом, так и здоровой, использовалась для выделения мРНК коммерческим набором RNeasy MicroKit (QIAGEN, Германия) согласно протоколу производителя. Качество и количество выделенной РНК определяли на спектрофотометре Qubit 4 (Invitrogen, США) путем оценки индекса RIQ (RNA Integrity and Quality) с использованием набора реагентов Qubit RNA IQ Assay Kit (Invitrogen, США).

Иммуноблоттинг

Одинаковое количество белка (15 мкг на образец) смешивали с буфером для денатурации NuPAGE (NP0007, Thermo Fisher Scientific, США) в соотношении 4:1 и восстановителем NuPAGE (NP0009, Thermo Fisher Scientific, США) в соотношении 10:1, денатурировали при 99 °C в течение 5 минут и далее загружали на 1,5 мм гель NuPAGE 4-12% Bis-Tris (NP0335BOX, Thermo Fisher Scientific, США). В качестве маркера молекулярных масс использовали смесь белковых стандартов Novex Sharp Pre-Stained (LC5800, Thermo Fisher Scientific, США) и MagicMark XP Western в соотношении 1:1 (LC5602, Thermo Fisher Scientific, США).

Разделение белков выполняли путем электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (SDS-PAGE) при напряжении 150 В в течение 1,5 часов в буфере NuPAGE MES SDS (NP0002, Thermo Fisher Scientific, США). С использованием мембран из поливинилидендифторида (PVDF) (IB24001, Thermo Fisher Scientific, США) и прибора для сухого переноса iBlot 2 (Thermo Fisher Scientific, США) проводили перенос белка, в соответствии с протоколом производителя. Далее в растворе

iBind Flex (SLF2020, Solution Kit Thermo Fisher Scientific, США) в течение 1 часа инкубировали мембраны для предотвращения неспецифического связывания.

Иммуноблоттинг проводили с использованием первичных антител к матриксной металлопротеиназе-9 (MMP9, ab38898, разведение 1:1000), васкулярной молекуле клеточной адгезии 1 (VCAM1, ab134047, разведение 1:1000), Bone Morphogenetic Protein Receptor 1A (BMPRI1A, PAA015Ra01, разведение 1:1000), Receptor Activator of Nuclear Factor kappa B Ligand (RANKL, PAA855Ra01, разведение 1:1000), фактор роста эндотелия сосудов A (VEGFA, PAA143Ra01, разведение 1:1000) и вторичными конъюгированными с пероксидазой хрена антителами козла против кролика (7074, Cell Signaling Technology) применяли в разведении 1:400.

С использованием набора iBind Flex (SLF2020, Solution Kit Thermo Fisher Scientific, США) и карточек iBind Flex (SLF2010, Thermo Fisher Scientific, США) проводили инкубацию с антителами на приборе iBind Flex Western Device (SLF2000, Thermo Fisher Scientific, США) в течение 3 часов в соответствии с протоколом производителя. Хемилюминесцентную детекцию проводили с использованием субстрата SuperSignal

West Pico PLUS (34580, Thermo Fisher Scientific, США) и цифрового сканера блотов C-DiGit (LI-COR Biosciences, США). Денситометрию полученных результатов иммуноблоттинга проводили в программе ImageJ (National Institutes of Health).

Определение уровня мРНК

Уровень экспрессии генов определяли методом количественной полимеразной реакции с обратной транскрипцией, используя набор High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (4368814, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, США). Праймеры синтезированы компанией ЗАО «Евроген» (Москва, Россия) (табл. 1). Результаты кПЦР нормировали с помощью трех референсных генов *actb*, *tbp*, *b2m* в соответствии с имеющимися рекомендациями. Экспрессию изучаемых генов рассчитывали по методу $2^{-\Delta\Delta Ct}$ и выражали в виде кратного изменения относительно контрольных образцов, далее обозначенных как коэффициенты экспрессии исследуемых генов.

Гистологическое исследование

Для подтверждения факта течения асептического некроза выполнено гистологическое исследование препаратов головки бедренной кости с покраской гематоксилин эозином. Для подготовки образцов использована стандартная мето-

ТАБЛИЦА 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ПРАЙМЕРОВ, ИСПОЛЬЗОВАННЫХ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

TABLE 1. CHARACTERISTICS OF THE PRIMERS USED IN THE EXPERIMENT

Ген Gene	Forward	Reverse
<i>IL4</i>	5'-TGACCGGGAACGGTATCCA-3'	5'-GTTGCCGTAAGGACGTCTGG-3'
<i>IL6</i>	5'-AGCCCACCAGGAACGAAAGTC-3'	5'-AGGGAAGGCAGTGGCTGTCA-3'
<i>IL1β</i>	5'-CCTCGTGCTGTCTGACCCAT-3'	5'-GGTGGGTGTGCCGTCTTTCA-3'
<i>TNFα</i>	5'-AGAGCCCCCAATCTGTGTCC-3'	5'-CCGCAATCCAGGCCACTACT-3'
<i>Tgfb</i>	5'-ACTCCCGTGGCTTCTAGTGC-3'	5'-GGGACTGGCGAGCCTTAGTT-3'
<i>Sp7</i>	5'-ACCCGAAGCGACCACTTGAG-3'	5'-GCTTCTTCTTCCCCGACGCT-3'
<i>Runx2</i>	5'-GCTTCATTGCGCTCACAACA-3'	5'-TGGTCTCGGTGGCTGGTAGT-3'
<i>Opn/spp1</i>	5'-AAGCCAGCCAAGGACCAACTA-3'	5'-GCTTCTGAGATGGGTCAGGCT-3'
<i>Bmp2</i>	5'-ACCCGCTGTCTTCTAGTGTTGC-3'	5'-AGCAGCCTCAACTCAAACCTCG-3'
<i>Bglap</i>	5'-GTCCAAGCAGGAGGGCAGTAA-3'	5'-GCTCACACACCTCCCTGTGA-3'
<i>Rankl</i>	5'-TGGAAGGTTTCGTGGCTCGAT-3'	5'-ATGGGAACCCGATGGGATGT-3'
<i>Alpl</i>	TGCCTACTTGTGTGGCGTGA-3'	5'-ATGGACGTGACCTCGTTCCC-3'
<i>HIF1α</i>	5'-AACAAAACACGCAGCGAAGC-3'	5'-GCACCAAGCACGTCATAGGC-3'
<i>b2m</i>	5'-GGTGACCGTGATCTTTCTGGTG-3'	5'-TGAGGAAGTTGGGCTTCCCAT-3'
<i>actb</i>	5'-ACAACCTTCTTGACGCTCCTC-3'	5'-CCATACCCACCATCACACCCT-3'
<i>tbp</i>	5'-TGCCAAGTGTGAGCCTCTCC-3'	5'-TGGGTTATCGCACGCACCAT-3'

дика декальцинации с использованием этилендиаминотетрауксусной кислоты с последующей заливкой препаратов парафином.

Статистический анализ

Статистическую обработку полученных результатов проводили в пакетах программ Statistica for WINDOWS фирмы StatSoft Inc. (США), версия 10.0, по правилам вариационной статистики. В исследовании были использованы крысы линии Wistar, содержащиеся в одинаковых оптимальных условиях, поэтому W-теста Шапиро–Уилка показал нормальное распределение. Основным методом была логистическая пошаговая регрессия (статистический метод классификации с использованием линейного дискриминанта Фишера). Зависимой переменной было наличие или отсутствие асептического некроза (сравнивались две головки бедренной кости: 1 балл — головка бедренной кости с индуцированным асептическим некрозом, 0 баллов — интактная головка бедренной кости), а независимыми — уровни экспрессии исследуемых протеинов и коэффициенты экспрессии исследуемых генов. Вероятность ошибки первого рода была принята за 5%, а второго уровня — за 20%, соответственно уровень статистической значимости выявлялся при $p < 0,05$, что соответствует стандартным требованиям.

Результаты

Гистологическое исследование

Гистологическое исследование отобразило прогрессирующее развитие признаков остеодеструкции по мере течения асептического некроза от 2-й к 6-й неделе. Первые две недели после хирургической индукции асептического некроза сопровождались в первую очередь изменениями структуры и положения хондроцитов, ядра хондроцитов теряли эллипсоидную форму, отмечались признаки деструкции. Костная архитектура приобретала волнообразный характер, однако плотность костных трабекул сохранялась без изменений по сравнению с условно-здоровой стороной (рис. 1, см. 3-ю стр. обложки).

Последующие 4-я и 6-я неделя сопровождались признаками прогениторного течения остеодеструктивных процессов. Хондроциты в гиалиновом хряще большей частью находились в наружном слое, при этом промежуточный слой характеризовался разряжением. Прогрессировало волнообразное расположение наружной костной пластинки, костных трабекул губчатого вещества, что характерно для процессов деминерализации. От 4-й к 6-й недели отмечалось увеличение концентрации активных остеокластов, чаще определялись лакуны костной резорбции (рис. 2, см. 3-ю стр. обложки).

Через 2 месяца течения асептического некроза участки костной ткани замещались плотной фиброзной тканью, часть остеоцитов слабо окрашивалась, плотность костных трабекул снижалась. При этом определялось большое количество активных остеобластов, что может свидетельствовать об активации остеорепаративных процессов (рис. 3, см. 3-ю стр. обложки).

Особенности экспрессии генов и белков

Исследования экспрессии белков на этапах развития асептического некроза показали, что только MMP9 и VCAM1 выявлялись с помощью иммуоблоттинга. Это может указывать на усиление неспецифического воспаления за счет межклеточных контактов, значимость ангиогенеза в регулирование ремоделирования головки бедренной кости при развитии асептического некроза.

В первые 2 недели модельного эксперимента были получены следующие результаты, представленные в таблице 2. Необходимо отметить, что полученные в представленном классификаторе (логистическая регрессия) β -коэффициенты отражают относительное влияние фактора на зависимую переменную, а B -коэффициенты показывают его прогностическую значимость и могут быть использованы в уравнении, описывающем логистическую функцию. Кроме того, можно оценивать и влияние отдельных факторов: протекторное влияние со знаком (+) или в таблице просто без знака перед коэффициентом; и предикторное влияние со знаком (-).

Как видно из таблицы 2, на второй неделе эксперимента все значимые ассоциации были отрицательными, т. е. повышение экспрессии генов и белков способствовало развитию асептического некроза, что вполне логично с позиции нарушений регуляции костного гомеостаза, вызванного хирургически созданной гипоперфузией головки бедренной кости. В этот период определялась значимость концентрации белков MMP9 и VCAM1, а также экспрессии генов *HIF1 α* и *TNF α* . Причем наибольшим предикторным влиянием обладала экспрессия гена *HIF1 α* .

Так как из всех изучаемых протеинов только экспрессия MMP9 и VCAM1 была значимо ассоциирована с развитием асептического некроза, то оценили влияние активности изучаемых генов на MMP9 и VCAM1 (табл. 3 и 4 соответственно).

Из таблицы 3 видно, что экспрессия гена *runx2* ассоциировалась в качестве протектора роста концентрации MMP9. Т. е. чем выше была его активность, тем сильнее угнетался синтез исследуемой металлопротеиназы. В то время как экспрессия таких генов, как *alpl*, *rankl*, *HIF1 α* , напротив, способствовали увеличению выработки протеина MMP9.

ТАБЛИЦА 2. МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ПРЕДИКТОРЫ И ПРОТЕКТОРЫ АСЕПТИЧЕСКОГО НЕКРОЗА В 2 НЕДЕЛИ МОДЕЛЬНОГО ЭКСПЕРИМЕНТА

TABLE 2. MOLECULAR PREDICTORS AND PROTECTORS OF ASEPTIC NECROSIS IN 2 WEEKS OF THE MODEL EXPERIMENT

Предикторы / протекторы Predictors / protectors	Бета ассоциация Beta association	Std. Err. Бета Std. Err. Beta	В-предиктор / протектор B predictors / protectors	Std. Err. B	p-level
Отрезок Section			2,374	0,005	0,001*
MMP9	-0,533	0,002	-0,001	< 0,001	0,003*
VCAM1	-0,829	0,004	-0,001	< 0,001	0,003*
TNF α	-0,207	0,004	-0,008	0,000	0,013*
HIF1 α	-0,060	0,003	-0,013	0,001	0,032*

Примечание. * – значимый уровень достоверности ($p < 0,05$).

Note. * is a significant confidence level ($p < 0.05$).

ТАБЛИЦА 3. ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ПРЕДИКТОРЫ И ПРОТЕКТОРЫ АКТИВНОСТИ MMP9 В 2 НЕДЕЛИ МОДЕЛЬНОГО ЭКСПЕРИМЕНТА

TABLE 3. GENETIC PREDICTORS AND PROTECTORS OF MMP 9 ACTIVITY IN 2 WEEKS OF THE MODEL EXPERIMENT

Предикторы / протекторы Predictors / protectors	Бета ассоциация Beta association	Std. Err. Бета Std. Err. Beta	В-предиктор / протектор B predictors / protectors	Std. Err. B	p-level
Отрезок Section			10734,504	6,606	0,000
runx2	2,030	0,001	2424,281	1,047	0,000
alpl	-0,829	0,001	-611,057	0,675	0,001
rankl	-0,663	0,001	-1354,379	2,909	0,001
HIF1 α	-0,103	0,001	-279,641	1,811	0,004

ТАБЛИЦА 4. ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ПРЕДИКТОРЫ И ПРОТЕКТОРЫ АКТИВНОСТИ VCAM1 В 2 НЕДЕЛИ МОДЕЛЬНОГО ЭКСПЕРИМЕНТА

TABLE 4. GENETIC PREDICTORS AND PROTECTORS OF VCAM ACTIVITY 1 IN 2 WEEKS OF THE MODEL EXPERIMENT

Предикторы / протекторы Predictors / protectors	Бета ассоциация Beta association	Std. Err. Бета Std. Err. Beta	В-предиктор / протектор B predictors / protectors	Std. Err. B	p-level
Отрезок / Section			45385,274	6233,392	0,002
TNF α	-0,869	0,247	-1185,451	336,717	0,024

Из таблицы 4 видно, что синтез VCAM1 усиливался синтезом гена *TNF α* .

Дальнейшие 4 недели течения асептического некроза характеризовались прогрессирующим развитием воспаления. По аналогии с исследованиями на 2-й неделе проведена оценка связей с помощью логистической регрессии (табл. 5, 6). Как видно из таблицы 5, на 4-й неделе после индукции асептического некроза протекторны-

ми свойствами стали обладать количество мРНК *TNF α* и степень экспрессии молекулы VCAM1. В то же время экспрессия гена *IL6* и MMP9 способствовала развитию асептического некроза.

Экспрессия генов *bglap* и *runx2* ассоциировалась в качестве протекторов изменения концентрации белка MMP9. В то же время экспрессия таких генов, как *alpl*, *HIF1 α* , напротив, выступала в качестве предикторов увеличения concentra-

ТАБЛИЦА 5. МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ПРЕДИКТОРЫ И ПРОТЕКТОРЫ АСЕПТИЧЕСКОГО НЕКРОЗА В 4 НЕДЕЛИ МОДЕЛЬНОГО ЭКСПЕРИМЕНТА

TABLE 5. MOLECULAR PREDICTORS AND PROTECTORS OF ASEPTIC NECROSIS IN 4 WEEKS OF THE MODEL EXPERIMENT

Предикторы / протекторы Predictors / protectors	Бета ассоциация Beta association	Std. Err. Бета Std. Err. Beta	В-предиктор / протектор B predictors / protectors	Std. Err. B	p-level
Отрезок Section			1,229	0,001	< 0,001
MMP9	-1,079	0,002	-0,001	< 0,001	0,001*
IL6	-0,207	0,001	-0,002	< 0,001	0,004*
TNF α	0,111	0,002	0,001	< 0,001	0,009*
VCAM1	0,076	0,002	0,001	< 0,001	0,014*

Примечание. * – значимый уровень достоверности ($p < 0,05$).

Note. * is a significant confidence level ($p < 0.05$)

ТАБЛИЦА 6. ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ПРЕДИКТОРЫ И ПРОТЕКТОРЫ АКТИВНОСТИ MMP9 В 4 НЕДЕЛИ МОДЕЛЬНОГО ЭКСПЕРИМЕНТА

TABLE 6. GENETIC PREDICTORS AND PROTECTORS OF MMP 9 ACTIVITY IN 4 WEEKS OF THE MODEL EXPERIMENT

Предикторы / протекторы Predictors / protectors	Бета ассоциация Beta association	Std. Err. Бета Std. Err. Beta	В-предиктор / протектор B predictors / protectors	Std. Err. B	p-level
Отрезок Section			21464,797	4,265	< 0,001
HIF1 α	-1,355	< 0,001	-6935,855	2,057	< 0,001
bglap	1,136	0,001	454,882	0,277	< 0,001
alpl	-1,303	0,001	-101,847	0,081	0,001
runx2	0,390	0,001	39,086	0,052	0,001

ТАБЛИЦА 7. МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ПРЕДИКТОРЫ И ПРОТЕКТОРЫ АСЕПТИЧЕСКОГО НЕКРОЗА В 6 НЕДЕЛЬ МОДЕЛЬНОГО ЭКСПЕРИМЕНТА

TABLE 7. MOLECULAR PREDICTORS AND PROTECTORS OF ASEPTIC NECROSIS IN 6 WEEKS OF THE MODEL EXPERIMENT

Предикторы / протекторы Predictors / protectors	Бета ассоциация Beta association	Std. Err. Бета Std. Err. Beta	В-предиктор / протектор B predictors / protectors	Std. Err. B	p-level
Отрезок Section			3,732	0,246	0,042*
IL4	-1,238	0,036	-0,005	< 0,001	0,019*

Примечание. * – значимый уровень достоверности ($p < 0,05$).

Note. * is a significant confidence level ($p < 0.05$).

ции MMP9, как и в первые две недели индукции асептического некроза (табл. 6).

Стоит отметить, что на четвертой неделе после индукции асептического некроза головки бедренной кости возможные регуляторные ассо-

циации между концентрацией VCAM1 и экспрессией исследуемых генов исчезают.

На 6-й неделе течения асептического некроза выявлена в качестве предиктора только экспрессия гена IL4 (табл. 7).

ТАБЛИЦА 8. ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ПРЕДИКТОРЫ И ПРОТЕКТОРЫ АКТИВНОСТИ ММР9 В 6 НЕДЕЛЬ МОДЕЛЬНОГО ЭКСПЕРИМЕНТА

TABLE 8. GENETIC PREDICTORS AND PROTECTORS OF MMP 9 ACTIVITY IN 6 WEEKS OF THE MODEL EXPERIMENT

Предикторы / протекторы Predictors / protectors	Бета ассоциация Beta association	Std. Err. Бета Std. Err. Beta	В-предиктор / протектор B predictors / protectors	Std. Err. B	p-level
Отрезок Section			33880,410	1435,417	0,027*
<i>bglap</i>	-0,817	0,036	-8662,957	379,162	0,028*
<i>IL1β</i>	0,303	0,036	60631,435	7143,794	0,075

Примечание. * – значимый уровень достоверности ($p < 0,05$).

Note. * is a significant confidence level ($p < 0.05$).

ТАБЛИЦА 9. МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ПРЕДИКТОРЫ И ПРОТЕКТОРЫ АСЕПТИЧЕСКОГО НЕКРОЗА В 8 НЕДЕЛЬ МОДЕЛЬНОГО ЭКСПЕРИМЕНТА

TABLE 9. MOLECULAR PREDICTORS AND PROTECTORS OF ASEPTIC NECROSIS IN 8 WEEKS OF THE MODEL EXPERIMENT

Предикторы / протекторы Predictors / protectors	Бета ассоциация Beta association	Std. Err. Бета Std. Err. Beta	В-предиктор / протектор B predictors / protectors	Std. Err. B	p-level
Отрезок Section			-0,019	< 0,001	< 0,001*
<i>IL6</i>	-1,000	0,001	20,381	0,010	< 0,001*

Примечание. * – значимый уровень достоверности ($p < 0,05$).

Note. * is a significant confidence level ($p < 0.05$).

ТАБЛИЦА 10. ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ПРЕДИКТОРЫ И ПРОТЕКТОРЫ АКТИВНОСТИ ММР9 В 8 НЕДЕЛЬ МОДЕЛЬНОГО ЭКСПЕРИМЕНТА

TABLE 10. GENETIC PREDICTORS AND PROTECTORS OF MMP 9 ACTIVITY IN 8 WEEKS OF THE MODEL EXPERIMENT

Предикторы / протекторы Predictors / protectors	Бета ассоциация Beta association	Std. Err. Бета Std. Err. Beta	В-предиктор / протектор B predictors / protectors	Std. Err. B	p-level
Отрезок Section			23929,992	654,269	0,017*
<i>spp1</i>	-0,998	0,043	-2776,168	118,611	0,027*
<i>runx2</i>	-0,082	0,043	-17394,652	9040,838	0,305

Примечание. * – значимый уровень достоверности ($p < 0,05$).

Note. * is a significant confidence level ($p < 0.05$).

С экспрессией ММР9 был положительно значимо ассоциирован уровень мРНК гена *IL1β*. В то же время ассоциативная связь экспрессии гена *bglap* перешла за 6 недель эксперимента в отрицательные значения. Это указывает на цикличность генетического влияние в отношении экспрессии ММР9 (табл. 8).

Значимых ассоциаций между экспрессией VCAM1 и исследуемых генов не получено.

К восьмой неделе эксперимента единственным значимым предиктором асептического некроза головки бедренной кости являлась экспрессия гена провоспалительного цитокина *IL6*, которая проявляла себя при выполнении логи-

стической регрессии с учетом всех исследуемых генетических и протеомных маркеров (табл. 9).

Исходя из этого, можно утверждать о пролонгированном по времени влиянии неспецифического воспаления в патогенезе асептического некроза. Как видно из таблицы 9, никаких других взаимосвязей не получено. Это доказывает доминирующую роль экспрессии гена *IL6* через 2 месяца течения асептического некроза головки бедренной кости.

К 8-й неделе развития асептического некроза головки бедренной кости экспрессия генов *spp1* и *runx2* способствовала увеличению концентрации MMP9 (табл. 10). Учитывая взаимосвязь активности гена *runx2* на 2-й и 4-й неделе эксперимента можно сделать вывод, что данный ген может играть ключевое значение в отношении синтеза MMP9 на этапах формирования асептического некроза головки бедренной кости.

Обсуждение

Развитие неспецифического воспаления играет важную роль в регуляции остеогенеза и, как правило, направлено на усиление остеокластогенеза, активацию зрелых остеокластов и развитие остеолитических процессов. Представленная работа продемонстрировала гетерогенность иммунорегуляции воспалительного процесса при манифестации и дальнейшем течении аваскулярного некроза головки бедренной кости, при этом молекулярно-клеточные механизмы патогенеза остеодеструкции связаны как с изменениями в профиле мРНК, так и концентрациями некоторых регуляторных белков в головке бедренной кости на фоне хирургически созданного очага гипоперфузии.

Хирургически созданная локальная гипоперфузия в выполненной экспериментальной работе приводит к дефициту кислорода на определенном участке головки бедренной кости. Экспрессия генов *HIF1α*, *TNFα* в первые две недели после хирургически индуцированного асептического некроза выступала в качестве предикторного фактора. Вполне вероятно, что изменение экспрессии гена *HIF1α* связано с созданием зоны гипоперфузии и последующей активацией экспрессии гена *TNFα*, как одного из основных провоспалительных цитокинов. Известно, что ген *HIF1α* кодирует одноименный белок, изменение концентрации которого связано с острой тканевой гипоксией. При этом биологическое действие HIF-1α может быть направлено на модификацию воспалительного ответа, в том числе через его влияние на ген *TNFα*, который связан с активацией центрального сигнального пути остеокластогенеза RANK-RANKL-OPG. Представленные данные свидетельствуют об индук-

ции неспецифического воспаления уже на самых ранних сроках патогенеза асептического некроза головки бедренной кости, при этом триггерным фактором может выступать дефицит кровоснабжения проксимального отдела бедренной кости.

Известно, что ангиогенез и остеогенез тесно связаны [8]. В выполненной работе определена зависимость концентрации протеина VCAM1 на течение асептического некроза. В первые 2 недели эксперимента представленный белок выступал в качестве предикторного фактора аваскулярного некроза. Концентрация протеина VCAM1 влияет на синтез белков окислительного стресса, пролиферацию иммунокомпетентных клеток, а также адгезию их к эндотелию сосудов в ответ на повреждающие факторы, и увеличивается под воздействием провоспалительных цитокинов [9]. Так, предикторное влияние концентрации VCAM1 в первые две недели после хирургически индуцированного аваскулярного некроза подтверждает инициирование неспецифического воспаления с участием сосудистого компонента.

В то же время через 1 месяц после хирургической индукции асептического некроза концентрация регуляторного белка VCAM1 выступала в качестве протекторного фактора. Кроме того, на четвертой неделе развития аваскулярного некроза влияние экспрессии гена *HIF1α* также менялось на протекторное. Полученные данные могут указывать на активацию ангиогенеза и опосредованное усиление остеогенеза [20]. Ряд авторов указывает на возможное участие VCAM1 и HIF-1α в усиление остеогенной дифференцировки прогениторных клеток остеобластогенеза [10, 11]. Однако, по данным гистологического исследования первые две и последующий четыре и шесть недель отображали прогрессирующие хондродеструктивные, остеодеструктивные процессы с увеличением числа активных остеокластов.

При этом одним из ключевых белков, играющих важную роль в развитии остеодеструкции по данным представленного исследования, является MMP9, значимость концентрации которого определяется уже на вторую неделю течения эксперимента. MMP представляет собой семейство протеолитических ферментов, участвующих в деструкции внеклеточного матрикса различных тканей, в том числе и костной, и индуцирующих костную резорбцию [7]. MMP9 высоко экспрессируется как на ранних стадиях остеокластогенеза, так и в зрелых остеокластах. Так, определение роста концентрации белка MMP9 на второй и четвертой неделе эксперимента в качестве предиктора развития асептического некроза, может указывать на активацию дифференцировки зрелых остеокластов и усиление за счет этого осте-

олитических процессов. Синергичное предикторное действие концентрации белков MMP9 и VCAM1 на течение асептического некроза головки бедренной кости в течение первых двух недель патогенеза свидетельствует о развитии воспалительной реакции на фоне сосудистого коллапса. Представленное биологическое действие данных медиаторов при острой тканевой гипоксии также подтверждено в ряде научных работ [2]. Учитывая гистологическую картину, представленные результаты изучения молекулярно-клеточных взаимодействий могут указывать на нарушение баланса ремоделирования костной ткани на 4-й неделе развития асептического некроза головки бедренной кости, на фоне более интенсивного остеокластогенеза по сравнению с остеобластогенезом.

Определены протекторные и прогениторные взаимосвязи между концентрацией белка MMP9 и экспрессией генов, кодирующих протеины участвующих в регуляции костного гомеостаза. Так, в первые две недели после хирургической индукции асептического некроза головки бедренной кости на усиление синтеза MMP9 влияли гены *HIF1α*, *rankl*, *alpl*, при этом прогениторное влияние генов *HIF1α* и *alpl* сохранялось и через 1 месяц после манифестации асептического некроза. В то же время протекторное влияние на синтез протеина MMP9 в первые 2 и 4 недели эксперимента оказывал ген *runx2*. Такие результаты могут быть связаны с увеличением концентрации протеина MMP9 в первый месяц развития аваскулярного некроза в ответ на усиление экспрессии генов, участвующих в активации остеокластогенеза, и в то же время снижении на фоне экспрессии генов остеобластогенеза. Представленные данные могут подтверждать зависимость между функционированием сигнального пути RANK/RANKL/OPG и белком MMP9 и указывать на усиление остеокластогенеза на самых ранних стадиях аваскулярного некроза.

Интерес вызывает изменение влияния гена *runx2* через 8 недель после начала эксперимента. Так, экспрессия данного гена оказывала прогениторное влияние, т. е. способствовала росту концентрации MMP9. При этом на усиление синтеза MMP9 также оказывал влияние ген *spp1*. Таким образом, через 2 месяца после хирургической индукции асептического некроза на увеличение концентрации протеина MMP9 влияли гены моделирования костной ткани. Возможно, такие результаты связаны с изменением биологического действия протеина MMP9 на более поздних стадиях асептического некроза головки бедренной кости. Противовоспалительное биологическое действие MMP9, влияние на дифференцировку хондрогенных и остеогенных клеток

продемонстрировано в ряде исследований [22]. Однако значимого влияния на патогенез аваскулярного некроза концентрации MMP9 через 2 месяца после начала экспериментальной работы не получено. Тем не менее стоит отметить, что по данным гистологического исследования через два месяца после начала эксперимента в препаратах головки бедренной кости определялись признаки усиления остеобластогенеза.

Выполненная работа показала изменения ассоциативного действия экспрессии генов, кодирующих цитокины, при этом ведущий молекулярный паттерн менялся по мере развития асептического некроза. Усиление экспрессии гена *TNFα* выступало в качестве предиктора развития асептического некроза головки бедренной кости на 2-й неделе, гена *IL6* — на 4-й и 8-й неделях, гена *IL4* — на 6-й неделе. Провоспалительные цитокины *TNFα*, *IL-6* рассматриваются рядом авторов как одни из ключевых молекул, способствующих усилению остеокластогенеза [18]. Известно, что биологическое действие провоспалительных цитокинов направлено на увеличение концентрации RANKL, активации дифференцировки зрелых остеокластов. Так, подтверждение предикторной связи между экспрессией генов *TNFα*, *IL6* и развитием аваскулярного некроза на 2-й и 4-й неделе эксперимента, соответственно, указывает на влияние неспецифического воспаления на остеодеструкцию. Стоит отметить сетевой принцип действия цитокинов, при котором экспрессия одного цитокина способствует синтезу другого. Так, на 6-й неделе развития аваскулярного некроза в качестве предикторного фактора выступал ген *IL4*. Некоторые исследователи относят цитокин *IL-4* к антиостеокластогенным медиаторам, однако его биологическое действие является провоспалительным. *IL-4* способствует альтернативной активации макрофагов, стимуляции пролиферации активированных Т-клеток, В-клеток. О дальнейшем прогрессирующем развитии воспаления свидетельствует факт определения в качестве прогенитора течения асептического некроза гена *IL6* через 2 месяца после начала эксперимента.

Полученные данные указывают на развитие каскадности и синергичности биологического действия цитокинов и их влияния на активность сигнальных путей, регулирующих костный гомеостаз. Существует большое количество научных работ, подтверждающих влияние цитокинового статуса на регуляцию остеокластогенеза. Так, прогрессирующее развитие остеодеструкции в представленном эксперименте связано с сохраняющимися активными процессами неспецифического воспаления на фоне изменений цитокинового коктейля вплоть до 2 месяцев после

хирургических манипуляций по созданию зоны гипоперфузии головки бедренной кости.

Таким образом, регуляция активности сигнальных путей, участвующих в поддержании костного гомеостаза, менялась по мере течения аваскулярного некроза. Патогенез костной деструкции связан не только с усилением активности остеокластогенеза, но и снижением интенсивности остеобластогенеза. Одним из способствующих факторов нарушения костного гомеостаза может являться неспецифическое воспаление, ведущие молекулярные паттерны которого менялись в зависимости от времени, прошедшего с момента манифестации аваскулярного некроза, однако значимость медиаторов

воспаления на патогенез остеодеструкции сохранялась до 8 недели эксперимента.

Выводы

Развитие асептического некроза головки бедренной кости крайне гетерогенный процесс. Важная роль в регуляции остеорезорбции принадлежит неспецифическому воспалению, триггером которого может служить острая тканевая гипоксия. Значимое влияние процесса воспаления сохраняется до 8 недель после манифестации аваскулярного некроза головки бедренной кости. При этом ведущий молекулярно-клеточный патологический паттерн нарушения костного гомеостаза меняется в зависимости от стадии течения асептического некроза.

Список литературы / References

1. Гребенникова Т.А., Белая Ж.Е., Рожинская Л.Я., Мельниченко Г.А. Канонический сигнальный путь Wnt/ β -катенин: от истории открытия до клинического применения // Терапевтический архив, 2016. № 10. С. 74-81. [Grebennikova T.A., Belaya Zh.E., Rozhinskaya L.Ya., Melnichenko G.A. The canonical Wnt/ β -catenin pathway: From the history of its discovery to clinical application. *Terapevticheskiy arkhiv = Therapeutic Archive*, 2016, no. 10, pp. 74-81. (In Russ.)]
2. Заковряшина И.Н., Суроедов В.А., Хаишева Л.А., Шлык С.В., Самакаев, А.С. Изучение маркеров системного воспаления (матриксной металлопротеиназы-9, молекул адгезии сосудистого эндотелия 1-го типа) у пациентов с инфарктом миокарда с подъемом сегмента st на госпитальном и амбулаторном этапах // CardioСоматика, 2021. Т. 12, № 3. С. 124-131. [Zakovryashina I.N., Kuroedov V.A., Khaisheva L.A., Shlyk S.V., Samakaev A.S. Study of markers of systemic inflammation (matrix metalloproteinase-9, adhesion molecules of vascular endothelium type 1) in patients with myocardial infarction with st segment elevation at the hospital and outpatient stages. *CardioSomatika = CardioSomatics*, 2021, Vol. 12, no. 3, pp. 124-131. (In Russ.)]
3. Камиллов Ф.Х., Фаршатова Е.Р., Еникеев Д.А. Клеточно-молекулярные механизмы ремоделирования костной ткани и ее регуляция // Фундаментальные исследования, 2014. № 7. С. 836-842. [Kamilov F.K., Farshatova E.R., Enikeev D.A. Cellular and molecular mechanisms remodeling of bone tissue and regulation. *Fundamentalnye issledovaniya = Fundamental Research*, 2014, no. 7, pp. 836-842. (In Russ.)]
4. Adapala N.S., Kim H.K.W. Comprehensive genome-wide transcriptomic analysis of immature articular cartilage following ischemic osteonecrosis of the femoral head in piglets. *PLoS One*, 2016, Vol. 11, no. 4, e0153174. doi:10.1371/journal.pone.0153174.
5. Adapala N.S., Yamaguchi R., Phipps M., Aruwajoye O., Kim H.K.W. Necrotic bone stimulates proinflammatory responses in macrophages through the activation of toll-like receptor 4. *Am. J. Pathol.*, 2016, Vol. 186, no. 11, pp. 2987-2999. doi: 10.1016/j.ajpath.2016.06.024.
6. Amarasekara D.S., Yun H., Kim S., Lee N., Kim H., Rho J. Regulation of osteoclast differentiation by cytokine networks. *Immune Netw*, 2018, Vol. 18, no. 1, e8. doi: 10.4110/in.2018.18.e8.
7. Chen D., Zhang X., Guo Y., Shi S., Mao X., Pan X., Cheng T. MMP-9 inhibition suppresses wear debris-induced inflammatory osteolysis through downregulation of RANK/RANKL in a murine osteolysis model. *Int. J. Mol. Med.*, 2012, Vol. 30, no. 6, pp. 1417-1423.
8. Guo Q., Yang J., Chen Y., Jin X., Li Z., Wen X., Wang Y. Salidroside improves angiogenesis-osteogenesis coupling by regulating the HIF-1 α /VEGF signalling pathway in the bone environment. *Eur. J. Pharmacol.*, 2020, Vol. 884, 173394. doi: 10.1016/j.ejphar.2020.173394.
9. Gkouveris I., Hadaya D., Soundia A., Bezouglaia O., Chau Y., Dry S.M., Pirih F.Q., Aghaloo T.L., Tetradis S. Vasculature submucosal changes at early stages of osteonecrosis of the jaw (ONJ). *Bone*, 2019, Vol. 123, pp. 234-245.
10. Hatori A., Fujii Y., Kawase-Koga Y., Ogasawara T., Chikira J., Minami S., Chikazu D. VCAM-1 and GFPT-2: Predictive markers of osteoblast differentiation in human dental pulp stem cells. *Bone*, 2023, Vol. 166, 116575. doi: 10.1016/j.bone.2022.116575.
11. Kamiya N., Shafer S., Oxendine I., Mortlock D.P., Chandler R.L., Oxburgh L., Kim H.K. Acute BMP2 upregulation following induction of ischemic osteonecrosis in immature femoral head. *Bone*, 2013, Vol. 53, no. 1, pp. 239-247.

12. Kim H.K.W., Wiesman K.D., Kulkarni V., Burgess J., Chen E., Brabham C., Ikram H., Du J., Lu A., Kulkarni A.V., Dempsey M., Herring J.A. Perfusion MRI in early stage of legg-calvé-perthes disease to predict lateral pillar involvement: a preliminary study. *J. Bone Joint Surg.*, 2014, Vol. 96, no. 14, pp. 1152-1160.
13. Lieu S., Hansen E., Dedini R., Behonick D., Werb Z., Miclau T., Colnot C. Impaired remodeling phase of fracture repair in the absence of matrix metalloproteinase-2. *Dis. Model. Mech.*, 2011, Vol. 4, no. 2, pp. 203-211.
14. Lu X., Mu E., Wei Y., Riethdorf S., Yang Q., Yuan, M., Yan J., Kang, Y. VCAM-1 promotes osteolytic expansion of indolent bone micrometastasis of breast cancer by engaging $\alpha 4 \beta 1$ -positive osteoclast progenitors. *Cancer Cell*, 2011, Vol. 20, no. 6, pp. 701-714.
15. Malhotra S., Kincade P.W. Canonical Wnt pathway signaling suppresses VCAM-1 expression by marrow stromal and hematopoietic cells. *Exp. Hematol.*, 2009, Vol. 37, no. 1, pp. 19-30.
16. Nyman J.S., Lynch C.C., Perrien D.S., Thiollay S., O'Quinn E.C., Patil C.A., Mundy G.R. Differential effects between the loss of MMP-2 and MMP-9 on structural and tissue-level properties of bone. *J. Bone Miner. Res.*, 2011, Vol. 26, no. 6, pp. 1252-1260.
17. Samara S., Dailiana Z., Chassanidis C., Koromila T., Papatheodorou L., Malizos K.N., Kollia P. Expression profile of osteoprotegerin, RANK and RANKL genes in the femoral head of patients with avascular necrosis. *Exp. Mol. Pathol.*, 2014, Vol. 96, no. 1, pp. 9-14.
18. Sun Z., Zeng J., Wang W., Jia X., Wu Q., Yu D., Mao Y. Magnoflorine suppresses MAPK and NF- κ B signaling to prevent inflammatory osteolysis induced by titanium particles in vivo and osteoclastogenesis via RANKL in vitro. *Front. Pharmacol.*, 2020, Vol. 11, 389. doi: 10.3389/fphar.2020.00389.
19. Wang X., Yu Y. Y., Lieu S., Yang F., Lang J., Lu C., Werb Z., Colnot C. MMP9 regulates the cellular response to inflammation after skeletal injury. *Bone*, 2013, Vol. 52, no. 1, pp. 111-119.
20. Xiang X., Pathak J.L., Wu W., Li J., Huang W., Wu Q., Xin M., Wu Y., Huang Y., Ge L., Zeng, S. Human serum-derived exosomes modulate macrophage inflammation to promote VCAM1-mediated angiogenesis and bone regeneration. *J. Cell. Mol. Med.*, 2023, Vol. 27, no. 8, pp. 1131-1143.
21. Yellowley C.E., Genetos D.C. Hypoxia signaling in the skeleton: implications for bone health. *Curr. Osteoporos. Rep.*, 2019, Vol. 17, pp. 26-35.
22. Zhang H., Liu L., Jiang C., Pan K., Deng J., Wan C. MMP9 protects against LPS-induced inflammation in osteoblasts. *Innate Immun.*, 2020, Vol. 26, no. 4, pp. 259-269.

Авторы:

Шабалдин Н.А. — к.м.н., доцент, заведующий кафедрой детских хирургических болезней ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Кемерово, Россия

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

Authors:

Shabaldin N.A., PhD (Medicine), Associate Professor, Head, Department of Pediatric Surgical Diseases, Kemerovo State Medical University, Kemerovo, Russian Federation

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

Богданов Л.А. — младший научный сотрудник лаборатории молекулярной, трансляционной и цифровой медицины ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», г. Кемерово, Россия

Шабалдин А.В. — д.м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории клеточных технологий отдела экспериментальной медицины ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний»; профессор кафедры поликлинической педиатрии, пропедевтики детских болезней и последипломной подготовки ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Кемерово, Россия

Bogdanov L.A., Junior Research Associate, Laboratory of Molecular, Translational and Digital Medicine, Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases, Kemerovo, Russian Federation

Shabaldin A.V., PhD, MD (Medicine), Leading Research Associate, Laboratory of Cell and Tissue Engineering, Department of Experimental Medicine, Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases; Professor, Department of Polyclinic Pediatrics, Propaedeutics of Childhood Diseases and Postgraduate Training, Kemerovo State Medical University, Kemerovo, Russian Federation

Поступила 22.06.2023
Принята к печати 05.10.2023

Received 22.06.2023
Accepted 05.10.2023

ВЛИЯНИЕ ПРОИЗВОДНЫХ 5-ОКСИПИРИМИДИНА И ПРЕПАРАТА СРАВНЕНИЯ ЭРИУС НА ВЫРАЖЕННОСТЬ СИСТЕМНОЙ РЕАКЦИИ АНАФИЛАКСИИ, УРОВЕНЬ ИММУНОГЛОБУЛИНА Е И ЦИТОКИНОВ У МЫШЕЙ ЛИНИИ BALB/c

Коваленко Л.П., Журиков Р.В., Вальдман Е.А., Никитин С.В.

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фармакологии имени В.В. Закусова», Москва, Россия

Резюме. В настоящее время наблюдается рост заболеваний с нарушением баланса Th1/Th2-лимфоцитов и цитокинов, таких как аллергия, аутоиммунные и онкологические заболевания. Известно, что производные пиримидина обладают широким спектром фармакологической активности, в том числе противоаллергенным действием. Цель — изучить влияние производных 5-оксипиримидинов на реакцию системной анафилаксии, содержание иммуноглобулина Е и цитокинов в сыворотке крови у мышей, сенсibilизированных овальбумином, по сравнению с препаратом Эриус.

Опыт проводили на 140 самцах мышей линии Balb/c. 120 мышей двукратно иммунизировали с интервалом 2 недели подкожным введением овальбумина (100 мкг/мышь) в смеси с гидроокисью алюминия (5 мг/мышь), 20 мышей — интактный контроль. После второй иммунизации в течение 7 дней 120 животным опытных групп вводили СНК-411 или СНК-578 внутривентрально (в/б) в дозах 25 мг/кг и 50 мг/кг и Эриус (в/б, 1,3 мг/кг). Через 1 час после последнего введения препаратов 70 мышам контрольных и опытных групп в ретроорбитальный синус вводили овальбумин (по 100 мкг в 0,1 мл физиологического раствора) и оценивали уровень системной реакции анафилаксии. 70 мышей контрольных и опытных групп забивали методом декапитации, и определяли содержание IgE и цитокинов IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-11, IL-17A, IL-17F, IFN γ , IL-13 в сыворотках крови.

Введение СНК-411 и СНК-578 в дозе 50 мг/кг вызывало подавление системной реакции анафилаксии и снижение содержания IgE в сыворотках крови мышей в 1,5-1,6 раза, введение препарата Эриус не вызывало снижения концентрации IgE. Введение СНК-411 и СНК-578 в дозах 25 мг/кг и 50 мг/кг и препарата Эриус снижало концентрацию Th2-цитокинов IL-4, IL-5, IL-13 по сравнению с активным контролем. Введение СНК-411 и СНК-578 в дозах 25 и 50 мг/кг увеличивало содержание IL-2, введение СНК-578 в дозе 50 мг/кг также увеличивало содержание IFN γ до уровня интактного контроля и снижало содержание IL-6.

Производные 5-оксипиримидинов при курсовом 7-дневном введении в дозе 50 мг/кг вызвали подавление реакции системной анафилаксии. СНК-411, СНК-578 и Эриус снизили содержание про-

Адрес для переписки:

Журиков Руслан Владимирович
ФГБНУ «Научно-исследовательский институт
фармакологии имени В.В. Закусова»
125315, Россия, Москва, ул. Балтийская, 8.
Тел.: 8 (499) 151-18-81.
E-mail: zakusovpharm@mail.ru

Address for correspondence:

Ruslan V. Zhurikov
8 Baltiyskaya St
Moscow
125315 Russian Federation
Phone: +7 (499) 151-18-81.
E-mail: zakusovpharm@mail.ru

Образец цитирования:

Л.П. Коваленко, Р.В. Журиков, Е.А. Вальдман, С.В. Никитин «Влияние производных 5-оксипиримидина и препарата сравнения Эриус на выраженность системной реакции анафилаксии, уровень иммуноглобулина Е и цитокинов у мышей линии Balb/c» // Медицинская иммунология, 2024. Т. 26, № 6. С. 1197-1204. doi: 10.15789/1563-0625-EOH-2870

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

For citation:

L.P. Kovalenko, R.V. Zhurikov, E.A. Valdman, S.V. Nikitin “Effect of 5-hydroxypyrimidine derivatives and reference drug Aeriус on systemic anaphylaxis, concentration of immunoglobulin E and cytokines tested in Balb/c mice”, Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2024, Vol. 26, no. 6, pp. 1197-1204. doi: 10.15789/1563-0625-EOH-2870

© Kovalenko L.P. et al., 2024
The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License
DOI: 10.15789/1563-0625-EOH-2870

аллергенных цитокинов в сыворотке крови сенсibilизированных мышей. При этом производные 5-оксипиримидина, в отличие от Эриуса, снизили содержание иммуноглобулина E.

Ключевые слова: анафилаксия, 5-гидроксипиримидины, дезлоратадин, иммуноглобулин E, аллергия, цитокины

EFFECT OF 5-HYDROXYPYRIMIDINE DERIVATIVES AND REFERENCE DRUG AERIUS ON SYSTEMIC ANAPHYLAXIS, CONCENTRATION OF IMMUNOGLOBULIN E AND CYTOKINES TESTED IN BALB/c MICE

Kovalenko L.P., Zhurikov R.V., Valdman E.A., Nikitin S.V.

V. Zakusov Research Institute of Pharmacology, Moscow, Russian Federation

Abstract. Imbalance of Th1/Th2 lymphocytes and cytokines is responsible for increasing rate of pathology, such as allergy, autoimmune processes and cancer. Pyrimidines have a wide spectrum of pharmacological activity, for example antiallergic properties.

The aim of this study is to investigate effects of 5-hydroxypyrimidine derivatives on systemic anaphylaxis, concentrations of immunoglobulin E (IgE) and cytokines in comparison with Aeriус in experiments on ovalbumin-induced systemic anaphylaxis model.

Effects of 7-day course of intraperitoneal (i/p) administration of SNK-411, SNK-578 at the doses of 25 mg/kg and 50 mg/kg, Aeriус (i/p, 1.3 mg/kg) were studied in 140 male Balb/c ovalbumin-sensitized mice. 120 mice were immunized by two injections (two-week interval) of ovalbumin (100 mg per mouse) mixed with aluminum hydroxide (5 mg per mouse). 20 mice were used as intact control. Administration of SNK-411, SNK-578, or Aeriус began after second immunization and lasted for 7 days. Within one hour after last injection of the compounds, 70 mice received injection of ovalbumin (100 mg dissolved in 0.1 mL saline) in retroorbital sinus. 70 mice from control and experimental groups were euthanized by decapitation. IgE, Interleukin-2 (IL-2), IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-11, IL-17A, IL-17F, Interferon gamma (IFN γ), IL-13 concentrations were measured in blood sera.

Administration of SNK-411, SNK-578 at the dose of 50 mg/kg decreased systemic anaphylaxis, lowered IgE concentration by 1.5-1.6 times compared to ovalbumin control group whereas Aeriус did not reduce concentration of IgE. Administration of SNK-411, SNK-578 at 25 mg/kg, and 50 mg/kg, and Aeriус decreased concentration of Th-2 cytokines (IL-4, IL-5, IL-13) compared to ovalbumin-treated control group. SNK-411, SNK-578 at the doses of 25 mg/kg and 50 mg/kg increased level of IL-2. SNK-578 at 50 mg/kg increased concentration of IFN γ up to intact control level and decreased concentration of IL-6.

7-day administration of 5-hydroxypyrimidine derivatives at the dose of 50 mg/kg decreased severity of systemic anaphylaxis. SNK-411, SNK-578, Aeriус lowered levels of proallergic cytokines in serum of sensitized mice. In contrast to Aeriус, the 5-hydroxypyrimidine derivatives decreased serum IgE concentrations.

Keywords: anaphylaxis, 5-hydroxypyrimidines, desloratadine, immunoglobulin E, allergy, cytokines

Введение

Производные пиримидина нашли свое применение в лечении инфекционных, хирургических, неврологических, онкологических и других заболеваний и представляют собой группу химических соединений с широким спектром фармакологической активности и низкой токсичностью, в связи с этим данная группа веществ рассматривается как основа для синтеза новых потенциальных фармакологически эффективных соединений [4, 10, 14].

В настоящее время наблюдается интенсивный рост заболеваний, связанных с патологией иммунной системы: аллергия, аутоиммунные и ряд онкологических заболеваний связаны с патологически избыточным Th2- и Th17-типом иммунного ответа, нарушением баланса Th1/Th2-лимфоцитов и цитокинов [1].

В ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова» в отделе химии были разработаны и синтезированы малотоксичные производные 5-оксипиримидина СНК-411 (2-изобутил-4,6-диметил-5-оксипиримидина — патент RU2518889, 10.06.2014) и СНК-578 (хлоргидрат 2-изобутил-

4,6-диметил-5-оксипиримидина — патент RU2686672, 30.04.2019). На соединение СНК-578 получен евразийский патент № 041226 от 28 сентября 2022 года.

В опытах на мышах различных линий с переносимыми солидными опухолями: эпидермоидной карциномой легкого Льюиса (LLC), меланомой В-16, раком шейки матки (РШМ-5), аденокарциномой молочной железы Са-755, производные 5-оксипиримидина показали выраженную противовоспалительную, противоопухолевую и антиметастатическую активность, а также подавление содержания в сыворотках крови мышей — опухоленосителей концентрации Th2-цитокинов (IL-4, IL-5, IL-10) и провоспалительных IL-6 и IL-17A [2, 5, 6, 9]. У мышей линии C57Bl/6 с LLC при введении СНК-411 и СНК-578 определено выраженное снижение (в 4 раза и более) концентрации в сыворотках крови плеiotропного IL-4, который при аллергических заболеваниях совместно с IL-13 участвует в синтезе иммуноглобулина Е (IgE) [6]. На морских свинках альбиносах ранее нами были получены данные о подавлении производными 5-оксипиримидина системной реакции анафилаксии к классическому аллергену овальбумину [3].

Целью настоящей работы является исследование противоаллергенной активности СНК-411 и СНК-578 на модели анафилаксии к овальбумину в опытах на самцах мышей линии Balb/c с оценкой их влияния на реакцию системной анафилаксии к овальбумину, а также на содержание IgE и цитокинов в сыворотках крови сенсibilизированных мышей.

Материалы и методы

Изучение действия производных 5-оксипиримидина и препарата сравнения Эриус (дезоратадин) на реакцию общей системной анафилаксии к овальбумину было проведено в опытах на 140 мышах линии Balb/c, полученных из филиала «Столбовая» ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства». Животных содержали в виварии ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова» при 12-часовом световом режиме на стандартном сбалансированном брикетированном корме со свободным доступом к пище и воде при естественном освещении и температуре воздуха 20–21 °С. Все эксперименты с животными проводили в соответствии с международными правилами (Директивой 2010/63/EU Европейского Парламента и Совета Европейского Союза от 22 сентября 2010 года по охране животных, используемых в научных целях) и правилами работы с животными, утвержденными этической комиссией ФГБНУ «НИИ фармакологии имени

В.В. Закусова». 120 мышам проводили двукратную иммунизацию с интервалом 2 недели подкожным ведением овальбумина (Sigma-Aldrich, США, 100 мкг/мышь) в смеси с гидроокисью алюминия (Sigma-Aldrich, США, 5 мг/мышь) в объеме 0,2 мл. Затем 140 мышей распределили на 7 следующих групп: 1) группа интактного контроля; 2) группа активного контроля, мышей которой иммунизировали овальбумином в смеси с гидроокисью алюминия в качестве адъюванта; 3) препарат сравнения Эриус (Bayer Bitterfeld, GmbH, Германия), таблетки растирали в 1%-ном крахмале и вводили в/б в дозе 1,3 мг/кг, (что соответствует дозе 10 мг для человека по Freireich и соавт., 1966); 4) СНК-411 в/б вводили в дозе 25 мг/кг; 5) СНК-411 вводили в/б в дозе 50 мг/кг; 6) СНК-578 вводили в/б в дозе 25 мг/кг; 7) СНК-578 вводили в дозе 50 мг/кг. После второй иммунизации овальбумином в течение 7 дней 20 мышам групп интактного и активного контроля вводили в/б по 0,2 мл физиологического раствора, животным опытных групп вводили СНК-411, СНК-578 и препарат сравнения Эриус. Через 1 час после последнего введения препаратов 70 мышам контрольных и опытных групп в ретроорбитальный синус вводили внутривенно овальбумин (по 100 мкг в 0,1 мл физиологического раствора) и оценивали уровень системной реакции анафилаксии. У иммунизированных овальбумином мышей развивалась анафилактическая реакция различной степени тяжести. Выделяли следующие степени выраженности анафилаксии: 1-я (слабая) степень — угнетенное состояние, взъерошенность шерстного покрова; 2-я (средняя) степень — угнетенное состояние, взъерошенность шерстного покрова, цианоз конечностей, дыхание поверхностное и учащенное, клонические судороги, парезы, параличи; 3-я (тяжелая) степень — судороги, параличи, гибель в течение 60 минут [1].

После введения препаратов половину животных контрольных и опытных групп забивали методом декапитации, содержание IgE и цитокинов IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-11, IL-17A, IL-17F, IFN γ , IL-13 в сыворотках крови определяли на проточном цитометре BD FACSCanto II (BD Biosciences, США) методом мультиплексного определения флуоресцентных частиц, с помощью наборов BioLegend LEGENDplex Mouse IgE Assay и LEGENDplex Custom Mouse 10-plex Panel (BioLegend, США), согласно протоколу производителя. Результаты обрабатывали в программе LEGENDplex v. 8.0 и выражали в пг/мл или нг/мл.

Статистическую обработку экспериментальных данных проводили с помощью программы Statistica 10. Все регистрируемые характеристики животных представлены в таблицах в виде сред-

него и стандартной ошибки среднего ($\text{Mean} \pm \text{SEM}$). Проверка на нормальность распределения проводилась с применением критерия Шапиро–Уилка. Для проверки гипотезы об однородности групп исследования с нормальным распределением в исследуемой популяции проводили тестирование отсутствия различий между группами при помощи t-критерия Стьюдента. В случае не Гауссовского распределения для сравнения показателей использовался непараметрический критерий Манна–Уитни.

Оценку гомогенности дисперсий проводили по Левену. Значимость влияния факторов при гомогенной дисперсии определялась с помощью дисперсионного анализа ANOVA, с последующей обработкой методом множественных сравнений по Тьюки.

Результаты

У иммунизированных овальбумином мышей развивалась анафилактическая реакция различной степени тяжести. У животных группы интактного контроля реакция анафилаксии не развивалась. 6 животных из 10 в группе активного контроля погибли в течение 15–20 минут, у 2 развивалась анафилаксия средней степени угнетенного состояния у 2 мышей – слабой степени. При введении СНК-411 в дозе 25 мг/кг в результате реакции анафилаксии погибло 5 мышей, у одной развивалась анафилаксия средней степени тяжести, у 4 развивалась анафилаксия легкой степени тяжести, при введении СНК-411 в дозе 50 мг/кг

погибли 3 мыши, у 3 мышей развивалась анафилаксия легкой степени тяжести, у 4 мышей реакция отсутствовала. При введении СНК-578 в дозе 25 мг/кг от тяжелой степени реакции системной анафилаксии 4 мыши погибли, у 3 животных развивалась реакция средней тяжести, у 3 мышей реакция отсутствовала. При введении СНК-578 в дозе 50 мг/кг погибло 3 мыши, у одной мыши наблюдали слабую реакцию анафилаксии, у другой мыши – среднюю, у 5 мышей реакция анафилаксии отсутствовала. При введении препарата Эриус погибло 4 мыши, у 1-й мыши наблюдали реакцию анафилаксии легкой степени, у 5 мышей реакция отсутствовала.

Введение СНК-411 и СНК-578 в дозе 50 мг/кг вызывало значимое подавление системной реакции анафилаксии и содержания IgE в сыворотке крови сенсibilизированных мышей в 1,5–1,6 раза (рис. 1, табл. 1). Введение блокатора H1-рецепторов и стабилизатора мембран тучных клеток препарата Эриус не вызывало значимого подавления системной реакции анафилаксии и концентрации IgE в сыворотках крови иммунизированных овальбумином мышей.

Концентрации IL-10 и IL-17F цитокинов в сыворотках крови мышей контрольных и опытных групп были ниже определяемого минимального порогового значения.

Согласно данным, представленным в таблице 2, иммунизация мышей овальбумином в смеси с гидроокисью алюминия приводила к уменьшению концентрации Th1-цитокинов в сыво-

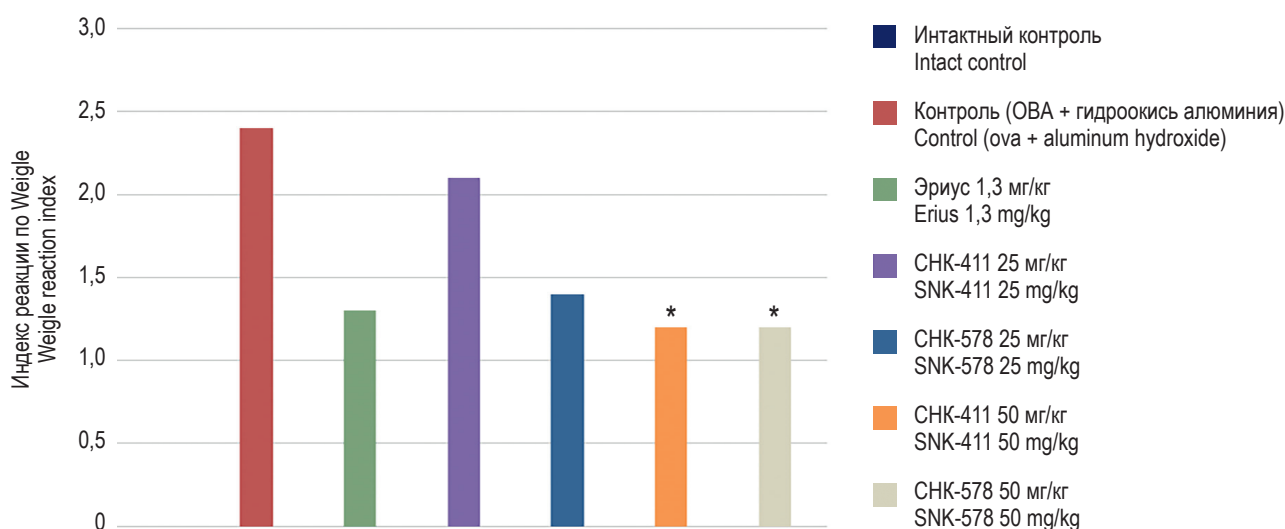


Рисунок 1. Влияние СНК-411 и СНК-578 на выраженность аллергической реакции на модели системной анафилаксии на овальбумин у мышей линии Balb/c

Примечание. * – $p < 0,05$ по сравнению с активным контролем, критерий Манна–Уитни.

Figure 1. Effect of SNK-411 and SNK-578 on allergic reaction in experimental model of ovalbumin-induced systemic anaphylaxis on Balb/c mice

Note. *, $p < 0,05$ compared to control (ovalbumin+aluminum hydroxide); Mann–Whitney test.

ТАБЛИЦА 1. ВЛИЯНИЕ ПРОИЗВОДНЫХ 5-ОКСИПИРИМИДИНА НА УРОВЕНЬ ИММУНОГЛОБУЛИНА Е (IgE) У ИММУНИЗИРОВАННЫХ ОВАЛЬБУМИНОМ В ГИДРООКСИ АЛЮМИНИЯ САМЦОВ МЫШЕЙ ЛИНИИ BALB/c

TABLE 1. EFFECT OF 5-HYDROXYPYROMIDINE DERIVATIVES ON CONCENTRATION OF IgE IN EXPERIMENT ON MALE BALB/c MICE SENSITIZED BY OVALBUMINUM WITH ALUMINUM HYDROXIDE

Группы животных Animal groups n = 10	Концентрация IgE (нг/мл) Concentration of IgE (ng/mL)
Контроль Control	48,4±7,3
Контроль (альбумин + гидроокись алюминия) Control (ovalbumin + aluminum hydroxide)	80,6±6,5*
Эриус 1,3 мг/кг Aerius 1,3 mg/kg	57,0±5,5*
СНК-411 25 мг/кг SNK-411 25 mg/kg	73,2±8,9*
СНК-411 50 мг/кг SNK-411 50 mg/kg	50,1±6,5**
СНК-578 25 мг/кг SNK-578 25 mg/kg	64,5±5,1*
СНК-578 50 мг/кг SNK-578 50 mg/kg	48,6±5,3**

Примечание. n – количество животных в группе; * – $p < 0,05$ по критерию Тьюки по сравнению с контрольной группой; ** – $p < 0,05$ по критерию Тьюки по сравнению с активным контролем.

Note. n, number of animals in group; *, $p < 0.05$ compared to control group, Tukey test; **, $p < 0.05$ compared to control (ovalbumin + aluminum hydroxide), Tukey test.

ТАБЛИЦА 2. ВЛИЯНИЕ ПРОИЗВОДНЫХ 5-ОКСИПИРИМИДИНА НА УРОВЕНЬ ЦИТОКИНОВ У ИММУНИЗИРОВАННЫХ ОВАЛЬБУМИНОМ В ГИДРООКСИ АЛЮМИНИЯ САМЦОВ МЫШЕЙ ЛИНИИ BALB/c

TABLE 2. EFFECT OF 5-HYDROXYPYRIMIDINE DERIVATIVES ON CONCENTRATIONS OF CYTOKINES IN EXPERIMENT ON MALE BALB/c MICE SENSITIZED BY OVALBUMIN WITH ALUMINUM HYDROXIDE

Группы животных Animal groups n = 10	Концентрация цитокинов (пг/мл) Cytokine concentration (pg/mL)							
	IFN γ	IL-2	IL-4	IL-13	IL-5	IL-6	IL-11	IL-17A
Контроль интактный Intact control	245,77± 25,19	124,64± 17,42	14,28± 4,43	20,47± 2,56	34,46± 5,24	20,87± 5,82	107,55± 20,08	28,64± 7,51
Активный контроль Active control	32,45± 8,04*	68,24± 3,39*	33,02± 2,57	39,27± 4,34	57,10± 7,44	59,06± 21,90*	95,20± 10,39	22,49± 2,05
Эриус 1,3 мг/кг Aerius 1,3 mg/kg	57,23± 8,40*	60,44± 9,30*	9,00± 0,63**	8,06± 2,98**	18,55± 0,40**	40,28± 7,90	60,37± 18,70	15,08± 4,37
СНК-411 25 мг/кг SNK-411 25 mg/kg	49,05± 9,98*	100,24± 14,18	9,14± 0,64**	1,65± 0,29**	16,54± 3,38**	27,34± 2,67	40,91± 8,14**	9,63± 1,56*
СНК-411 50 мг/кг SNK-411 50 mg/kg	164,36± 16,79*	100,05± 10,07	10,05± 0,62**	5,34± 2,24**	21,87± 5,09**	95,21± 8,48	34,28± 5,45**	10,18± 2,70*
СНК-578 25 мг/кг SNK-578 25 mg/kg	98,25± 37,55*	105,49± 14,80	12,47± 2,47**	5,68± 2,27**	18,46± 4,96**	30,04± 3,16	48,90± 11,40**	17,61± 3,38
СНК-578 50 мг/кг SNK-578 50 mg/kg	305,26± 59,38	102,40± 17,66	10,32± 0,95**	5,38± 2,42**	26,14± 3,77**	2,75± 0,22**	30,58± 5,56**	15,89± 2,23

Примечание. n – количество животных в группе; * – $p < 0,05$ по критерию Тьюки по сравнению с интактным контролем; ** – $p < 0,05$ по критерию Тьюки по сравнению с активным контролем (овальбумин + гидроксид алюминия).

Note. n, number of animals in group; *, $p < 0.05$ compared to active control group, Tukey test; **, $p < 0.05$ compared to active control (ovalbumin + aluminum hydroxide), Tukey test.

ротках крови, а именно $IFN\gamma$, IL-2, и увеличению концентрации Th2-цитокинов IL-4, IL-5, IL-13, а также IL-6. Курсовое введение СНК-411 и СНК-578 в дозах 25 мг/кг и 50 мг/кг и препарата Эриус значимо подавляло концентрацию Th2-цитокинов IL-4, IL-5, IL-13 по сравнению с активным контролем. Введение СНК-411 и СНК-578 в дозах 25 мг/кг и 50 мг/кг значимо увеличивало содержание IL-2, введение СНК-578 в дозе 50 мг/кг также увеличивало содержание $IFN\gamma$ до уровня интактного контроля и значимо подавляло содержание IL-6. СНК-411 и СНК-578 подавляли содержание IL-11 по сравнению с активным контролем, СНК-411 подавлял содержание IL-17A.

Обсуждение

В настоящее время определены основные Th2-цитокины, вызывающие воспаление 2-го типа (T2 воспаление) при тяжелых иммуноопосредованных заболеваниях, имеющих общую патогенетическую основу [7]. IL-4, IL-13 и IL-5 стали фармакологическими мишенями при тяжелых формах бронхиальной астмы и других аллергических заболеваниях.

Таргетная терапия в виде препарата дупилумаб, который является блокатором IL-4 и IL-13, применение препаратов меполизумаб и реслизумаб (моноклональные антитела к IL-5) при эозинофильной астме вызывают подавление воспалительных каскадов, инициированных различными T2-клетками. Идет активный поиск соединений регулирующих баланс Th1/Th2-цитокинов, в частности было показано, что Гинзенозид Rh1 (G-Rh1), который является одним из основных биологически активных соединений, извлеченных из красного женьшеня, снижает содержание IL-4, IL-5, IL-13 и IL-33 и стабилизирует содержание $IFN\gamma$ и IL-12 у мышей с бронхиальной астмой, индуцированной овальбумином [13].

В опытах на мышах Balb/c получены данные о снижении производными 5-оксипиримидина концентрации Th2-цитокинов IL-4 и IL-13 в сыворотках крови сенсibilизированных мышей, участвующих в синтезе IgE, и подтверждены полученные ранее результаты о подавлении реакции системной анафилаксии на овальбумин производными 5-оксипиримидина у морских свинок альбиносов [3]. В связи с этим подавление производными 5-оксипиримидина системной анафилаксии, снижение содержания IgE и проаллергенных цитокинов IL-4, IL-13 и IL-5 на модели анафилаксии к овальбумину и в опытах на мышах указывает на перспективность дальнейшей разработки этих соединений в качестве противоаллергенных средств. В настоящей работе подтверждены данные экспериментальных исследо-

ваний на мышах о снижении препаратом Эриус содержания Th2-цитокинов IL-4 и IL-5 [11].

Экспрессия основного плеiotропного и провоспалительного цитокина IL-6 наблюдается при ревматоидном артрите, псориазе, множественной миеломе и ряде других онкологических заболеваний. Тиенопиримидины дозозависимо ингибируют экспрессию Stat3 сигнального пути путем подавления фосфорилирования Stat3 и ERK1/2, что, возможно, также является одним из механизмов действия производных 5-оксипиримидина [12]. Введение СНК-578 в дозе 50 мг/кг выражено снижало уровень провоспалительного и проонкогенного IL-6 в сыворотках мышей опытных групп, что подтверждает полученные нами данные о подавлении 5-оксипиримидинами содержания IL-6 в сыворотках крови мышей-опухоленосителей с LLC и РШМ-5 [2, 6]. У сенсibilизированных овальбумином мышей производные 5-оксипиримидина в дозах 25 мг/кг и 50 мг/кг выражено подавили содержание IL-11, который является членом семейства цитокинов IL-6. В последнее время интерес к IL-11 вызывает его недавно признанная роль в патогенезе заболеваний, связанных с нарушением регуляции гомеостаза слизистой оболочки, включая рак желудочно-кишечного тракта. IL-11 увеличивает онкогенную способность клеток, включая выживаемость, пролиферацию опухолевых клеток и выживаемость метастатических клеток в отдаленных органах [15].

По данным литературы, цитокины IL-17A и IL-17F ассоциированы с различными аутоиммунными и воспалительными заболеваниями, такими как ревматоидный артрит, системная красная волчанка, рассеянный склероз, псориаз [16]. Проонкогенное действие IL-17A наблюдается во многих опухолевых образованиях, IL-17 и IL-17A участвуют в ангиогенезе у мышей с меланомой B-16 и с раком мочевого пузыря, стимулируют синтез IL-6 и активируют сигнальный путь JAK/STAT3 [18]. В настоящей работе определено снижение содержания IL-17A при введении СНК-411 у сенсibilизированных овальбумином мышей Balb/c, что было также нами отмечено при введении производных 5-оксипиримидина мышам с опухолью РШМ-5 [2].

Данные литературы о возможной взаимосвязи между механизмами воспалительных процессов при аллергических и ряде онкологических заболеваний достаточно противоречивы. Однако в последние годы были опубликованы результаты клинических исследований, где указывается, что интерлейкины IL-4 и IL-13, усиливая дисбаланс в сторону T2-воспаления, вызывают и стимулируют синтез иммуноглобулина E (IgE), при повышенных концентрациях которого в сы-

воротках крови пациентов выше 10 000 МЕ/мл, кроме аллергических болезней возможно развитие аутоиммунных и онкологических заболеваний [8]. Согласно исследованиям последних лет, при развитии опухолевого процесса происходит активация синтеза цитокинов в различных клетках, в том числе и опухолевых, в частности плейотропного IL-4, медиатора дифференцировки Т-лимфоцитов по Th2-типу, подавляющего дифференцировку Т-лимфоцитов по Th1-типу. При онкологических заболеваниях IL-4 действует через STAT6 сигнальный путь, увеличивает резистентность к CD95-зависимому апоптозу опухолевых клеток, вызывает активацию развития опухоль-ассоциированных иммунодепрессивных макрофагов (ТАМ), стимулирующих ангиогенез и усиливающих инвазию, выживание и постоянный рост опухолевых клеток [17]. Плейотропный интерлейкин IL-4 в настоящее время рассматривается как одна из фармакологических мишеней при онкологических заболеваниях. Полученные

в данной работе данные указывают на возможное применение производных 5-оксипиримидина с высокомолекулярными таргетными противоопухолевыми препаратами, вызывающими гиперсенситизацию.

Выводы

1. Производные 5-оксипиримидина и препарат Эриус при курсовом 7-дневном введении сенситизированным овальбумином мышам значительно снижают содержание Th2-цитокинов IL-4, IL-5 и IL-13.

2. Введение препарата Эриус в дозе 1,3 мг/кг снижало содержание проаллергенных цитокинов, но не вызывало значимого снижения концентрации IgE в сыворотках крови сенситизированных мышей.

3. Введение СНК-411 и СНК-578 в дозе 50 мг/кг вызывало значимое подавление системной реакции анафилаксии и содержания IgE в сыворотках крови мышей Balb/c в 1,5-1,6 раза.

Список литературы / References

1. Бельская Н.В., Данилец М.Г., Бельский Ю.П., Трофимова Е.С., Учасова Е.Г., Борсук О.С., Агафонов В.И. Моделирование системной анафилаксии на мышах линии BALB/c // Биомедицина, 2010. Т. 1, № 1. С. 37-50. [Belska N.V., Danilets M.G., Belsky E.S., Trophimova Y.P., Utchasova E.G., Borsuk O.S., Agaphonov V.I. Modelling of an anaphylaxis using BALB/c mice. *Biomeditsina = Biomedicine*, 2010, Vol. 1, no. 1, pp. 37-50. (In Russ.)]
2. Коваленко Л.П., Коржова К.В., Зайнуллина Л.Ф., Никитин С.В., Иванова Е.А., Журиков Р.В. Влияние производных 5-оксипиримидина на рост опухоли и содержание интерлейкинов в сыворотке крови самок мышей линии СВА с раком шейки матки (РШМ-5) // Биомедицинская химия, 2021. Т. 67, № 2. С. 158-161. [Kovalenko L.P., Korzhova K.V., Zainullina L.F., Nikitin S.V., Ivanova E.A., Zhurikov R.V. Effect of 5-hydroxypyrimidine derivatives on tumor growth and cytokine concentration in blood serum of female CBA mice with cervical cancer (RSHM-5). *Biomeditsinskaya khimiya = Biomedical Chemistry*, 2021, Vol. 67, no. 2, pp. 158-161. (In Russ.)]
3. Коваленко Л.П., Коржова К.В., Никитин С.В. Противоаллергенная и противовоспалительная активность 5-оксипиримидина (СНК-411 и СНК-578) // Экспериментальная и клиническая фармакология, 2020. Т. 83, № 10. С. 9-12. [Kovalenko L.P., Korzhova K.V., Nikitin S.V. Antiallergenic and anti-inflammatory activity of 5-oxypyrimidine. *Ekspperimentalnaya i klinicheskaya farmakologiya = Experimental and Clinical Pharmacology*, 2020, Vol. 83, no. 10, pp. 9-12. (In Russ.)]
4. Кодониди И.П., Сочнев В.С., Терехов А.Ю., Сергеева Е.О., Рябухин И.Ю. Синтез и изучение противовоспалительной активности 2-винилпроизводных 4-(2,6-диметил-4-оксо-5-фенил-4h-пиримидин-1-ил)-бензсульфамида // Современные проблемы науки и образования, 2021. № 4. [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://science-education.ru/ru/article/view?id=31053>. [Kodonidi I.P., Sochnev V.S., Terekhov A.Yu., Sergeeva E.O., Ryabukhin Yu.I. Synthesis and study of anti-inflammatory activity 2-vinyl derivatives of 4-(2,6-dimethyl-4-oxo-5-phenyl-4h-pyrimidin-1-yl)-benzsulfonamide. *Sovremennyye problemy nauki i obrazovaniya = Modern Problems of Science and Education*, 2021, no. 4. [Electronic resource]. Access mode: <https://science-education.ru/ru/article/view?id=31053>. (In Russ.)]
5. Коржова К.В., Коваленко Л.П., Иванова Е.А., Никитин С.В., Дурнев А.Д. Влияние производных 5-оксипиримидина на рост опухоли и продолжительность жизни мышей линии C57BL/6 с эпидермоидной карциномой легких // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины, 2020. Т. 169, № 2. С. 226-229. [Korzhova K.V., Kovalenko L.P., Ivanova E.A., Nikitin S.V., Durnev A.D. Effects of 5-hydroxypyrimidine derivatives on tumor growth and lifespan of C57BL/6 mice with epidermoid lung carcinoma. *Byulleten eksperimentalnoy biologii i meditsiny = Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 2020. Vol. 169, no. 2, pp. 262-265. (In Russ.)]
6. Кузнецова О.С., Таллерова А.В., Никитин С.В., Коваленко Л.П. Эффекты 5-оксипиримидина СНК-411 на цитокиновый профиль в модели карциномы легкого Льюис у мышей // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины, 2015. Т. 160, № 10. С. 488-491. [Kuznetsova O.S., Tallerova A.V., Nikitin S.V., Kovalenko L.P. Effects of 5-pyrimidinol derivative snk-41 on cytokine profile of mice with lewis lung carcinoma.

Byulleten eksperimentalnoy biologii i meditsiny = *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 2016, Vol. 160, no. 4, pp. 483-485. (In Russ.)]

7. Кузубова Н.А., Титова О.Н. Т2-ассоциированные заболевания: в фокусе коморбидный пациент // Медицинский совет, 2020. № 17. С. 57-64. [Kuzubova N.A., Titova O.N. T2-associated diseases: focus on the comorbid patient. *Meditsinskiy sovet* = *Medical Council*, 2020, no. 17, pp. 57-64. (In Russ.)]

8. Мачарадзе Д.Ш. Современные клинические аспекты оценки уровней общего и специфических IgE // Педиатрия, 2017. Т. 96, № 2. С. 121-127. [Macharadze D.Sh. Modern clinical aspects of total and specific IgE evaluation. *Pediatriya* = *Russian Pediatrics*, 2017, Vol. 96, no. 2, pp. 121-127. (In Russ.)]

9. Никитин С.В., Коваленко Л.П., Ребеко А.Г., Журиков Р.В., Иванова Е.А., Дурнев А.Д. Синтез противоопухолевая и антиметастатическая активность производного 5-оксипиримидина // Химико-фармацевтический журнал, 2019. Т. 53, № 8. С. 20-23. [Nikitin S.V., Rebeko A.G., Zhurikov R.V., Ivanova E.A., Durnev A.D. Synthesis and anti-tumor and antimetastatic activity of 5-hydroxypyrimidine derivatives. *Khimiko-farmatsevticheskiy zhurnal* = *Pharmaceutical Chemistry Journal*, 2019, Vol. 53, no. 8, pp. 697-700. (In Russ.)]

10. Akhtar W., Verma G., Khan M.F., Shaquiquzzaman M., Rana A., Anwer T., Akhter M., Alam M.M. Synthesis of hybrids of dihydropyrimidine and pyridazinone as potential anti-breast cancer agents. *Mini Rev. Med. Chem.*, 2018, no. 18, pp. 369-379.

11. Gu Q.J., He G., Fan J., Li J., Li D., Zhao L., Huang L. Randomized controlled study of desloratadine citrate and loratadine in the treatment of allergic rhinitis. *Int. J. Clin. Exp. Med.*, 2016, Vol. 9, no. 2, pp. 4388-4395.

12. Jang H., Kim S.M., Rho M., Lee S.W., Song Y. Synthesis of thienopyrimidine derivatives as inhibitors of STAT3 Activation Induced by IL-6. *J. Microbiol. Biotechnol.*, 2019, Vol. 29, no. 6, pp. 856-862.

13. Li Q., Zhai C., Wang G., Zhou J., Li W., Xie L., Shi Z. Ginsenoside Rh1 attenuates ovalbumin-induced asthma by regulating Th1/Th2 cytokines balance. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 2021, Vol. 85, no. 8, pp. 1809-1817.

14. Löffler M., Fairbanks L.D., Zameitat E., Marinaki A.M., Simmonds A.H. Pyrimidine pathways in health and disease. *Trends Mol. Med.*, 2005, Vol. 11, no. 9, pp. 430-437.

15. Putoczki T.L., Matthias E. IL-11 signaling as a therapeutic target for cancer. *Immunotherapy*, 2015, Vol. 7, no. 4, pp. 441-453.

16. Waite J.C., Skokos D. Th17 response and inflammatory autoimmune diseases. *Int. J. Inflamm.*, 2012, Vol. 2012, pp. 232-242.

17. Wang H.W., Joise J.A. Alternative activation of tumor-associated macrophages by IL-4. *Cell Cycle*, 2010, Vol. 9, no. 24, pp. 4824-4835.

18. Wang L., Yi T., Kortylewski M., Pardoll D. M., Zeng D., Yu H. IL-17 can promote tumor growth through an IL-6–Stat3 signaling pathway. *J. Exp. Med.*, 2009, Vol. 206, no. 7, pp. 1457-1464.

Авторы:

Коваленко Л.П. — д.б.н., ведущий научный сотрудник отдела лекарственной токсикологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фармакологии имени В.В. Закусова», Москва, Россия

Журиков Р.В. — младший научный сотрудник отдела лекарственной токсикологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фармакологии имени В.В. Закусова», Москва, Россия

Вальдман Е.А. — д.м.н., профессор, ведущий научный сотрудник лаборатории психофармакологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фармакологии имени В.В. Закусова», Москва, Россия

Никитин С.В. — к.х.н., старший научный сотрудник отдела химии лекарственных средств ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фармакологии имени В.В. Закусова», Москва, Россия

Authors:

Kovalenko L.P., PhD, MD (Biology), Leading Research Associate, Drug Toxicology Department, V. Zakusov Research Institute of Pharmacology, Moscow, Russian Federation

Zhurikov R.V., Junior Research Associate, Drug Toxicology Department, V. Zakusov Research Institute of Pharmacology, Moscow, Russian Federation

Valdman E.A., PhD, MD (Medicine), Leading Research Associate, Laboratory of Psychopharmacology, V. Zakusov Research Institute of Pharmacology, Moscow, Russian Federation

Nikitin S.V., PhD (Chemistry), Senior Research Associate, Medicinal Chemistry Department, V. Zakusov Research Institute of Pharmacology, Moscow, Russian Federation

Поступила 16.05.2023

Отправлена на доработку 26.06.2023

Принята к печати 04.10.2023

Received 16.05.2023

Revision received 26.06.2023

Accepted 04.10.2023

КЛИНИЧЕСКАЯ ЦЕННОСТЬ УРОВНЯ СЫВОРОТОЧНОГО ИНТЕРЛЕЙКИНА-13 ПРИ ВИНКРИСТИНОВОЙ ПОЛИНЕВРОПАТИИ У ДЕТЕЙ ПРИ ОСТРОМ ЛИМФОБЛАСТНОМ ЛЕЙКОЗЕ

Корякина О.В.^{1,2}, Ковтун О.П.¹, Базарный В.В.¹, Копенкин М.А.¹

¹ ФГБОУ «Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Екатеринбург, Россия

² ГАУЗ СО «Областная детская клиническая больница», г. Екатеринбург, Россия

Резюме. Основным нейротоксическим осложнением при лечении острого лимфобластного лейкоза у детей является винкристиновая полиневропатия. Недавние исследования продемонстрировали участие иммунной системы в патогенетических механизмах поражения периферической нервной системы. В последние годы появляются сообщения по изучению взаимосвязи между интерлейкином-13 (IL-13) и развитием токсических эффектов химиотерапевтических препаратов.

Цель работы — оценить клиническую ценность уровня IL-13 у детей при винкристиновой полиневропатии.

В исследовании участвовало 27 детей с острым лимфобластным лейкозом в возрасте от 3 до 17 лет, которые получали химиотерапию по протоколу. Проводили определение уровня IL-13 в плазме крови с последующим сравнительным анализом показателей в двух подгруппах в зависимости от развития винкристиновой полиневропатии. Оценка содержания IL-13 проводилась методом мультипараметрического иммунофлуоресцентного анализа с магнитными микросферами (технология xMAP, Luminex 200, США) и использованием тест-системы ProcartaPlex Human Cytokine/Chemokine (Invitrogen, США).

В исследуемой группе пациентов винкристиновая полиневропатия регистрировалась у большинства детей (n = 15) с дебютом преимущественно на индукционном этапе химиотерапии и доминированием сенсорных нарушений. При сравнительном анализе уровня IL-13 в плазме крови у пациентов с винкристиновой полиневропатией отмечалось статистически значимое повышение его концентрации в отличие от детей, не имеющих признаков поражения периферической нервной системы (p = 0,042). При оценке клинической ценности данного показателя диагностическая чувствительность составила 75%, специфичность — 100%, интегральный показатель, характеризующий точность теста — 0,89. Установлено, что изменение IL-13 имеет достаточно высокий уровень относительного риска, что указывает на его существенную взаимосвязь с развитием винкристиновой полиневропатии.

Адрес для переписки:

Корякина Оксана Валерьевна
ФГБОУ «Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ
620028, Россия, г. Екатеринбург, ул. Репина, 3.
Тел.: 8 (343) 214-86-52.
E-mail: koryakina09@mail.ru

Address for correspondence:

Oksana V. Koryakina
Ural State Medical University
3 Repin St
Yekaterinburg
620028 Russian Federation
Phone: +7 (343) 214-86-52.
E-mail: koryakina09@mail.ru

Образец цитирования:

О.В. Корякина, О.П. Ковтун, В.В. Базарный, М.А. Копенкин «Клиническая ценность уровня сывoroточного интерлейкина-13 при винкристиновой полиневропатии у детей при остром лимфобластном лейкозе» // Медицинская иммунология, 2024. Т. 26, № 6. С. 1205-1212. doi: 10.15789/1563-0625-CVO-2865

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

For citation:

O.V. Koryakina, O.P. Kovtun, V.V. Bazarnyi, M.A. Kopenkin
“Clinical value of serum interleukin-13 levels in vincristine-induced polyneuropathy in children with acute lymphoblastic leukemia”, *Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2024, Vol. 26, no. 6, pp. 1205-1212.
doi: 10.15789/1563-0625-CVO-2865

© Koryakina O.V. et al., 2024
The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License
DOI: 10.15789/1563-0625-CVO-2865

Полученные результаты проведенного исследования о содержании IL-13 в плазме крови у детей с винкристиновой полиневропатией позволили выделить его в качестве предикторного биологического маркера поражения периферической нервной системы.

Ключевые слова: нейротоксичность, острый лейкоз, дети, полиневропатия, химиотерапия, интерлейкины

CLINICAL VALUE OF SERUM INTERLEUKIN-13 LEVELS IN VINCRISTINE-INDUCED POLYNEUROPATHY IN CHILDREN WITH ACUTE LYMPHOBLASTIC LEUKEMIA

Koryakina O.V.^{a,b}, Kovtun O.P.^a, Bazarnyi V.V.^a, Kopenkin M.A.^a

^a Ural State Medical University, Yekaterinburg, Russian Federation

^b Regional Children Clinical Hospital, Yekaterinburg, Russian Federation

Abstract. Vincristine polyneuropathy is the leading neurotoxic effect when treating pediatric acute lymphoblastic leukemia (ALL). Recent studies have demonstrated involvement of immune system in pathogenesis of peripheral nervous system damage. Over recent years, there have been reports examining the relationship between interleukin-13 (IL-13) and development of toxic effects of chemotherapeutic drugs. Our objective was to assess clinical value of IL-13 level in children with vincristine polyneuropathy.

The study included 27 children with ALL aged from 3 to 17 years, who received chemotherapy according to the conventional protocol. Plasma IL-13 levels were determined, and the values in two subgroups have been compared taking into account development of vincristine polyneuropathy. IL-13 content was assessed by multiparametric immunofluorescent analysis with magnetic microspheres (xMAP technology, Luminex 200, USA) and using ProcartaPlex Human Cytokine/Chemokine test system (Invitrogen, USA).

Vincristine polyneuropathy in the study group was registered in the majority of children ($n = 15$) manifesting mainly at the induction stage of chemotherapy and presenting as predominance of sensory disorders. In a comparative analysis of IL-13 plasma levels in patients with vincristine polyneuropathy, we observed a statistically significant increase of its concentration, in contrast to patients without signs of peripheral nervous system damage ($p = 0.042$). The diagnostic sensitivity of this index was 75%, specificity – 100%, the integral index characterizing the accuracy of the test was 0.89. IL-13 changes were found to correlate with higher relative risk level, indicating its significant relationship to the development of vincristine polyneuropathy.

The results of the study on the IL-13 content in blood plasma in children with vincristine polyneuropathy allowed us to consider it a predictive biological marker of peripheral nervous system damage.

Keywords: neurotoxicity, acute leukemia, children, polyneuropathy, chemotherapy, interleukins

Введение

Интерлейкин-13 (IL-13) является полифункциональным цитокином, который продуцируется преимущественно Th2-лимфоцитами, а также другими типами клеток, в том числе микроглией. Он играет важную роль в регуляции различных клеточных реакций и является ключевым участником воспалительного процесса, вызванного аллергеном [9, 16]. Наряду с этим в последние годы появляются сообщения о связи IL-13 с нервной системой. В частности, Hong A.R. и соавт. (2022) показано повреждение нейронов и микроглии микроинъекциями липополисахарида (ЛПС) в полосатое тело мозга крысы. Одновременно с этим введение животным антител, нейтрализующих IL-13, оказывало нейропротекторный эффект,

т. е. защищало нейроны от токсичности, индуцированной ЛПС. Таким образом, авторы предположили, что ЛПС индуцирует экспрессию IL-13 в микроглии и способствует нейродегенерации через повреждение астроцитов и нарушение гематоэнцефалического барьера в полосатом теле, *in vivo* [8]. В то же время ряд исследователей продемонстрировали положительные эффекты IL-13 как противовоспалительного интерлейкина. Например, в одной из работ показано его участие в ингибировании развития экспериментального аутоиммунного энцефаломиелита [3]. На модели черепно-мозговой травмы отмечено, что интраназальное введение IL-13 самцам мышей C57BL/6J ускоряло функциональное восстановление. При этом он снижал гибель нейронов, уровень провоспалительных факторов и усиливал

фагоцитоз микроглии/макрофагов в областях, прилегающих к поражению [13]. Amo-Aragiçio J. и соавт. (2021) в своем исследовании показали участие IL-13 в восстановлении нервной ткани при травме спинного мозга за счет стимуляции переключения метаболизма микроглии и макрофагов с гликолитического на окислительное фосфорилирование [2]. Таким образом, полученные новые данные об участии IL-13 в реакциях повреждения и восстановления нервной ткани послужили основанием для изучения плазменного уровня данного цитокина при нейротоксических осложнениях химиотерапии.

Одним из базовых препаратов, который входит в протоколы лечения онкогематологических заболеваний у детей, является винкристин. Известно, что к ведущим побочным эффектам цитостатика относится периферическая полиневропатия, частота встречаемости которой варьирует в диапазоне от 10% до 100% [6, 20]. Винкристиновая полиневропатия (ВП) проявляется поражением сенсорных и моторных нервных волокон периферических нервов. В тяжелых случаях ВП приводит к снижению дозы препарата или полному прекращению жизненно важного противоопухолевого лечения, что безусловно влияет на эффективность терапии и прогноз онкологического заболевания, наносит серьезный ущерб пациенту, увеличивает расходы на здравоохранение [11, 12]. Патогенез развития ВП до конца не изучен, в последние годы его связывают с иммунными механизмами. Отдельные исследовательские группы обратили внимание на то, что винкристин стимулирует продукцию провоспалительных интерлейкинов, фактор некроза опухоли, повышает экспрессию рецепторов хемокинов или активирует синтез различных хемокинов [14, 19, 21]. Следовательно, изучение цитокинов может дать важную информацию о молекулярных механизмах поражения периферической нервной системы и, возможно, позволит использовать их в качестве биомаркеров для диагностики и прогнозирования возникновения ВП.

Цель нашей работы заключалась в оценке клинической ценности уровня IL-13 у детей при винкристиновой полиневропатии.

Материалы и методы

В одноцентровом проспективном наблюдательном когортном исследовании участвовало 27 пациентов с диагнозом ОЛЛ в возрасте от 3 до 17 лет, которым проводилась химиотерапия по протоколу ALL-MB-2015 на базе Областной детской клинической больницы (г. Екатеринбург). В зависимости от развития ВП, пациенты были разделены на две подгруппы: основная (n = 15) — боль-

ные с ОЛЛ, имеющие клинические проявления периферической полиневропатии и подгруппа сравнения (n = 12) — дети с ОЛЛ без симптомов поражения периферической нервной системы. Размер выборки предварительно не рассчитывали. Всем пациентам было выполнено стандартное клинико-инструментальное и лабораторное обследование в соответствии с протоколом, диагноз периферической полиневропатии установлен на основании общепринятых методов. Критерии исключения: больные с критическим состоянием по основному заболеванию, пациенты с органическим поражением центральной нервной системы. По полу и возрасту пациенты в обеих подгруппах были сопоставимы, что оценивалось с помощью критерия χ^2 Пирсона. Оценка неврологического статуса проводилась по стандартной методике при поступлении пациентов в стационар (до назначения химиотерапии) и при появлении жалоб неврологического характера или на 36-й день химиотерапии у детей без клинических проявлений ВП. Степень тяжести нейротоксичности оценивалась по шкале National Cancer Institute Common Terminology Criteria for Adverse Events (NCI-CTCAE) версия 5.0 от 2017 г. [4]. Объективная верификация ВП проводилась с помощью электромиографического (ЭНМГ) исследования. Методом мультипараметрического иммунофлуоресцентного анализа с магнитными микросферами (технология xMAP, Luminex 200, США) с использованием тест-системы ProcartaPlex Human IL-13 (Invitrogen, США) в плазме крови определяли содержание IL-13 в начале проведения химиотерапии и при завершении индукционного этапа лечения (36-й день химиотерапии). Исследование было одобрено Локальным этическим комитетом лечебного учреждения (протокол № 8 от 23.11.21 г.). От законных представителей пациентов получено информированное согласие на участие в исследовании. Статистическая обработка результатов полученных данных проводилась на основе принципов вариационной статистики. Совокупности количественных лабораторных показателей описывались при помощи значений медианы (Me), нижнего и верхнего квартилей ($Q_{0,25}$ – $Q_{0,75}$). Статистическая значимость в независимых выборках оценивалась с помощью непараметрического критерия Манна–Уитни, для выявления различий в связанных выборках применялся критерий Вилкоксона. Статистически значимыми считались различия при $p < 0,05$. С целью определения диагностических характеристик изучаемых показателей рассчитывали диагностическую чувствительность (ДЧ) и диагностическую специфичность (ДС). Для оценки диагностической эффективности использовали ROC-анализ.

Анализ статистических данных проводился при помощи программных средств Microsoft Excel (Office 2019), MedCalc (версия 20.113).

Результаты

В исследуемую группу вошли 27 детей в возрасте от 3 до 17 лет, медиана составила 7,5 лет (4-11 лет). У всех пациентов ОЛЛ установлен впервые на основании общепринятых диагностических критериев. Преобладали больные с В-клеточным вариантом заболевания – (n = 22). По половому признаку пациенты распределились следующим образом, мальчиков было (n = 13), девочек – (n = 11). Все дети получали химиотерапию по протоколу. За период наблюдения на фоне специфического лечения у 15 детей выявлены признаки ВП – подгруппа основная. В категории больных, не имеющих нарушений со стороны нервной системы, находилось 12 человек – подгруппа сравнения.

У пациентов с ВП в большинстве случаев (n = 12) неврологические симптомы манифестировали на индукционном этапе лечения, медиана составила 17 дней (11,0-21,0 дней) и у трех человек в период реиндукции консолидации 1. В клинической картине преобладали сенсорные симптомы, которые наблюдались у 11 больных и характеризовались болью в нижней челюсти – (n = 8), нижних конечностях – (n = 7), парестезиями и чувством «онемения» в нижних конечностях по одному человеку соответственно. При этом болевой синдром контролировался ненаркотическими анальгетиками у 5 детей, наркотическими анальгетиками у 2 пациентов. Медиана продолжительности сенсорных расстройств составила 14 дней (6,5-17,0 дней). Неврологические

проявления со стороны двигательной сферы отмечались у 8- детей, основным признаком у каждого ребенка была мышечная слабость, которая в большинстве случаев (n = 6) привела к нарушению походки. При этом у двух человек расстройство функции нижних конечностей значительно повлияло на повседневную двигательную активность. Медиана продолжительности моторных симптомов составила 30 дней (26,2-33,2 дней). Вегетативные нарушения наблюдались у одного пациента в виде кишечной дисфункции с запорами и метеоризмом в течение 14 дней. В целом по шкале токсичности (NCI-CTCAE) больные распределились следующим образом: 1-я степень – (n = 3), 2-я степень – (n = 8), 3-я степень – (n = 4).

По данным ЭНМГ-исследования у всех пациентов с клинической картиной ВП определялись признаки поражения периферических нервов. У 12 детей отмечались двусторонние изменения, у 3 больных асимметричные. При этом моторная аксональная полиневропатия выявлялась в 9 случаях, у 4 пациентов регистрировалась моторно-сенсорная аксональная полиневропатия и у 2 больных сенсорная полиневропатия. Следует отметить, что по типам и характеру изменений доминировало аксональное поражение моторных волокон малоберцовых нервов у 13 детей.

С помощью иммунохимического исследования определяли в плазме крови уровень IL-13 в начале индукционного этапа химиотерапии и при его завершении. Результаты сравнительного анализа концентрации данного цитокина у детей в исследуемых подгруппах представлены в таблице 1.

Нами установлено, что у пациентов в основной подгруппе содержание IL-13 статистически

ТАБЛИЦА 1. СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ УРОВНЯ IL-13 В ПЛАЗМЕ КРОВИ (пкг/мл) У ДЕТЕЙ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ФОРМИРОВАНИЯ ВП В НАЧАЛЕ И ПРИ ЗАВЕРШЕНИИ ИНДУКЦИОННОГО ЭТАПА ХИМИОТЕРАПИИ

TABLE 1. COMPARATIVE ANALYSIS OF IL-13 PLASMA LEVELS (pkg/mL) IN CHILDREN DEPENDING ON THE FORMATION OF VP, AT THE BEGINNING AND AT THE END OF THE INDUCTION PHASE OF CHEMOTHERAPY

Исследование № Study No.	Подгруппа основная Main subgroup n = 15	Подгруппа сравнения Comparison subgroup n = 12	p
Исследование 1 Study 1	8,8 ¹ (6,4-12,9)	3,8 (2,6-5,4)	p ₁ = 0,042 p ₂ = 0,469 p ₃ = 0,285 p ₄ = 0,043
Исследование 2 Study 2	20,0 (10,1-26,3)	15,6 ⁴ (11,4-18,7)	

Примечание. p₁ – при сравнении показателей в подгруппах основной и сравнения исследование 1; p₂ – при сравнении показателей в подгруппах основной и сравнения исследование 2; p₃ – при сравнении показателей в подгруппе основной исследование 1 и исследование 2; p₄ – при сравнении показателей в подгруппе сравнения исследование 1 и исследование 2.

Note. p₁, when comparing measures in the main and comparison study 1 subgroups; p₂, when comparing measures in the main and comparison study 2 subgroups; p₃, when comparing measures in the main study 1 and comparison study 2 subgroups; p₄, when comparing measures in the comparison study 1 and comparison study 2 subgroups.

значимо отличалось относительно его уровня у детей в подгруппе сравнения и было в 2,3 раза выше ($p = 0,042$). При завершении индукционного этапа химиотерапии наблюдалось повышение показателя в обеих подгруппах, но существенно — только в подгруппе сравнения: в 4,1 раза ($p = 0,043$). В то же время в основной подгруппе отмечалась тенденция к возрастанию содержания IL-13, но без значимых отличий при сопоставлении с подгруппой сравнения. Таким образом, выявленные нами данные дают основание рассматривать IL-13 в качестве возможного лабораторного биологического маркера ВП.

Поскольку полученные результаты позволяют применить их в клинической практике, нами проведен ROC-анализ для оценки диагностической эффективности лабораторного теста по определению уровня IL-13. Математическим способом рассчитано «критическое» значение изучаемого интерлейкина, которое составило $> 7,06$ пкг/мл и отображало оптимальные диагностические характеристики теста (ДЧ — 75%, ДС — 100%), позволяющие определить вероятность развития ВП. Одновременно с этим величина интегрального показателя AUC (Area Under Curve) получилась 0,89, что характеризует достаточную точность теста [7]. При этом уровень статистической значимости модели был весомый ($p = 0,001$). На рисунке 1 изображена ROC-кривая для IL-13, которая демонстрирует диагностические способности логистической регрессионной модели при ВП.

В качестве наглядности представлены примеры результатов оценки концентрации IL-13 у детей в зависимости от развития винкристиновой полиневропатии при лечении острого лимфобластного лейкоза.

Пример 1. Мальчик, 4 года. На 15-й день химиотерапии дебют ВП, 3-я степень тяжести нейротоксичности по шкале NCI-CTCAE. В клинической картине сочетание сенсорных нарушений в виде боли в нижней челюсти и моторных симптомов с развитием пареза мышц перонеальной группы. При проведении ЭНМГ-исследования признаки моторной аксональной невропатии малоберцовых нервов с обеих сторон. При определении уровня IL-13 в плазме крови в начале химиотерапии концентрация показателя составила 9,2 пкг/мл.

Пример 2. Девочка, 5 лет. Манифестация ВП на 23-й день химиотерапии, 2-я степень тяжести нейротоксичности по шкале NCI-CTCAE. Клиника характеризовалась сочетанием сенсорных расстройств в виде боли в нижних конечностях и моторными нарушениями с парезом перонеальной группы мышц. По данным ЭНМГ-исследования признаки моторной аксональной невропатии малоберцовых нервов с обеих сто-

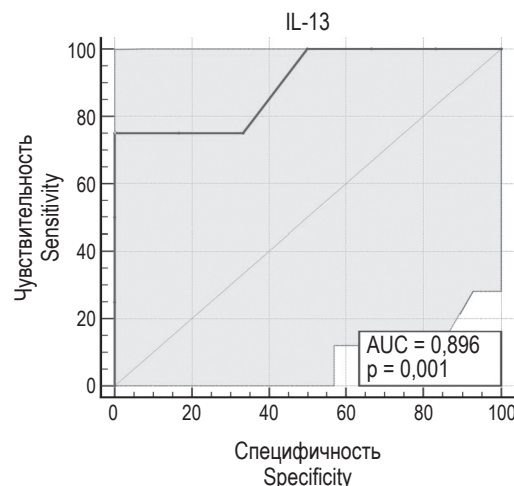


Рисунок 1. Графическое изображение ROC-кривой для IL-13 при винкристиновой полиневропатии

Figure 1. Graphical representation of the ROC-curve for IL-13 in vincristine polyneuropathy

рон. Сенсорная невропатия поверхностных ветвей малоберцовых нервов. Исходный уровень IL-13 составил 16,7 пкг/мл.

Пример 3. Мальчик, 4 года. При завершении индукционного этапа химиотерапии без клинических симптомов ВП, по результатам ЭНМГ-исследования проводимость моторных и сенсорных волокон нервов нижних конечностей в норме. Концентрация IL-13 в плазме крови — 5,4 пкг/мл.

Пример 4. Пациент 5. Мальчик, 11 лет. За период наблюдения без клинических проявлений ВП, при проведении ЭНМГ-исследования описаны признаки моторной аксональной невропатии малоберцовых нервов. При анализе содержания IL-13 в плазме крови концентрация составила 4,4 пкг/мл.

Обсуждение

ВП относится к частым и значимым нейротоксическим осложнениям химиотерапии при лечении ОЛЛ у детей, присоединение которой может усугублять тяжесть состояния больного, определять формирование инвалидности и ограничивать жизненно важное лечение. В настоящее время в качестве диагностических критериев используют клинические и электрофизиологические исследования. Однако применение этих методов имеет некоторые ограничения особенно в детской практике. С учетом относительной субъективности используемых шкал и их недостаточной чувствительности, до сих пор не приняты стандартные методы диагностики ВП. Кроме того, основные шкалы можно применять только у детей в возрасте старше 6 лет. Недостатками электрофизиологического метода исследования

нервной проводимости являются: болезненность и длительность выполнения процедуры, которая требует соблюдения определенных условий, а также возможность интерпретации результатов только специально обученными врачами. Поэтому в последнее время актуальным направлением является поиск доступных и информативных лабораторных биомаркеров нейротоксичности химиопрепаратов, которые можно будет использовать в качестве диагностических и прогностических критериев. В проведенных исследованиях отмечено, что в развитии токсических реакций, вызванных противоопухолевыми препаратами, участвуют цитокины, которые запускают каскад иммунных реакций [1, 18]. Установлено, что провоспалительные интерлейкины не только определяют повреждение аксонов, но и стимулируют спонтанную чувствительность, активность ноцицепторов, связывая иммунную и периферическую нервную системы в реализации молекулярных механизмов формирования невропатической боли [15, 19]. В одном из систематических обзоров были рассмотрены 14 исследований, в которых приняли участие в общей сложности 1312 пациентов и были проанализированы 20 различных видов цитокинов при химиотерапии. Показано, что уровень IL-6, фактора некроза опухолей, IL-1 α и трансформирующего фактора роста заметно менялись при поражении почек у пациентов, получавших химиотерапию на основе антрациклина. При лечении противоопухолевыми препаратами из группы таксанов, производных платины и алкилирующих средств было выявлено изменение IL-13. При этом авторы нашли взаимосвязь между уровнем IL-13 и токсическим поражением почек [5]. Концентрация IL-13 при химиоиндуцированной полиневропатии не изучалась, судя по данным PubMed. Однако в экспериментальном исследовании с использованием мышей линии Rag2^{-/-} было установлено, что CD8⁺T-клетки, продуцирующие IL-13, необходимы для развития полиневропатии, индуцированной цитостатиками. Авторы показали, что введение цисплатина приводило к увеличению продукции IL-13, а интратекальное введение анти-IL-13 замедляло разрешение химиоиндуцированной полиневропатии [17]. Таким образом, изучение IL-13 в плазме крови при ВП может углубить представление о патогенетических механизмах развития нейротоксического осложнения и привести к разработке новых информативных методов ранней диагностики, а также эффективных способов профилактики и лечения.

В проведенном нами исследовании отмечено, что у детей при ОЛЛ, получающих химиотерапию, ВП развивалась в большинстве случаев и преимущественно во время индукционного

этапа лечения, что, по всей видимости, связано с частым введением цитостатика в этот период. В клинической картине преобладали сенсорные нарушения, такие как боли в челюсти и нижних конечностях, парестезии и чувство «онемения». Следующим частым неврологическим симптомом были дистальные парезы нижних конечностей. По данным ЭНМГ-исследования, у больных в большинстве случаев отмечалось аксональное поражение с преимущественным вовлечением моторных волокон малоберцовых нервов. В целом полученные результаты по клинико-нейрофизиологической характеристике ВП согласуются с литературными данными [10, 12].

При оценке содержания в плазме крови IL-13 у детей, получающих химиотерапию при ОЛЛ нами установлено, что в подгруппе пациентов, развивших клинические признаки ВП, его уровень на начальном этапе лечения был существенно выше относительно детей, не имеющих симптомов поражения периферической нервной системы. Одновременно с этим определено «критическое» значения IL-13, которое обуславливает оптимальные диагностические характеристики, что дает основание использовать его в клинической практике в качестве лабораторного теста для диагностики ВП. В целом необходимо отметить, что изучение роли IL-13 в развитии нейротоксических эффектов цитостатиков находится в зачаточном состоянии, но наше исследование имеет определенную клиническую перспективу и позволяет расширить представления о патогенетических закономерностях формирования ВП и разработать новые диагностические подходы. Взаимосвязь между IL-13 и поражением нервной системы обусловлена тем, что этот цитокин частично продуцируется клетками микроглии и способен реализовать свои эффекты в виде цитотоксических/нейротоксических реакций. Мы понимаем ограниченность нашего исследования, связанного с небольшой когортой пациентов (всего 27 человек), но полученные нами результаты открывают новый взгляд на значение интерлейкинов в развитии ВП на ранних сроках химиотерапии и определяют проведение дальнейших исследований, направленных на изучение обозначенной проблемы.

Заключение

ВП является распространенным побочным эффектом, возникающим при лечении ОЛЛ у детей. В настоящее время нет доступных и информативных лабораторных биологических маркеров, направленных на раннюю диагностику этого нейротоксического осложнения. В проведенном нами исследовании установлено, существенное повышение в плазме крови IL-13 у пациентов с

ВП на начальном этапе химиотерапии, что позволяет рассматривать его как предикторный биологический маркер нейротоксичности. Кроме того, установленная высокая клиническая ценность данного показателя, о чем свидетельствует величина интегрального показателя AUC, которая составила 0,89, что обосновывает применение лабораторного теста для ранней диагностики ВП. Полученные результаты определяют целесообразность продолжения исследования цитокинов при ВП у детей с ОЛЛ.

Благодарности

Авторы выражают искреннюю признательность заместителю главного врача по онкологии и гематологии Областной детской клинической больницы к.м.н. Фечиной Л.Г. за неоценимую помощь в организации и проведении исследования, старшему научному сотруднику к.м.н. Полушиной Л.Г. и младшему научному сотруднику к.м.н. Максимовой А.Ю. за помощь в проведении лабораторных исследований.

Список литературы / References

1. Al-Mazidi S., Alotaibi M., Nedjadi T., Chaudhary A., Alzoughaibi M., Djouhri L. Blocking of cytokines signalling attenuates evoked and spontaneous neuropathic pain behaviours in the paclitaxel rat model of chemotherapy-induced neuropathy. *Eur. J. Pain*, 2018, Vol. 22, no. 4, pp. 810-821.
2. Amo-Aparicio J., Garcia-Garcia J., Francos-Quijorna I., Urpi A., Esteve-Codina A., Gut M., Quintana A., Lopez-Vales R. Interleukin-4 and interleukin-13 induce different metabolic profiles in microglia and macrophages that relate with divergent outcomes after spinal cord injury. *Theranostics*, 2021, Vol. 11, no. 20, pp. 9805-9820.
3. Cash E., Minty A., Ferrara P., Caput D., Fradelizi D., Rott O.. Macrophage-inactivating IL-13 suppresses experimental autoimmune encephalomyelitis in rats. *J. Immunol.*, 1994, Vol. 153, no. 9, pp. 4258-4267.
4. Common Terminology Criteria for Adverse Events (CTCAE): version 5.0: november 27, 2017 /U.S. Department of Health and Human Services. Available at: https://ctep.cancer.gov/protocolDevelopment/electronic_applications/ctc.htm.
5. Eyob T., Ng T., Chan R., Chan A. Impact of chemotherapy on cancer-related fatigue and cytokines in 1312 patients: a systematic review of quantitative studies. *Curr. Opin. Support. Palliat. Care*, 2016, Vol. 10, no. 2, pp. 165-179.
6. Gilchrist L.S., Marais L., Tanner L. Comparison of two chemotherapy-induced peripheral neuropathy measurement approaches in children. *Support. Care Cancer*, 2014, Vol. 22, no. 2, pp. 359-366.
7. Greiner M., Pfeiffer D., Smith R.D. Principles and practical application of the receiver-operating characteristic analysis for diagnostic tests. *Prev. Vet. Med.*, 2000, Vol. 45, no. 1-2, pp. 23-41.
8. Hong A.R., Jang J.G., Chung Y.C., Won S.Y., Jin B.K. Interleukin 13 on microglia is neurotoxic in lipopolysaccharide-injected striatum in vivo. *Exp. Neurobiol.*, 2022, Vol. 31, no. 1, pp. 42-53.
9. Junttila I.S. Tuning the cytokine responses: an update on interleukin (IL)-4 and IL-13 receptor complexes. *Front. Immunol.*, 2018, Vol. 9, 888. doi: 10.3389/fimmu.2018.00888.
10. Kavcic M., Koritnik B., Krzan M., Velikonja O., Prelog T., Stefanovic M., Debeljak M., Jazbec J. Electrophysiological studies to detect peripheral neuropathy in children treated with vincristine. *J. Pediatr. Hematol. Oncol.*, 2017, Vol. 39, no. 4, pp. 266-271.
11. Li G.Z., Hu Y.H., Li D.Y., Zhang Y., Guo H. L., Li Y. M., Chen F., Xu J. Vincristine-induced peripheral neuropathy: A mini-review. *Neurotoxicology*, 2020, Vol. 81, pp. 161-171.
12. Madsen M.L., Due H., Ejlskjær N., Jensen P., Madsen J., Dybkær K. Aspects of vincristine-induced neuropathy in hematologic malignancies: a systematic review. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 2019, Vol. 84, no. 3, pp. 471-485.
13. Mori S., Maher P., Conti B. Neuroimmunology of the interleukins 13 and 4. *Brain Sci.*, 2016, Vol. 6, no. 2, 18. doi: 10.3390/brainsci6020018.
14. Qin B., Li Y., Liu X., Gong D., Zheng W. Notch activation enhances microglial CX3CR1/P38 MAPK pathway in rats model of vincristine-induced peripheral neuropathy. *Neurosci. Lett.*, 2020, Vol. 715, 134624. doi: 10.1016/j.neulet.2019.134624.
15. Scholz J., Woolf C.J. The neuropathic pain triad: neurons, immune cells and glia. *Nat. Neurosci.*, 2007, Vol. 10, no. 11, pp. 1361-1368.
16. Shankar A., McAlees J.W., Lewkowich I.P. Modulation of IL-4/IL-13 cytokine signaling in the context of allergic disease. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2022, Vol. 150, no. 2, pp. 266-276.
17. Singh S.K., Krukowski K., Laumet G.O., Weis D., Alexander J.F., Heijnen C.J., Kavelaars A. CD8⁺ T cell-derived IL-13 increases macrophage IL-10 to resolve neuropathic pain. *JCI Insight*, 2022, Vol. 7, no. 5, 154194. doi: 10.1172/jci.insight.154194.
18. Starobova H., Monteleone M., Adolphe C., Batoon L., Sandrock C.J., Tay B., Deuis J.R., Smith A.V., Mueller A., Nadar E.I., Lawrence G.P., Mayor A., Tolson E., Levesque J.P., Pettit A.R., Wainwright B.J., Schroder K., Vetter I. Vincristine-induced peripheral neuropathy is driven by canonical NLRP3 activation and IL-1 β release. *J. Exp. Med.*, 2021, Vol. 218, no. 5, e20201452. doi: 10.1084/jem.20201452.

19. Wang X.M., Lecky T.J., Brell J.M., Dorsey S.G. Discovering cytokines as targets for chemotherapy-induced painful peripheral neuropathy. *Cytokine*, 2012, Vol. 59, no. 1, pp. 3-9.
20. Weiser M.A., Cabanillas M.E., Konopleva M., Thomas D.A., Pierce S.A., Escalante C.P., Kantarjian H.M., O'Brien S.M. Relation between the duration of remission and hyperglycemia during induction chemotherapy for acute lymphocytic leukemia with a hyperfractionated cyclophosphamide, vincristine, doxorubicin, and dexamethasone/methotrexate-cytarabine regimen. *Cancer*, 2004, Vol. 100, no. 6, pp. 1179-1185.
21. Zhou L., Ao L., Yan Y., Li W., Ye A., Hu Y., Fang W., Li Y. The therapeutic potential of chemokines in the treatment of chemotherapy-induced peripheral neuropathy. *Curr. Drug. Targets*, 2020, Vol. 21, no. 3, pp. 288-301.

Авторы:

Корякина О.В. — к.м.н., доцент кафедры нервных болезней, нейрохирургии и медицинской генетики ФГБОУ «Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ; врач-невролог ГАОУ СО «Областная детская клиническая больница», г. Екатеринбург, Россия

Ковтун О.П. — д.м.н., профессор, академик РАН, ректор ФГБОУ «Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Екатеринбург, Россия

Базарный В.В. — д.м.н., профессор, главный научный сотрудник Центральной научно-исследовательской лаборатории ФГБОУ «Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Екатеринбург, Россия

Копенкин М.А. — младший научный сотрудник Центральной научно-исследовательской лаборатории ФГБОУ «Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Екатеринбург, Россия

Authors:

Koryakina O.V., PhD (Medicine), Associate Professor, Department of Nervous Diseases, Neurosurgery and Medical Genetic, Ural State Medical University; Neurologist, Regional Children Clinical Hospital, Yekaterinburg, Russian Federation

Kovtun O.P., PhD, MD (Medicine), Professor, Full Member, Russian Academy of Sciences, Rector, Ural State Medical University, Yekaterinburg, Russian Federation

Bazarnyi V.V., PhD, MD (Medicine), Professor, Chief Research Associate, Central Research Laboratory, Ural State Medical University, Yekaterinburg, Russian Federation

Kopenkin M.A., Junior Research Associate, Central Research Laboratory, Ural State Medical University, Yekaterinburg, Russian Federation

Поступила 14.05.2023
Отправлена на доработку 14.05.2023
Принята к печати 04.10.2023

Received 14.05.2023
Revision received 14.05.2023
Accepted 04.10.2023

ВЛИЯНИЕ БЕЛКА RUBICON НА ПРОТЕКАНИЕ LC3-АССОЦИИРОВАННОГО ФАГОЦИТОЗА В МОНОЦИТАХ БОЛЬНЫХ ТЯЖЕЛОЙ АТОПИЧЕСКОЙ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМОЙ

Ибрагимов Б.Р.¹, Скибо Ю.В.¹, Решетникова И.Д.^{1,2}, Абрамов С.Н.¹,
Даминова А.Г.¹, Евтюгин В.Г.¹, Абрамова З.И.¹

¹ ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет», г. Казань, Республика Татарстан, Россия

² ФБУН «Казанский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии» Роспотребнадзора, г. Казань, Республика Татарстан, Россия

Резюме. Атопическая бронхиальная астма является наиболее частым и тяжелым аллергическим заболеванием среди широкого спектра подобных болезней. Основной патогенез этого заболевания характеризуется нарушением гомеостаза Т-лимфоцитов, что значительно ухудшает общее состояние здоровья.

При атопической бронхиальной астме происходит нарушение процесса апоптоза Т-клеток. Это влечет за собой нарушение регуляции и поддержания гомеостаза периферических лимфоцитов. В нормальном состоянии организма Т-клетки должны подвергаться апоптозу, а его продукты должны утилизироваться соседними клетками или профессиональными фагоцитами: моноцитами, макрофагами или дендритными клетками. Этот процесс нарушается при атопической бронхиальной астме.

Нарушение иммунной системы, такие как аутоиммунитет, часто возникают из-за неправильной регуляции апоптоза лимфоцитов. Это особенно актуально в случаях, когда происходит недостаточный клиренс апоптотических телец или даже его полное отсутствие.

В последние годы в научном и медицинском сообществах большое внимание обращено к такой форме фагоцитоза, как эффероцитоз. Это процесс, при котором апоптотические клетки удаляются фагоцитарными клетками путем LC3-ассоциированного фагоцитоза (LAP).

Данный процесс инициирует поглощение за счет взаимодействий рецепторов плазматической мембраны фагоцита с апоптотической клеткой. Далее в клетке при участии определенных белков аутофагии (Beclin-1, VPS34, UVRAG, ATG5, ATG12, ATG7, ATG4, LC3) формируется одномембранная фагосома. Фагосома обогащается молекулами LC3 белка и сливается с лизосомой, в которой затем происходит лизис захваченного «груза».

Адрес для переписки:

Ибрагимов Булат Рафисович
Институт фундаментальной медицины и биологии
ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет»
420008, Россия, Республика Татарстан, г. Казань,
ул. Кремлевская, 18.
Тел.: 8 (999) 132-70-75.
E-mail: ibragimov94@inbox.ru

Address for correspondence:

Bulat R. Ibragimov
Institute of Fundamental Medicine and Biology,
Kazan (Volga Region) Federal University
18 Kremlevskaya St
Kazan, Republic of Tatarstan
420008 Russian Federation
Phone: +7 (999) 132-70-75.
E-mail: ibragimov94@inbox.ru

Образец цитирования:

Б.Р. Ибрагимов, Ю.В. Скибо, И.Д. Решетникова,
С.Н. Абрамов, А.Г. Даминова, В.Г. Евтюгин,
З.И. Абрамова «Влияние белка Rubicon на протекание
LC3-ассоциированного фагоцитоза в моноцитах
больных тяжелой атопической бронхиальной астмой»
// Медицинская иммунология, 2024. Т. 26, № 6.
С. 1213-1222. doi: 10.15789/1563-0625-EOT-2868

© Ибрагимов Б.Р. и соавт., 2024
Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

B.R. Ibragimov, Yu.V. Skibo, I.D. Reshetnikova,
S.N. Abramov, A.G. Daminova, V.G. Evtyugin, Z.I. Abramova
“Effect of the Rubicon protein on LC3-associated phagocytosis
by monocytes in the patients with severe atopic bronchial
asthma”, Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya
Immunologiya, 2024, Vol. 26, no. 6, pp. 1213-1222.
doi: 10.15789/1563-0625-EOT-2868

© Ibragimov B.R. et al., 2024
The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License
DOI: 10.15789/1563-0625-EOT-2868

В рамках нашей работы был проведен подробный анализ содержания некоторых ключевых белков LAP-пути в моноцитах периферической крови больных бронхиальной астмой тяжелого течения. Было обнаружено, что экспрессия белка Rubicon повышена, что позволяет заключить, что в моноцитах здоровых доноров активируется LAP-путь, по которому происходит фагоцитоз погибающих Т-клеток.

В то же время в моноцитах больных тяжелой формой atopической астмы активируются компоненты, характерные как для аутофагии, так и для LC3-ассоциированного фагоцитоза. Однако стоит отметить, что достоверно установлено снижение экспрессии белка Rubicon, предполагаемого маркера LC3-ассоциированного фагоцитоза.

Ключевые слова: Rubicon, LC3-ассоциированный фагоцитоз, аутофагия, моноциты, atopическая бронхиальная астма, LC3

EFFECT OF THE RUBICON PROTEIN ON LC3-ASSOCIATED PHAGOCYTOSIS BY MONOCYTES IN THE PATIENTS WITH SEVERE ATOPIC BRONCHIAL ASTHMA

Ibragimov B.R.^a, Skibo Yu.V.^a, Reshetnikova I.D.^{a, b}, Abramov S.N.^a,
Daminova A.G.^a, Evtyugin V.G.^a, Abramova Z.I.^a

^a Kazan (Volga Region) Federal University, Kazan, Republic of Tatarstan, Russian Federation

^b Kazan Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Kazan, Republic of Tatarstan, Russian Federation

Abstract. Atopic bronchial asthma is the most common and severe allergic disease among a wide range of similar diseases. The main pathogenesis of this disease is characterized by a disturbance of T lymphocyte homeostasis, which significantly worsens the general state of health. In atopic bronchial asthma, there is impaired process of T cell apoptosis. This entails dysregulation and maintenance of peripheral lymphocyte homeostasis. Normally, T cells must undergo apoptosis, and its products should be utilized by neighboring cells, or professional phagocytes: monocytes, macrophages, or dendritic cells. This process is altered in atopic bronchial asthma. The immune system disorders, such as autoimmunity, often result from dysregulation of lymphocyte apoptosis. This is especially true in cases of insufficient or missed clearance of apoptotic bodies.

Recently, the research and medical communities pay much attention to efferocytosis, a form of phagocytosis which proceeds by removal of apoptotic cells by phagocytes by means of LC3-associated phagocytosis (LAP). This process initiates uptake of the particles due to interactions between the phagocyte plasma membrane receptors and apoptotic cell. Further on, a single-membrane phagosome is formed in the cell with the participation of certain autophagy proteins (Beclin-1, VPS34, UVRAG, ATG5, ATG12, ATG7, ATG4, ATG4, LC3). The phagosome is enriched with LC3 protein molecules and fused with lysosomes, in which the captured "cargo" is then lysed. As a part of our work, a detailed analysis of some key protein contents at the LAP pathway was carried out for peripheral blood monocytes of patients with severe bronchial asthma. It was found that the expression of Rubicon protein is increased, thus allowing to conclude that the LAP pathway is activated in monocytes of healthy donors, thus allowing phagocytosis of dying T cells. At the same time, the components characteristic of both autophagy and LC3-associated phagocytosis are activated in the monocytes of patients with severe atopical asthma. However, one should note that decreased expression of the Rubicon protein, a putative marker of LC3-associated phagocytosis, has been clearly confirmed.

Keywords: Rubicon protein, phagocytosis, LC3-associated, autophagy, monocytes, atopical bronchial asthma, LC3

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 (Приоритет – 2030).

Введение

Бронхиальная астма по этиологии возникновения подразделяется на неаллергическую БА (аспириновая БА) и аллергическую (атопическая – IgE-обусловленная БА, неатопическая – HelgE-обусловленная БА).

Предполагается, что в патогенезе atopической бронхиальной астмы существенную роль играет нарушение клиренса погибших Т-клеток. С ослаблением апоптоза Т-лимфоцитов и запуском аутофагии в этих клетках связывают развитие ряда аутоиммунных процессов [3, 5, 21]. Заключительным этапом апоптоза является поглощение апоптотических телец фагоцитирующими клетками. Данный процесс принято называть эффероцитозом, осуществляющимся путем LC3-ассоциированного фагоцитоза (рис. 1) [2, 9, 11, 14, 26]. Накопление апоптотических телец в организме приводит к увеличению аутоантигенов, а затем и к аутоиммунному ответу [4, 6].

LAP функционирует при поглощении умирающих клеток, а нарушение его активности способствует волчаноподобному состоянию [12, 27].

LAP был описан еще в 2007 году [35]. Это форма фагоцитоза, при котором рецепторами плазматической мембраны фагоцита происходит распознавание, захват и поглощение апоптотических телец, бактериальных и некротических клеток. Затем в фагоците при участии определенных белков аутофагии (Beclin-1, VPS34, UVRAG, ATG5, ATG12, ATG7, ATG4, LC3) формируется одномембранная фагосома. Фагосома обогащается молекулами LC3 белка и сливается с лизосомой, в которой впоследствии происходит лизис захваченного «груза» [26].

Несмотря на совместное использование некоторых молекулярных механизмов, существуют различия, которые дифференцируют LAP от канонической аутофагии.

На биохимическом уровне отличие аутофагии от LAP заключается в первую очередь преиницирующими белками. При аутофагии это белки ULK 1 и ATG14, а при LAP – Rubicon и NOX2. В зависимости от преинициаторных белков на последней стадии синтезируется аутофаголизосома (двухмембранная органелла) или лапосома (одномембранная органелла). Тем не менее процессы канонической аутофагии и неканонической аутофагии протекают по схожему механизму, при участии белков: Beclin-1, VPS34, UVRAG, ATG5, ATG12, ATG16L, ATG7, ATG3, ATG4 и семейство LC3-белков.

LC3-ассоциированный фагоцитоз включает конъюгацию белка LC3 с одиночными органеллами (лапосомами). В то время как в канонической аутофагии происходит конъюгация LC3 белка с двойными мембранными структурами. Начальным этапом аутофагии является окружение белков или органелл, требующих утилизации, единой изолирующей мембраной. Слияние краев мембранного мешка друг с другом образует замкнутую двухмембранную структуру, так называемую аутофагосому, или незрелую аутофагическую вакуоль. Наконец, аутофагосома сливается с лизосомой, становясь аутолизосомой или деградирующей аутофагической вакуолью. LC3-ассоциированный фагоцитоз протекает по схожему механизму: захват «груза», слияние с лизосомой. Тем не менее при LAP органелла с поглотившим грузом имеет одномембранную структуру [16, 17]. Это структурное различие четко определяет протекание процесса либо кано-

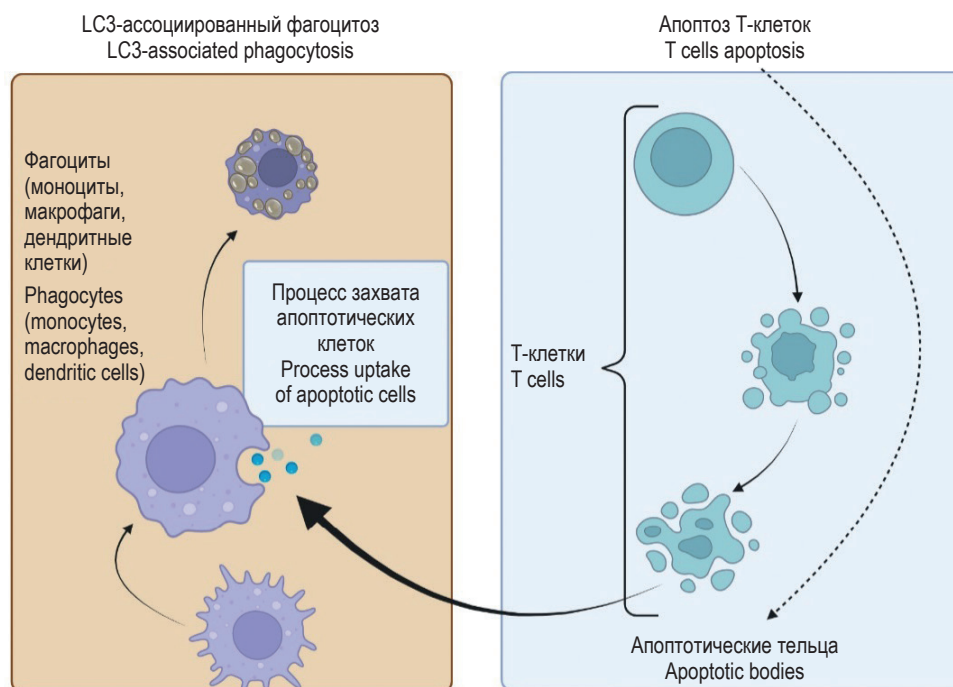


Рисунок 1. Клеточный гомеостаз иммунных клеток [27]

Figure 1. Cellular homeostasis of immune cells [27]

нической аутофагии, либо неканонической формы аутофагии (LAP).

В последнее десятилетие фагоцитоз мертвых или умирающих клеток подробно изучался на уровне осуществляющих этот процесс белков [20, 24, 33]. Белок Rubicon первоначально был идентифицирован как компонент комплекса PI3K III класса и негативного регулятора канонической аутофагии (ингибитор белка Beclin-1) [30, 40], а позже было показано, что Rubicon участвует в созревании эндосом [36, 37]. Также известно, что Rubicon привлекает НАДФН-оксидазы для участия в защите от бактерий [23, 38]. Далее выяснилось, что Rubicon участвует в специфическом типе клеточного поглощения внеклеточного содержимого, называемом LC3-ассоциированным фагоцитозом (LAP) [11, 15, 18, 25]. Этот процесс считается критически важным для удаления некротического и апоптотического мусора и может иметь решающее значение для регенерации тканей после острого повреждения, избегая при этом аутоиммунитета [31].

Целью данного исследования был анализ экспрессии ключевых белков LC3-ассоциированного фагоцитоза в моноцитах больных бронхиальной астмой тяжелого течения.

Материалы и методы

В качестве объекта исследования были использованы моноциты периферической крови здоровых доноров и больных atopической бронхиальной астмой. В группу тяжелой бронхиальной астмы вошли 15 больных.

Контрольную группу составили 15 здоровых человек в возрасте от 20 до 34 лет (средний возраст 27 ± 7 лет), не имевших отягощенного аллергологического анамнеза.

Моноциты выделяли центрифугированием в градиенте плотности фиколл ($\rho = 1,077$) (НПП «ПанЭко», Россия), с последующим центрифугированием в 46% осмотическом градиенте плотности Перколл (Percoll plus 11, GE Healthcare). Подсчет клеток проводили в камере Нойбауэра (Counting Chamber with Bright Line Double Net Ruling, Marienfeld Superior).

Наблюдение за ультраструктурой моноцитов в каждой группе проводили методом трансмиссионной электронной микроскопии. Клетки фиксировали в 2,5% глutarовом альдегиде, приготовленного на фосфатном буфере (0,1 М, pH 7,4). Образцы промывали фосфатным буфером 3 раза по 15 минут. Постфиксацию проводили 1% четырехокисью осмия. Затем обезвоживали в этаноле в восходящем ряду (30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 96% и 100%) и выдерживали в ацетоне три раза по 20 минут. Далее образцы инкубировали 2 раза по 30 минут в окиси пропилена и проводили пропитывание смесью эпоксидных смол ЭПОН с окисью пропилена по 24 часа в следующих соотношениях: 1) 1:2; 2) 1:1; 3) 2:1. Затем

материал помещали в чистую смолу. Полимеризацию проводили при температурах 37 °C, 45 °C и 62 °C в течение 24 часов. Ультратонкие срезы (50 нм — 60 нм) получали на микротоме Leica (Германия) и окрашивали 20 минут насыщенным водным раствором 2%-ного уранилацетата и 5 минут 0,4%-ным цитратом свинца [34]. Ультраструктуру органелл, участвующих в аутофагии и LC3-ассоциированном фагоцитозе, наблюдали и фотографировали в HR-ТЕМ режиме на просвечивающем электронном микроскопе (ПЭМ) Hitachi HT 7700 Excellence при ускоряющем напряжении 100 кэВ с разрешением 0,144 нм [7, 8, 10, 13, 32, 39]. Микроскопию проводили в Междисциплинарном центре «Аналитическая микроскопия» (Казанский федеральный университет, г. Казань, Республика Татарстан, Россия).

Анализ ключевых белков регуляторов аутофагии и LC3-ассоциированного фагоцитоза проводили методом Вестерн-блот анализа. Определение концентрации белка в образцах проводили с использованием набора BCA Protein Assay (Thermo Fisher Scientific, США). Белки инкубировали последовательно с первичными и вторичными антителами и визуализировали с применением ECL-набора на основе хемилюминесцентного субстрата (Bio-Rad, США). Были использованы такие первичные антитела, как антитела мыши к Bcl-2 (Invitrogen, США), антитела кролика к Vps34, антитела мыши к Beclin-1 (Invitrogen, США), антитела к Rubicon (Invitrogen, США), Uvrag (Invitrogen, США), LC3 (Cell Signaling Technology, США), антитела к GABDH (Invitrogen, США). В качестве вторичных антител использовались мышиные и кроличьи антитела конъюгированные с пероксидазой хрена (Thermo Fisher Scientific, США). В качестве белкового маркера применяли MagikMark XP (Invitrogen, Molecular Probes, США) и Page Ruler (Thermo Fisher Scientific, США).

Для статистической обработки данных использовали программную среду вычислений GraphPad Prism — 8 (GraphPad Software, Inc., США). Серединные значения набора чисел (медиана выборки) не совпадали со средними значениями выборки. Нормальность распределения проверяли с помощью теста Шапиро—Уилка. Для сравнения двух групп использовали R-функцию теста Уилкоксона (критерий Манна—Уитни—Уилкоксона). Критический уровень значимости при проверке статистических гипотез о существовании различий показателей между группами принят равным 0,05 ($p\text{-value} \leq 0,05$). Корреляционный анализ был выполнен методом Спирмена.

Результаты

Первичный анализ популяций лейкоцитов проводили с помощью диаграммы прямого — бокового светорассеяния (SS — FS). Результаты

цитометрических исследований (рис. 2), а также микрофотографии флуоресцентной микроскопии (рис. 3) подтвердили наличие белка CD14 в клетках, выделенных из периферической крови, после очистки на градиенте плотности Фиколла с последующей очисткой в градиенте Перколл. Это свидетельствует о том, что данная субпопуляция клеток, содержит моноциты. Чистота и извлечение моноцитов составила около 70% (рис. 2).

В образцах здоровых доноров методом трансмиссионной электронной микроскопии были обнаружены одномембранные структуры харак-

терные для процесса LC3-ассоциированного фагоцитоза (лапосомы). Размеры лапосом в клетках здоровых доноров достигали 13 мкм в диаметре, а размеры аутофагосом в клетках больных варьировались в диапазоне 6-6,5 мкм (рис. 4).

Сравнительный анализ ключевых белков апоптоза методом Вестерн-блот анализа выявил сниженную экспрессию апоптотического белка Caspase-3 (Cas-3) в моноцитах больных тяжелой формы atopической бронхиальной астмы на фоне здоровых пациентов. Bcl-2 белок, который ингибирует протекание апоптоза, что приводит к дальнейшему функционированию клетки.

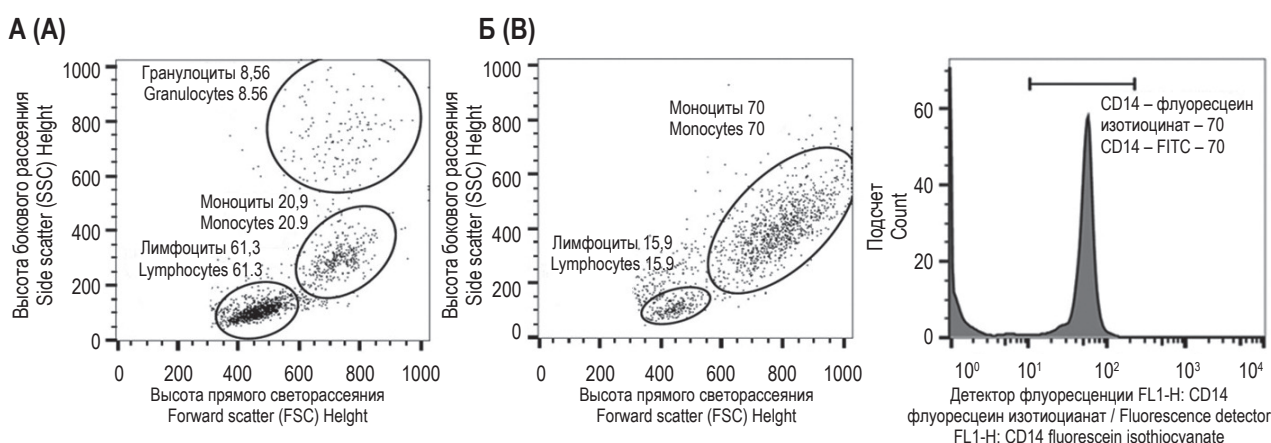


Рисунок 2. Этапы выделения моноцитов

Примечание. А – состав мононуклеарных клеток периферической крови, выделенных на градиенте плотности Фиколла (моноцитов 20,9%). Б – состав мононуклеарных клеток периферической крови, после очистки на градиенте плотности перколл (70,0%).

Figure 2. Stages of monocyte isolation

Note. A, composition of peripheral blood mononuclear cells isolated on the Ficoll density gradient (monocytes 20.9%). B, composition of peripheral blood mononuclear cells after purification on the Percoll density gradient (70.0%).

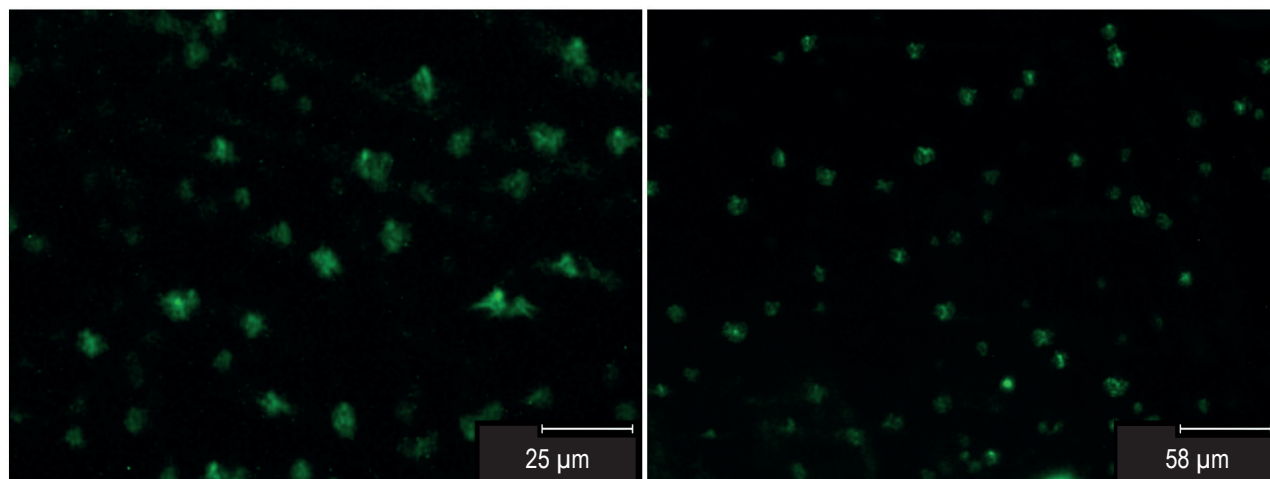


Рисунок 3. Микрофотография флуоресцентной микроскопии (увеличение 20×)

Примечание. Субпопуляция моноцитов периферической крови после очистки на градиенте плотности перколл, окрашенная моноклональными антителами к CD14, конъюгированные FITS. Репрезентативный результат.

Figure 3. Fluorescence micrograph (magnification 20×)

Note. A subpopulation of peripheral blood monocytes after purification on a Percoll density gradient, stained with anti-CD14 monoclonal antibodies conjugated with FITS. Representative result.

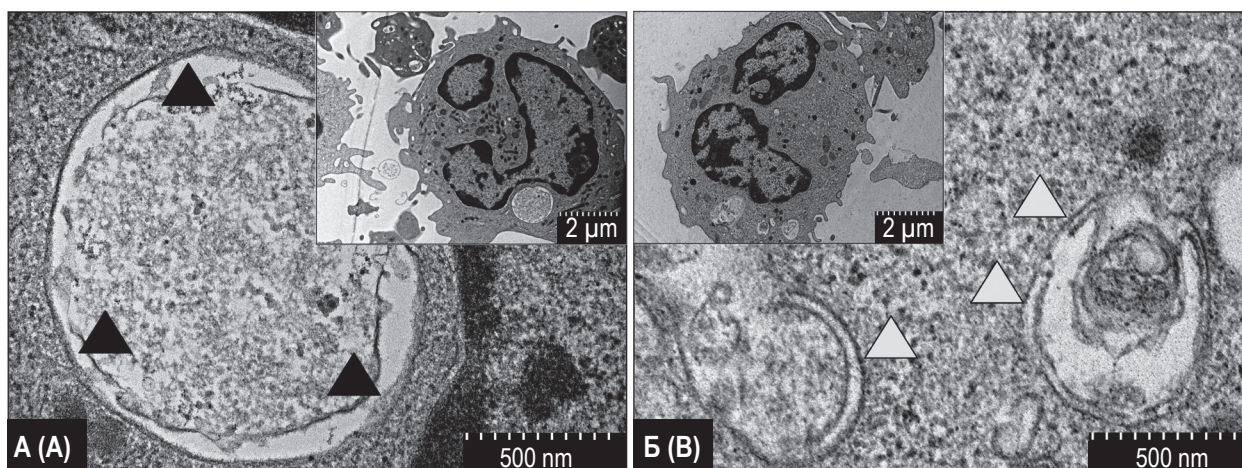


Рисунок 4. Структурное сравнение лапосом – LC3-ассоциированный фагоцитоз (А – черная стрелка) – моноцитов от здоровых доноров и аутофаголизосом – аутофагии (Б – белая стрелка) моноцитов от больных тяжелой атопической бронхиальной астмой

Figure 4. Structural comparison of laposomes – LC3-associated phagocytosis (A, black arrow) – monocytes from healthy donors, and autophagolysosomes – Autophagy (B, white arrow) of monocytes from patients with severe atopic bronchial asthma

Активацию канонической и неканонической аутофагии оценивали по экспрессии ключевых белков аутофагии. Результаты из рисунка 5 показали, что в моноцитах здоровых доноров маркерный белок аутофагии присутствует в форме LC3-I, которая находится в цитоплазме. LC3-I является цитозольным, тогда как LC3-II связан с мембраной. LC3-II, стандартный маркер аутофагосом, образуется путем конъюгации цитозольного LC3-I с фосфатидилэтаноламином (PE) на поверхности зарождающихся аутофагосом. В связи с этим, соотношение LC3-I/LC3-II говорит о завершенности или о незавершенности аутофагии. В группе с тяжелой формой АБА мы наблюдали более высокую экспрессию LC3-II в клетках.

У здоровых доноров наблюдается повышение белка Rubicon – негативного регулятора аутофагии. Rubicon является ключевым белком LC3-ассоциированного фагоцитоза, и используется в качестве маркера протекания процесса.

Анализ белков Rubicon и Uvrag выявил в образцах больных тяжелой формой АБА низкую экспрессию, в то время как в образцах здоровых доноров экспрессия белков LC3-ассоциированного фагоцитоза была выше, чем у больных. Это говорит о том, что механизм LC3-ассоциированного фагоцитоза в моноцитах больных АБА тяжелой формы запускается реже, или нарушен.

Ген *Beclin1* (ATG 6) играет ключевую роль в канонической аутофагии, выполняющий роль одного из инициаторов механизма. В образцах

моноцитов АБА было обнаружено не значительное повышение белка Beclin-1.

Обсуждение

Считается, что среди различных форм клеточной гибели каспазо-зависимый апоптоз отвечает за большую часть гомеостатического клеточного отбора. Апоптоз характеризуется округлением и сморщиванием клеток, конденсацией хроматина и образованием пузырьков плазматической мембраны или апоптотических телец [1]. Апоптотическая гибель клеток помогает устранить клетки, которые являются старыми или больше не нужны, не вызывая повреждения окружающих тканей и иницируя иммунный ответ. В случае, когда происходит нарушение утилизации иммунных клеток, нарушается именно иммунный гомеостаз, приводящий к различным иммунным и аутоиммунным патологиям. В случаях повышенной гибели клеток из-за инфекции, или при встрече с каким либо аллергеном (апоптоз эпителиальных клеток при легочных заболеваниях), клиренс апоптотических клеток опосредуется как резидентными фагоцитами, так и фагоцитами, привлеченными из кровотока [19]. Нарушение клиренса апоптотических клеток на ранних стадиях гибели и прогрессирование до вторичного некротического состояния может вызвать воспаление ткани из-за высвобождения клеточного содержимого или воздействия иным образом секвестрированных внутриклеточных фрагментов. Помимо резидентных фагоцитов, циркулирующие моноциты также могут рекрутироваться

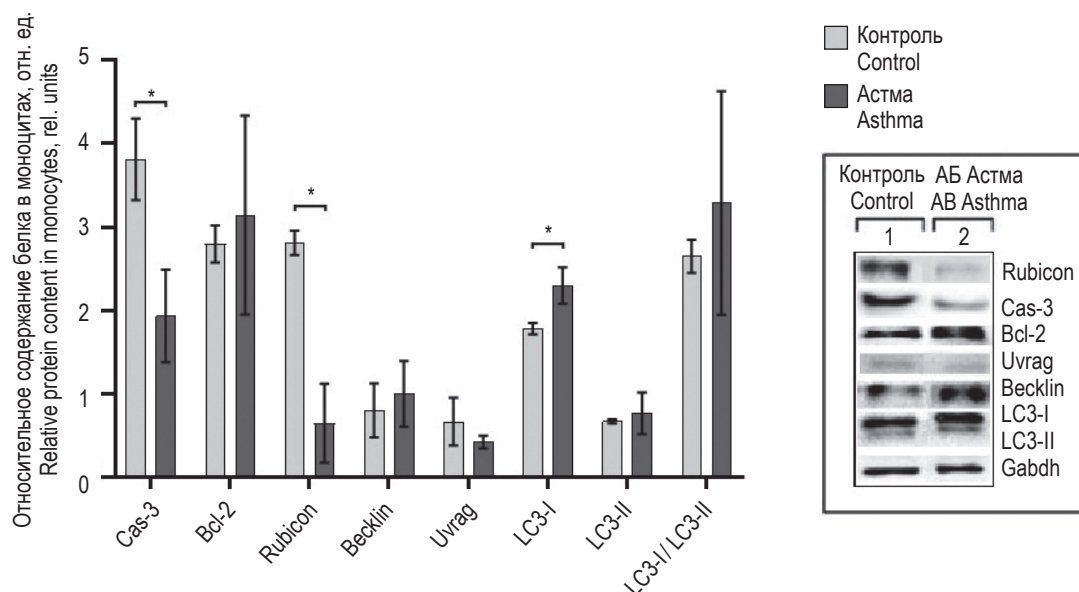


Рисунок 5. Анализ апоптотических (Cas-3 и Bcl-2), аутофагических (Beclin-1, LC3) и белков LAP-ассоциированного фагоцитоза (Rubicon, LC3) в моноцитах здоровых доноров (1) и больных тяжелой формой астмы (2)

Примечание. * – $p \leq 0,05$.

Figure 5. Analysis of apoptotic (Cas-3 and Bcl-2), autophagic (Beclin-1, LC3) and LAP-associated phagocytosis proteins (Rubicon, LC3) in monocytes of healthy donors (1) and patients with severe asthma (2)

Note. *, $p \leq 0.05$.

во время острой необходимости. Рекрутированные фагоциты могут действовать совместно или конкурировать с резидентными фагоцитами и тем самым влиять на иммунный ответ.

Способность макрофагов утилизировать апоптотический груз при atopической бронхиальной астме была продемонстрирована Chung-Hsiang [22]. Было выявлено, что у макрофагов больных АБА имеются дефекты, включающие снижение фагоцитоза, снижение эффероцитоза и усиление апоптоза самих макрофагов, что в конечном итоге приводило к уязвимости дыхательных путей [22].

У нас вызывает большой интерес ответ на вопрос, как эти механизмы протекают в циркулирующих моноцитах. Появляются ли эти дефекты в ходе поляризации в провоспалительные и противовоспалительные макрофаги, или моноциты уже имеют схожие повреждения [14]. Также стоит вопрос о протекании канонической аутофагии в этих клетках и его влиянии на гомеостаз иммунных клеток.

В работе представлен анализ содержания некоторых ключевых белков LAP-пути в моноцитах периферической крови больных бронхиальной астмой тяжелого течения. Ранее было установлено, что для этой группы больных характерна устойчивость клеток к апоптозу. В связи с этим в клетках активируется аутофагия, альтернативный путь клеточной гибели. Установленная нами пониженная экспрессия белка Rubicon в группе

больных АБА на фоне здоровых доноров указывает на то, что в моноцитах больных LAP-путь не активируется.

Процесс слияния лизосом с аутофагосомами позитивно регулируется комплексом UVRAG-Vps34-Beclin-1, а также негативно регулируется комплексом Rubicon-UVRAG-Vps34-Beclin-1, т.е. белок Rubicon является ключевым регулятором между канонической и неканонической аутофагии [40]. В случае если преобладает комплекс белков Rubicon-UVRAG-Vps34-Beclin-1 в фагоцитирующих клетках запускается LC3-ассоциированный фагоцитоз, и в этом случае клетка перерабатывает не собственные органеллы, как в случае канонической аутофагии, а внешнечелочные патогены, в том числе и апоптотические тельца других клеток [28, 29].

Нами показано, что в моноцитах больных астмой содержание белка Rubicon, отвечающего за протекание LAP и формирование одномембранной структуры, необходимой для деградации апоптотических клеток, было ниже чем в моноцитах здоровых доноров (рис. 5).

Анализы трансмиссионной электронной микроскопии (рис. 4), показывающее низкое содержание одномембранных структур (лапосом) на фоне высокого содержания двухмембранных структур относящихся к аутофагии, также доказывают низкое протекание LAP при тяжелой форме atopической бронхиальной астме.

Заключение

Таким образом, повышенная экспрессия белка Rubicon — маркера LC3-ассоциированного фагоцитоза (установленная в моноцитах здоровых доноров) свидетельствует об активации LAP-пути, по которому происходит фагоцитоз дефектных Т-клеток в норме. Подавление экспрессии белка

Rubicon в моноцитах пациентов с астмой тяжелой формы свидетельствует о нарушении этого физиологического процесса.

Полученные результаты дают возможность дальнейшего изучения молекулярных механизмов нарушения LAP-пути в моноцитах при развитии тяжелой формы астмы.

Список литературы / References

1. Деев Р.В., Билялов А.И., Жампеисов Т.М. Современные представления о клеточной гибели // Гены и Клетки, 2018. Т. 13, № 1. С. 6-19. [Deev R.V., Bilyalov A.I., Zhampeisov T.M. Modern ideas about cell death. *Geny i Kletki = Genes and Cells*, 2018, Vol. 13, no. 1, pp. 6-19. (In Russ.)]
2. Ибрагимов Б.Р., Скибо Ю.В., Абрамова З.И. Аутофагия и LC3-ассоциированный фагоцитоз: сходства и различия // Медицинская иммунология, 2023. Т. 25, № 2. С. 233-252. [Ibragimov B.R., Skibo Yu.V., Abramova Z.I. Autophagy and LC3-associated phagocytosis: similarities and differences. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2023, Vol. 25, no. 2, pp. 233-252. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-AAL-2569.
3. Скибо Ю.В., Тихомирова М.В., Абрамов С.Н., Биктагирова Э.М., Решетникова И.Д., Акберова Н.И., Абрамова З.И. Анализ экспрессии ключевых белков-регуляторов апоптоза и аутофагии в Т-лимфоцитах больных бронхиальной астмой // Ученые записки Казанского университета. Серия естественные науки, 2019. Т. 161, № 4. С. 505-520. [Skibo Yu.V., Tikhomirova M.V., Abramov S.N., Biktagirova E.M., Reshetnikova I.D., Akberova N.I., Abramova Z.I. Analysis of the expression of key protein regulators of apoptosis and autophagy in T-lymphocytes of patients with bronchial asthma. *Uchenye zapiski Kazanskogo universiteta. Seriya estestvennye nauki = Scientific Notes of Kazan University. Natural Science Series*, 2019, Vol. 161, no. 4, pp. 505-520. (In Russ.)]
4. Скибо Ю.В., Фатхуллина А.Р., Ибрагимов Б.Р., Абрамов С.Н., Исмагилова Р.Р., Биктагирова Э.М., Андрианова И.А., Максудова А.Н., Абрамова З.И. Индукция апоптоза и аутофагии в Т-лимфоцитах пациентов с системной красной волчанкой // Казанский медицинский журнал, 2020. Т. 101, № 3. С. 347-355. [Skibo Yu.V., Fathullina A.R., Ibragimov B.R., Abramov S.N., Ismagilova R.R., Biktagirova E.M., Andrianova I.A., Maksudova A.N., Abramova Z.I. Induction of apoptosis and autophagy in T-lymphocytes of patients with Systemic Lupus Erythematosus. *Kazanskiy meditsinskiy zhurnal = Kazan Medical Journal*, 2020, Vol. 101, no. 3, pp. 347-355. (In Russ.)]
5. Смольникова М.В., Смирнова С.В., Ильенкова Н.А., Коноплева О.С. Иммунологические маркеры неконтролируемого течения атопической бронхиальной астмы у детей // Медицинская иммунология, 2017. Т. 19, № 4. С. 453-460. [Smolnikova M.V., Smirnova S.V., Ilyenkova N.A., Konopleva O.S. Immunological markers of uncontrolled atopic bronchial asthma in children. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2017, Vol. 19, no. 4, pp. 453-460. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2017-4-453-460.
6. Ярилин А.А., Никонова М.Ф., Ярилина А.А., Варфоломеева М.И., Григорьева Т.Ю. Апоптоз, роль в патологии и значимость его оценки при клинико-иммунологическом обследовании больных // Медицинская иммунология, 2000. Т. 2, № 1. С. 7-16. Yarilin A.A., Nikonova M.F., Yarilina A.A., Varfolomeeva M.I., Grigorieva T.Yu. Apoptosis, importance of its evaluation in immunopathological states. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2000, Vol. 2, no. 1, pp. 7-16. (In Russ.)]
7. Aguirre L.A., Montalbán-Hernández K., Avendaño-Ortiz J., Marín E., Lozano R., Toledano V., Sánchez-Maroto L., Terrón V., Valentín J., Pulido E., Casalvilla J.C., Rubio C., Diekhorst L., Laso-García F., Del Fresno C., Collazo-Lorduy A., Jiménez-Munarriz B., Gómez-Campelo P., Llanos-González E., Fernández-Velasco M., Rodríguez-Antolín C., Pérez de Diego R., Cantero-Cid R., Hernández-Jimenez E., Álvarez E., Rosas R., Dies López-Ayllón B., de Castro J., Wculek S.K., Cubillos-Zapata C., Ibáñez de Cáceres I., Díaz-Agiero P., Gutiérrez Fernández M., Paz de Miguel M., Sancho D., Schulte L., Perona R., Belda-Iniesta C., Boscá L., López-Collazo E. Tumor stem cells fuse with monocytes to form highly invasive tumor-hybrid cells. *Oncoimmunology*, 2020, Vol. 9, no. 1, 1773204. doi: 10.1080/2162402X.2020.1773204.
8. Arteaga-Blanco L.A., Mojoli A., Monteiro R.Q., Sandim V., Menna-Barreto R.F.S., Pereira-Dutra F.S., Bozza P.T., Resende R.O., Bou-Habib D.C. Characterization and internalization of small extracellular vesicles released by human primary macrophages derived from circulating monocytes. *PloS One*, 2020, Vol. 15, no. 8, e0237795. doi: 10.1371/journal.pone.0237795.
9. Boada-Romero E., Martinez J., Heckmann B.L., Green D.R. The clearance of dead cells by efferocytosis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2020, Vol. 21, no. 7, pp. 398-414.
10. Costa G.M.J., Lacerda S.M.S.N., Figueiredo A.F.A., Wnuk N.T., Brener M.R.G., Andrade L.M., Campolina-Silva G.H., Kauffmann-Zeh A., Pacifico L.G.G., Versiani A. F., Antunes M.M., Souza F.R., Cassali G.D., Caldeira-Brant A.L., Chiarini-Garcia H., de Souza F.G., Costa V.V., da Fonseca F.G., Nogueira M.L., Campos G.R.F., Kangussu L.M., Martins E.M.N., Antonio L.M., Bittar C., Rahal P., Aguiar R.S., Mendes B.P., Procópio M.S., Furtado T.P., Guimaraes Y.L., Menezes G.B., Martinez-Marchal A., Orwig K.E., Briño-Enríquez M., Furtado M.H. High SARS-CoV-2 tropism and activation of immune cells in the testes of non-vaccinated deceased COVID-19 patients. *BMC Biol.*, 2023, Vol. 21, no. 1, 36. doi: 10.1186/s12915-022-01497-8.

11. Cunha L.D., Yang M., Carter R., Guy C., Harris L., Crawford J.C., Quarato G., Boada-Romero E., Kalkavan H., Johnson M.D.L., Natarajan S., Turnis M.E., Finkelstein D., Opferman J.T., Gawad C., Green D.R. LC3-Associated Phagocytosis in Myeloid Cells Promotes Tumor Immune Tolerance. *Cell*, 2018, Vol. 175, no. 2, pp. 429-441.
12. Florey O., Kim S.E., Sandoval C.P., Haynes C.M., Overholtzer M. Autophagy machinery mediates macroendocytic processing and entotic cell death by targeting single membranes. *Nat. Cell Biol.*, 2011, Vol. 13, no. 11, pp. 1335-1343.
13. Gomzikova M.O., Zhuravleva M.N., Miftakhova R.R., Arkhipova S.S., Evtugin V.G., Khaiboullina S.F., Kiyasov A.P., Persson J.L., Mongan N.P., Pestell R.G., Rizvanov A.A. Cytochalasin B-induced membrane vesicles convey angiogenic activity of parental cells. *Oncotarget*, 2017, Vol. 8, no. 41, pp. 70496-70507.
14. Heckmann B.L., Boada-Romero E., Cunha L.D., Magne J., Green D.R. LC3-Associated Phagocytosis and Inflammation. *J. Mol. Biol.*, 2017, Vol. 429, no. 23, pp. 3561-3576.
15. Heckmann B.L., Teubner B.J.W., Tummers B., Boada-Romero E., Harris L., Yang M., Guy C.S., Zakharenko S.S., Green D.R. LC3-Associated Endocytosis Facilitates β -Amyloid Clearance and Mitigates Neurodegeneration in Murine Alzheimer's Disease. *Cell*, 2019, Vol. 178, no. 3, pp. 536-551.
16. Herb M., Gluscho A., Schramm M. LC3-associated phagocytosis – The highway to hell for phagocytosed microbes. *Semin. Cell Dev. Biol.*, 2020, Vol. 101, pp. 68-76.
17. Inomata M., Xu S., Chandra P., Meydani S.N., Takemura G., Philips J.A., Leong J.M. Macrophage LC3-associated phagocytosis is an immune defense against *Streptococcus pneumoniae* that diminishes with host aging. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2020, Vol. 117, no. 52, pp. 33561-33569.
18. Ishii K.J., Kawagoe T., Koyama S., Matsui K., Kumar H., Kawai T., Uematsu S., Takeuchi O., Takeshita F., Coban C., Akira S. TANK-binding kinase-1 delineates innate and adaptive immune responses to DNA vaccines. *Nature*, 2008, Vol. 451, no. 7179, pp. 725-729.
19. Ji W.J., Ma Y.Q., Zhou X., Zhang Y.D., Lu R.Y., Sun H.Y., Z.Z. G., Zhang Z., Li Y.M., Wei L.Q. Temporal and spatial characterization of mononuclear phagocytes in circulating, lung alveolar and interstitial compartments in a mouse model of bleomycin-induced pulmonary injury. *J. Immunol. Met.*, 2014, Vol. 403, no. 1-2, pp. 7-16.
20. Kelley S.M., Ravichandran K.S. Putting the brakes on phagocytosis: "don't-eat-me" signaling in physiology and disease. *EMBO Rep.*, 2021, Vol. 22, no. 6, e52564. doi: 10.15252/embr.202152564.
21. Lambrecht B.N., Hammad H. The immunology of the allergy epidemic and the hygiene hypothesis. *Nat. Immunol.*, 2017, Vol. 18, no. 10, pp. 1076-1083.
22. Li C.H., Tsai M.L., Chiou H.C., Lin Y.C., Liao W.T., Hung C.H. Role of Macrophages in Air Pollution Exposure Related Asthma. *Int. J. Mol. Sci.*, 2022, Vol. 23, no. 20, 12337. doi: 10.3390/ijms232012337.
23. Li T., Kong L., Li X., Wu S., Attri K. S., Li Y., Gong W., Zhao B., Li L., Herring L.E., Asara J. M., Xu L., Luo X., Lei Y.L., Ma Q., Seveau S., Gunn J.S., Cheng X., Singh P.K., Green D.R., Wang H., Wen H. *Listeria monocytogenes* upregulates mitochondrial calcium signalling to inhibit LC3-associated phagocytosis as a survival strategy. *Nat. Microbiol.*, 2021, Vol. 6, no. 3, pp. 366-379.
24. Li Y., Yong Y.L., Yang M., Wang W., Qu X., Dang X., Shang D., Shao Y., Liu J., Chang Y. Fine particulate matter inhibits phagocytosis of macrophages by disturbing autophagy. *FASEB J.*, 2020, Vol. 34, no. 12, pp. 16716-16735.
25. Lim J., Park H., Heisler J., Maculins T., Roose-Girma M., Xu M., McKenzie B., van Lookeren Campagne M., Newton K., Murthy A. Autophagy regulates inflammatory programmed cell death via turnover of RHIM-domain proteins. *eLife*, 2019, Vol. 8, e44452. doi: 10.7554/eLife.44452.
26. Magné J., Green D.R. LC3-associated endocytosis and the functions of Rubicon and ATG16L1. *Sci. Adv.*, 2022, Vol. 8, no. 43, eabo5600. doi: 10.1126/sciadv.abo5600.
27. Martinez J., Cunha L.D., Park S., Yang M., Lu Q., Orchard R., Li Q.Z., Yan M., Janke L., Guy C., Linkermann A., Virgin H.W., Green D.R. Corrigendum: Noncanonical autophagy inhibits the autoinflammatory, lupus-like response to dying cells. *Nature*, 2016, Vol. 539, no. 7627, 124. doi: 10.1038/nature19837.
28. Masud S., Prajsnar T.K., Torraca V., Lamers G.E.M., Benning M., Vaart M.V.D., Meijer A.H. Macrophages target *Salmonella* by Lc3-associated phagocytosis in a systemic infection model. *Autophagy*, 2019, Vol. 15, no. 5, pp. 796-812.
29. Masud S., van der Burg L., Storm L., Prajsnar T.K., Meijer A.H. Rubicon-Dependent Lc3 Recruitment to *Salmonella*-Containing Phagosomes Is a Host Defense Mechanism Triggered Independently From Major Bacterial Virulence Factors. *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, 2019, Vol. 9, 279. doi: 10.3389/fcimb.2019.00279.
30. Matsunaga K., Saitoh T., Tabata K., Omori H., Satoh T., Kurotori N., Maejima I., Shirahama-Noda K., Ichimura T., Isobe T., Akira S., Noda T., Yoshimori T. Two Beclin 1-binding proteins, Atg14L and Rubicon, reciprocally regulate autophagy at different stages. *Nat. Cell Biol.*, 2009, Vol. 11, no. 4, pp. 385-396.
31. Mehta P., Henault J., Kolbeck R., Sanjuan M.A. Noncanonical autophagy: one small step for LC3, one giant leap for immunity. *Curr. Opin. Immunol.*, 2014, Vol. 26, pp. 69-75.
32. Minnullina L., Kostennikova Z., Evtugin V., Akosah Y., Sharipova M., Mardanov A. Diversity in the swimming motility and flagellar regulon structure of uropathogenic *Morganella morganii* strains. *Int. Microbiol.*, 2022, Vol. 25, no. 1, pp. 111-122.
33. Morioka S., Maueröder C., Ravichandran K.S. Living on the Edge: Efferocytosis at the Interface of Homeostasis and Pathology. *Immunity*, 2019, Vol. 50, no. 5, pp. 1149-1162.
34. Reynolds E.S. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *J. Cell Biol.*, 1963, Vol. 17, no. 1, pp. 208-212.

35. Sanjuan M.A., Dillon C.P., Tait S.W., Moshiah S., Dorsey F., Connell S., Komatsu M., Tanaka K., Cleveland J.L., Withoff S., Green D.R. Toll-like receptor signalling in macrophages links the autophagy pathway to phagocytosis. *Nature*, 2007, Vol. 450, no. 7173, pp. 1253-1257.
36. Sun Q., Westphal W., Wong K.N., Tan I., Zhong Q. Rubicon controls endosome maturation as a Rab7 effector. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2010, Vol. 107, no. 45, pp. 19338-19343.
37. Tabata K., Matsunaga K., Sakane A., Sasaki T., Noda T., Yoshimori T. Rubicon and PLEKHM1 negatively regulate the endocytic/autophagic pathway via a novel Rab7-binding domain. *Mol. Biol. Cell*, 2010, Vol. 21, no. 23, pp. 4162-4172.
38. Yang C.S., Lee J.S., Rodgers M., Min C.K., Lee J.Y., Kim H.J., Lee K.H., Kim C.J., Oh B., Zandi E., Yue Z., Kramnik I., Liang C., Jung J.U. Autophagy protein Rubicon mediates phagocytic NADPH oxidase activation in response to microbial infection or TLR stimulation. *Cell Host Microbe*, 2012, Vol. 11, no. 3, pp. 264-276.
39. Zhang P., Zhu J., Zhang L., Lv X., Guo D., Liao L., Huang S., Peng Z. The Effects of Ginkgo biloba Extract on Autophagy in Human Macrophages Stimulated by Cigarette Smoke Extract. *Front. Biosci. (Landmark Ed.)*, 2023, Vol. 28, no. 3, 50. doi: 10.31083/j.fbl2803050.
40. Zhong Y., Wang Q.J., Li X., Yan Y., Backer J.M., Chait B.T., Heintz N., Yue Z. Distinct regulation of autophagic activity by Atg14L and Rubicon associated with Beclin 1-phosphatidylinositol-3-kinase complex. *Nat. Cell Biol.*, 2009, Vol. 11, no. 4, pp. 468-476.

Авторы:

Ибрагимов Б.Р. — младший научный сотрудник научно-исследовательской лаборатории «Иммунопатология», Институт фундаментальной медицины и биологии ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет», г. Казань, Республика Татарстан, Россия

Скибо Ю.В. — к.б.н., старший научный сотрудник научно-исследовательской лаборатории «Иммунопатология», Институт фундаментальной медицины и биологии ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет», г. Казань, Республика Татарстан, Россия

Решетникова И.Д. — к.м.н., врио директора, заместитель директора по научной работе ФБУН «Казанский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии» Роспотребнадзора; доцент, Институт фундаментальной медицины и биологии ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет», г. Казань, Республика Татарстан, Россия

Абрамов С.Н. — младший научный сотрудник научно-исследовательской лаборатории «Иммунопатология», Институт фундаментальной медицины и биологии ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет», г. Казань, Республика Татарстан, Россия

Даминова А.Г. — к.б.н., старший научный сотрудник междисциплинарного центра «Аналитическая микроскопия» ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет», г. Казань, Республика Татарстан, Россия

Евтюгин В.Г. — к.б.н., директор междисциплинарного центра «Аналитическая микроскопия» ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет», г. Казань, Республика Татарстан, Россия

Абрамова З.И. — д.б.н., профессор кафедры биохимии, биотехнологии и фармакологии, главный научный сотрудник научно-исследовательской лаборатории «Иммунопатология», Институт фундаментальной медицины и биологии ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет», г. Казань, Республика Татарстан, Россия

Authors:

Ibragimov B.R., Junior Research Associate, Laboratory of Immunopathology, Institute of Fundamental Medicine and Biology, Kazan (Volga Region) Federal University, Kazan, Republic of Tatarstan, Russian Federation

Skibo Yu.V., PhD (Biology), Senior Research Associate, Laboratory of Immunopathology, Institute of Fundamental Medicine and Biology, Kazan (Volga Region) Federal University, Kazan, Republic of Tatarstan, Russian Federation

Reshetnikova I.D., PhD (Medicine) Acting Director, Kazan Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Kazan, Republic of Tatarstan, Russian Federation; Associate Professor, Institute of Fundamental Medicine and Biology, Kazan (Volga Region) Federal University, Kazan, Republic of Tatarstan, Russian Federation

Abramov S.N., Junior Research Associate, Laboratory of Immunopathology, Institute of Fundamental Medicine and Biology, Kazan (Volga Region) Federal University, Kazan, Republic of Tatarstan, Russian Federation

Daminova A.G., PhD (Biology), Senior Research Associate, Interdisciplinary Center for Analytical Microscopy, Kazan (Volga Region) Federal University, Kazan, Republic of Tatarstan, Russian Federation

Evtugin V.G., PhD (Biology), Director, Interdisciplinary Center for Analytical Microscopy, Kazan (Volga Region) Federal University, Kazan, Republic of Tatarstan, Russian Federation

Abramova Z.I., PhD, MD (Biology), Professor, Department of Biochemistry, Biotechnology and Pharmacology, Chief Research Associate, Laboratory of Immunopathology, Institute of Fundamental Medicine and Biology, Kazan (Volga Region) Federal University, Kazan, Republic of Tatarstan, Russian Federation

Поступила 13.05.2023
Отправлена на доработку 26.06.2023
Принята к печати 04.10.2023

Received 13.05.2023
Revision received 26.06.2023
Accepted 04.10.2023

ОЦЕНКА ЛОКАЛЬНОГО ПРОФИЛЯ ЦИТОКИНОВ, ЭКСПРЕССИРУЕМЫХ НАТИВНЫМИ КЛАПАНАМИ СЕРДЦА, ПОЛУЧЕННЫМИ ОТ ПАЦИЕНТОВ С ИНФЕКЦИОННЫМ ЭНДОКАРДИТОМ

**Синицкая А.В., Синицкий М.Ю., Казачек Я.В., Евтушенко А.В.,
Хуторная М.В., Асанов М.А., Поддубняк А.О., Понасенко А.В.**

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

Резюме. Инфекционный эндокардит характеризуется дисфункцией клапанов сердца и вносит значительный вклад в структуру заболеваемости и смертности среди всех патологий сердечно-сосудистой системы. Иммунный ответ играет важную роль в патофизиологии данного заболевания. Структурные модификации в генах, кодирующих молекулы, вовлеченные в иммунный ответ, а также изменение их экспрессии, могут приводить к изменению функциональной активности и количества синтезируемых белков, что, в свою очередь, оказывает влияние на эффективности иммунного ответа. Целью исследования стала оценка локального профиля цитокинов, экспрессируемых нативными клапанами сердца, полученными от пациентов с инфекционным эндокардитом в процессе кардиохирургического вмешательства.

Профиль секретируемых цитокинов изучали в нативных клапанах сердца, полученных от 4 пациентов с инфекционным эндокардитом (экспериментальная группа) и 10 пациентов с ревматической болезнью сердца (контрольная группа) методом дот-блоттинга с использованием наборов Proteome Profiler™ Human Cytokine Array Kit (ARY005B). Результаты дот-блоттинга подтверждали путем оценки уровня экспрессии соответствующих генов с помощью количественной полимеразной цепной реакции после обратной транскрипции с использованием праймеров, синтезированных компанией «Евроген» (Москва, Россия).

Белки MIF, PAI-1, ICAM-1 и CXCL12 обнаружены в образцах нативных клапанов как экспериментальной, так и контрольной групп. В результате полуколичественного анализа установлено, что клапаны, пораженные инфекционным эндокардитом, характеризовались четырехкратным повышением секреции PAI-1 и двухкратным снижением секреции молекул ICAM-1 и CXCL12 по сравнению с

Адрес для переписки:

Синицкая Анна Викторовна
ФГБНУ «Научно-исследовательский институт
комплексных проблем сердечно-сосудистых
заболеваний»
650002, Россия, г. Кемерово,
б-р им. акад. Леонида Барбараша, 6.
Тел.: 8 (3842) 64-46-50.
E-mail: cepoav1991@gmail.com

Address for correspondence:

Anna V. Sinitskaya
Research Institute for Complex Issues
of Cardiovascular Diseases
6 Acad. L.S. Barbarash Blvd
Kemerovo
650002 Russian Federation
Phone: +7 (3842) 64-46-50.
E-mail: cepoav1991@gmail.com

Образец цитирования:

А.В. Синицкая, М.Ю. Синицкий, Я.В. Казачек,
А.В. Евтушенко, М.В. Хуторная, М.А. Асанов,
А.О. Поддубняк, А.В. Понасенко «Оценка локального
профиля цитокинов, экспрессируемых нативными
клапанами сердца, полученными от пациентов с
инфекционным эндокардитом» // Медицинская
иммунология, 2024. Т. 26, № 6. С. 1223-1234.
doi: 10.15789/1563-0625-CEP-2869

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

For citation:

A.V. Sinitskaya, M.Yu. Sinitsky, Ya.V. Kazachek,
A.V. Evtushenko, M.V. Khutornaya, M.A. Asanov,
A.O. Poddubnyak, A.V. Ponasenko "Cytokine expression profile
of native heart valves obtained from patients with infective
endocarditis", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya
Immunologiya, 2024, Vol. 26, no. 6, pp. 1223-1234.
doi: 10.15789/1563-0625-CEP-2869

© Sinitskaya A.V. et al., 2024
The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License
DOI: 10.15789/1563-0625-CEP-2869

контрольной группой. MIF экспрессировался на одном и том же уровне в обеих изученных группах. Белки IL-1ra, IL-6, IL-8, IL-16, CCL4, CCL5 и CXCL1 обнаружены только в клапанах, пораженных инфекционным эндокардитом. Кроме того, показано, что экспериментальная группа характеризовалась повышением экспрессии генов *MIF*, *IL6*, *IL8*; а также снижением уровня мРНК генов *PAI1*, *IL1RA* и *CXCL1* относительно контроля.

Таким образом, нативные клапаны сердца, пораженные инфекционным эндокардитом, характеризуются развитием локального воспаления, вызванного патогенной бактериемией, и активной неоваскуляризацией.

Ключевые слова: инфекционный эндокардит, нативные клапаны сердца, патогенная бактериемия, воспаление, генная экспрессия, цитокины

CYTOKINE EXPRESSION PROFILE OF NATIVE HEART VALVES OBTAINED FROM PATIENTS WITH INFECTIVE ENDOCARDITIS

Sinitskaya A.V., Sinitsky M.Yu., Kazachek Ya.V., Evtushenko A.V., Khutornaya M.V., Asanov M.A., Poddubnyak A.O., Ponasenko A.V.

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

Abstract. Infectious endocarditis is characterized by dysfunction of heart valves and contribute significantly to the cardiovascular morbidity and mortality worldwide, especially in low- and middle-income countries. Immune response is playing the important role in the pathophysiology of this disease. This work was aimed to study the local cytokine profile in native heart valves obtained from the patients with infectious endocarditis. Cytokine profiling were performed in biopsies of native heart valves explanted from 4 patients with infective endocarditis (experimental group) and 10 patients with rheumatic heart disease (comparison group) by dot blotting using the Proteome Profiler™ Human Cytokine Array Kit (ARY005B). The results of dot blotting were validated by the gene expression profiling using quantitative polymerase chain reaction. MIF, PAI-1, ICAM-1 and CXCL12 were found in the native heart valves explanted from both infective endocarditis and rheumatic heart disease patients. Upon a semi-quantitative assessment, the heart valves explanted from the infective endocarditis patients were characterized by 4-fold increased secretion of PAI-1 and twofold decreased secretion of ICAM-1 and CXCL12 compared to the heart valves affected by rheumatic heart disease. MIF was expressed on similar levels in the both studied groups. IL-1ra, IL-6, IL-8, IL-16, CCL4, CCL5 and CXCL1 were detected only in heart valves affected by infectious endocarditis. At the gene expression level, *MIF*, *IL6*, *IL8* genes were upregulated and *PAI1*, *IL1RA*, *CXCL1* genes were downregulated in heart valves explanted from infectious endocarditis patients compared to the subjects affected by rheumatic heart disease. Native heart valves in cases of infectious endocarditis are characterized by nonspecific local inflammatory response associated with pathogenic bacteremia, along with active neovascularization. The data obtained can help to better understand fundamental pathogenetic mechanisms of infectious endocarditis.

Keywords: infectious endocarditis, native heart valves, pathogenic bacteremia, inflammation, gene expression, proteomic profile

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

Введение

Инфекционный эндокардит (ИЭ) — это воспалительное заболевание, поражающие клапаны сердца и другие части эндокарда, основным эти-

ологический агентом которого являются различные микроорганизмы [2, 6] и грибы [1]. Частота данной патологии варьирует от 1 до 10 случаев на 100 000 человек, а госпитальная летальность достигает 40% [12]. Примерно 50% пациентов нуждается в оперативном вмешательстве, сопряженном с 15-25% госпитальной летальностью и 40% риском смерти в течение года после операции [12, 25]. Таким образом, поиск маркеров, ас-

социированных с повышенным риском развития ИЭ и исследование вклада молекулярно-генетических факторов в его патогенез представляется актуальным для современной биомедицинской науки.

Патогенез ИЭ представляет собой комплексный процесс, в который вовлечено множество различных факторов. Патоген, попавший в организм, с током крови переносится к эндокарду, где прикрепляется к эндотелию. Далее запускается иммунный ответ, являющийся важнейшим фактором, влияющим на прогрессирование ИЭ. Активность белков, вовлеченных в воспалительный сигналинг, запуск и рестрикцию иммунного ответа, ассоциирована с риском развития ИЭ, особенностями его протекания и исхода [26]. Известно, что иммунный ответ генетически детерминирован. Структурные модификации в генах, кодирующих молекулы, вовлеченные в иммунный ответ, а также изменение их экспрессии, могут приводить к изменению функциональной активности и количества синтезируемых белков, что, в свою очередь, оказывает влияние на эффективности иммунного ответа [34]. Все это обуславливает важность изучения молекулярных основ иммунного ответа на патогенную бактерию, приводящую к развитию ИЭ, как для фундаментальной, так и для прикладной медицины.

Материалы и методы

В представленное ретроспективное исследование были включены пациенты, проходившие лечение в Научно-исследовательском институте комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний (Кемерово, Россия) в 2022 году. Биопсия нативных митральных клапанов сердца была получена в процессе кардиохирургических вмешательств от 4 пациентов с инфекционным эндокардитом (экспериментальная группа) и 10 пациентов с ревматической болезнью сердца (РБС) (контрольная группа). После резекции клапаны помещали в стабилизатор RNeasy Lysis Solution (Qiagen, США) и транспортировали в лабораторию для дальнейшего анализа. Полная характеристика пациентов, включенных в исследование, представлена в таблице 1. ИЭ диагностировали на основе клинических данных, результатов эхокардиографии и микробиологического исследования образцов крови (культуры на различных питательных средах). У всех пациентов из экспериментальной группы в ходе эхокардиографии регистрировали подвижные вегетации на

нативных клапанах сердца. В дополнение, диагноз верифицировали в соответствии с международными модифицированными критериями Дьюка [16]. РБС диагностировали при наличии патологических шумов в сердце, выявляемых в процессе аускультации с последующей электрокардиографией и верификацией в соответствии с критериями Джонса [11, 13]. Пациенты с онкологическими, аутоиммунными и психическими заболеваниями, острыми или обострившимися хроническими инфекционными патологиями были исключены из исследования. Исследование выполнено в соответствии со стандартами надлежащей клинической практики (Good Clinical Practice) и принципами Хельсинкской декларации. Протокол исследования одобрен локальным этическим комитетом ФГБНУ НИИ КПССЗ. До включения в исследование у всех участников получено добровольное письменное информированное согласие.

Участки удаленного клапана площадью не более 1 см² измельчали и помещали в пробирку с лизирующим матриксом Lysing Matrix D (MP Biomedicals, США), содержащую 900 мкл лизирующего буфера T-PER™ Tissue Protein Extraction Reagent (Thermo Scientific, США), 9 мкл ингибиторов протеаз Halt™ Protease Inhibitor Cocktail (Thermo Scientific, США) и 9 мкл 0,5 М раствора ЭДТА (Thermo Scientific, США) и гомогенизировали на гомогенизаторе FastPrep-24 5G (MP Biomedicals, США) в режиме 4 цикла по 40 секунд каждый с интервалом 300 секунд между ними. Далее образцы центрифугировали в течение 15 минут на 1200 g при 4 °C, надосадочную жидкость переносили в чистую 1,5 мл пробирку. Концентрацию белка измеряли на спектрофотометре Multiskan Sky Microplate Spectrophotometer (Thermo Scientific, США) с использованием набора Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific, США) по протоколу производителя. Уровень экспрессируемых нативными клапанами цитокинов определяли с помощью дот-блоттинга с использованием набора Proteome Profiler™ Human Cytokine Array Kit (ARY005B) (R&D Systems, США) в соответствии с протоколом производителя наборов. Детекцию цитокинов осуществляли на цифровом сканере хемилюминесцентных блотов C-DiGit blot scanner (LI-COR Biosciences, США) в режиме высокой чувствительности (12-минутное сканирование). Полуколичественный анализ цитокинов, секретируемых нативными клапанами сердца, оценивали по площади детектируемых секторов с использованием программы ImageJ (National Institutes of Health, США).

ТАБЛИЦА 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ПАЦИЕНТОВ, ВКЛЮЧЕННЫХ В ИССЛЕДОВАНИЕ

TABLE 1. CLINICAL AND DEMOGRAPHICAL CHARACTERISTICS OF PATIENTS INCLUDED IN THE STUDY

Возраст, лет (M ± SD) Age, years (mean ± SD)		Экспериментальная группа Experimental group (n = 4)	Контрольная группа Control group (n = 10)
		50,7±13,3	52,6±10,1
Пол, n (%) Gender, n (%)	Мужчины Males	1 (25)	3 (30)
	Женщины Females	3 (75)	7 (70)
Локализация нативного клапана, n (%) Location of native heart valve, n (%)	Митральный Mitral	4 (100)	10 (100)
	Аортальный Aortic	0 (0)	0 (0)
	Трикуспидальный Tricuspid	0 (0)	0 (0)
Диагноз, n (%) Diagnosis, n (%)	Инфекционный эндокардит Infective endocarditis	4 (100)	0 (0)
	Ревматическая болезнь сердца Rheumatic heart disease	0 (0)	10 (100)
Этиология Etiology	<i>Streptococcus</i> sp.	4 (100)	0 (0)
	Другие Other	0 (0)	0 (0)

Перед началом выделения РНК все рабочие поверхности и оборудование обрабатывали ингибитором РНКаз RNaseZap™ RNase Decontamination Solution (Invitrogen, США). Участки удаленного клапана площадью не более 1 см² измельчали и помещали в пробирку с лизирующим матриком Lysing Matrix D (MP Biomedicals, США), содержащую 900 мкл лизирующего реагента TRIzol (Invitrogen, США) и гомогенизировали на гомогенизаторе FastPrep-24 5G (MP Biomedicals, США) в режиме 4 цикла по 40 секунд каждый с интервалом 300 секунд между ними. Выделение РНК проводили с помощью коммерческого набора RNeasy® Plus Universal Mini Kit (Qiagen, Германия) в соответствии с протоколом производителя набора. Количество и качество выделенной РНК оценивали с помощью спектрофотометра NanoDrop™ 2000 (Thermo Scientific, США). Целостность РНК определяли на спектрофотометре Qubit 4 (Invitrogen, США). Выделенную РНК хранили при температуре -80 °C.

Комплементарную ДНК (кДНК) синтезировали на основе 100 нг РНК с помощью реакции обратной транскрипции с использованием набора High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, США). Качество синтезиро-

ванной кДНК определяли на спектрофотометре NanoDrop™ 2000 (Thermo Scientific, США). Синтезированную кДНК хранили при температуре -20 °C.

Профиль генной экспрессии оценивали с помощью количественной полимеразной цепной реакции (кПЦР) с использованием SYBR Green зондов (ЗАО «Евроген», Россия) на амплификаторе ViiA7 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, США) (табл. 2). На каждый исследуемый образец готовили 10 мкл реакционной смеси, включающей в себя 5 мкл мастер-микса PowerUp™ SYBR® Green Master Mix (Applied Biosystems, США), по 500 нМ прямого и обратного праймеров и 10 нг кДНК. кПЦР проводили в 96-луночном планшете, включающем в себя анализируемые образцы, пять стандартов с двукратным разведением и отрицательный контроль (реакционная смесь без кДНК). Каждый образец, стандарт и отрицательный контроль анализировался в трех технических повторах. Амплификация проводилась по следующей программе: 2 минуты при 50 °C (1 цикл), 2 минуты при 95 °C (1 цикл), 15 секунд при 95 °C и 1 минута при 60 °C (40 циклов). Результаты кПЦР нормировали с помощью трех референсных генов *ACTB*, *GAPDH*

и *B2M* [32]. Уровень экспрессии генов интереса рассчитывали по методу $2^{-\Delta\Delta C_q}$ и выражали в виде кратности изменения в образцах из экспериментальной группы относительно контроля. Все манипуляции по определению уровня генной экспрессии выполнялись в соответствии с имеющимися рекомендациями [9].

Статистический анализ полученных результатов был выполнен в программе GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, США). Количественные данные выражали в виде медианы (m) и межквартильного размаха (IQR). Различия между группами считали статистически значимыми на уровне $p < 0,05$ (U-тест Манна–Уитни).

Результаты и обсуждение

В результате протеомного профилирования обнаружено, что белки MIF (фактор, ингибирующий миграцию макрофагов), PAI-1 (ингибитор активатора плазминогена-1), ICAM-1 (молекула межклеточной адгезии-1) и CXCL12 (стромальный фактор роста-1) регистрируются в нативных клапанах, полученных и от пациентов с ИЭ, и от пациентов с РБС (рис. 1). В результате полуко-

личественного анализа установлено, что нативные клапаны, полученные от пациентов с ИЭ, характеризуются четырехкратным превышением уровня секреции PAI-1 и двукратным снижением уровня ICAM-1 и CXCL12 в сравнении с контролем. MIF экспрессировался на одинаковом уровне в обеих изученных группах. IL-1ra (антагонист рецептора интерлейкина-1), IL-6 (интерлейкин-6), IL-8 (интерлейкин-8), IL-16 (интерлейкин-16), CCL4 (хемокиновый лиганд-4), CCL5 (хемокиновый лиганд-5) и CXCL1 (хемокиновый лиганд-1) были обнаружены только в клапанах, пораженных ИЭ (рис. 1).

В результате изучения уровня экспрессии генов, кодирующих цитокины, было выделено три группы генов по характеру изменения их экспрессии: (i) гены, экспрессия которых была повышена в экспериментальной группе относительно контроля (*MIF*, *IL6* и *IL8*); (ii) гены, экспрессия которых была понижена в эксперименте относительно контроля (*PAI1*, *IL1RA* и *CXCL1*); (iii) гены, экспрессия которых была одинакова в обеих изученных группах (*ICAM1*, *CXCL12*, *CCL4*, *CCL5* и *IL16*) (табл. 3).

ТАБЛИЦА 2. ХАРАКТЕРИСТИКА ПРАЙМЕРОВ, ИСПОЛЬЗОВАННЫХ В ИССЛЕДОВАНИИ

TABLE 2. CHARACTERISTICS OF PRIMERS USED IN GENE EXPRESSION ANALYSIS

Ген Gene	Прямой праймер Forward primer	Обратный праймер Reverse primer
<i>MIF</i>	5'-GGTGTCCGAGAAGTCAGGCA-3'	5'-GGGGCACGTTGGTGTTCACG-3'
<i>PAI1</i>	5'-CGCCGCCTCTTCCACAAATC-3'	5'-AGGGCAGTTCAGGATGTCG-3'
<i>ICAM1</i>	5'-TTGGGCATAGAGACCCCGTT-3'	5'-GCACATTGCTCAGTTCATACACC-3'
<i>CXCL1</i>	5'-GCTTGCCTCAATCCTGCATCC-3'	5'-ACAATCCAGGTGGCCTCTGC-3'
<i>CXCL12</i>	5'-CAGAGCCAACGTCAAGCATCT-3'	5'-AGTGGGTCCAGCGAAAGTCC-3'
<i>CCL4</i>	5'-ACCGCCTGCTGCTTTTCTTAC-3'	5'-GGATTCACTGGGATCAGCACA-3'
<i>CCL5</i>	5'-CCTCTCCCACAGGTACCATGAA-3'	5'-ATGTAGGCAAAGCAGCAGGGT-3'
<i>IL1RA</i>	5'-GGCTGAAAAGCATAGAGGGAAC-3'	5'-CTGGGCTCACAATCACAGG-3'
<i>IL6</i>	5'-GGCACTGGCAGAAAACAACC-3'	5'-GCAAGTCTCCTCATTGAATCC-3'
<i>IL8</i>	5'-CAGAGACAGCAGAGCACAC-3'	5'-AGTTCTTTAGCACTCCTTGGC-3'
<i>IL16</i>	5'-ATCGGCCCACAGACCAAGTC-3'	5'-CCATCCGAGCCTGCCTCTTA-3'
<i>ACTB</i>	5'-CATCGAGCACGGCATCGTCA-3'	5'-TAGCACAGCCTGGACAGCAAC-3'
<i>GAPDH</i>	5'-AGCCACATCGCTCAGACAC-3'	5'-GCCCAATACGACCAAATCC-3'
<i>B2M</i>	5'-TCCATCCGACATTGAAGTTG-3'	5'-CGGCAGGCATACTCATCTT-3'

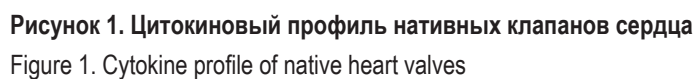


ТАБЛИЦА 3. ПРОФИЛЬ ГЕННОЙ ЭКСПРЕССИИ НАТИВНЫХ КЛАПАНОВ СЕРДЦА (УСЛОВНЫЕ ЕДИНИЦЫ, $m \pm IQR$)

TABLE 3. GENE EXPRESSION PROFILE OF NATIVE HEART VALVES (ARBITRARY UNITS, $m \pm IQR$)

Ген Gene	Экспериментальная группа Experimental group	Контрольная группа Control group	Кратность изменения относительно контроля Fold-change compared to the control
<i>MIF</i>	0,0169 $\pm$ 0,0334*	0,0001 $\pm$ 0,0038	169,00
<i>PAI1</i>	0,0099 $\pm$ 0,01620**	0,0401 $\pm$ 0,0524	0,25
<i>ICAM1</i>	0,0222 $\pm$ 0,0222	0,0242 $\pm$ 0,0149	0,92
<i>CXCL1</i>	0,0050 $\pm$ 0,02570**	0,0103 $\pm$ 0,0152	0,49
<i>CXCL12</i>	0,0087 $\pm$ 0,0142	0,0093 $\pm$ 0,0224	0,93
<i>CCL4</i>	0,0016 $\pm$ 0,0078	0,0012 $\pm$ 0,0066	1,33
<i>CCL5</i>	0,0031 $\pm$ 0,0087	0,0040 $\pm$ 0,0059	0,78
<i>IL1RA</i>	0,0016 $\pm$ 0,0032**	0,0040 $\pm$ 0,0064	0,40
<i>IL6</i>	0,0140 $\pm$ 0,0636*	0,0023 $\pm$ 0,0054	6,09
<i>IL8</i>	0,0487 $\pm$ 0,4209*	0,0050 $\pm$ 0,0279	9,74
<i>IL16</i>	0,0201 $\pm$ 0,0344	0,0158 $\pm$ 0,0436	1,27

Примечание. * – гены с повышенной относительно контроля экспрессией, ** – гены с пониженной относительно контроля экспрессией.

Note. *, upregulated genes compared to the control; **, downregulated genes compared to the control.

В результате проведенного исследования установлено, что нативные клапаны сердца, пораженные ИЭ, характеризуются повышенной экспрессией провоспалительных цитокинов. Данные результаты свидетельствуют о развитии локального иммунного ответа на патогенную бактерию и развитие неспецифического воспаления. Известно, что пациенты с ИЭ и здоровые доноры характеризуются различным профилем секретируемых цитокинов [4, 12, 26]. Макрофаги активно продуцируют провоспалительные цитокины, вовлеченные в воспалительный ответ, в то время как регуляторные и противовоспалительные цитокины контролируют его развитие. Хемокины ответственны за активацию и миграцию лейкоцитов к очагу воспаления, факторы роста активируют или ингибируют пролиферацию клеток. В недавнем исследовании было зарегистрировано повышение концентрации IL-6 и IL-8 в сыворотке крови пациентов с ИЭ в сравнении со здоровыми донорами, а IL-1B обнаруживался только у пациентов с данной патологией [12]. Более того, повышенная концентрация IL-6 и IL-8 ассоциирована с риском летального исхода у пациентов с

ИЭ биологических протезов клапанов сердца [8]. Эффективность иммунного ответа, связанного с риском развития ИЭ, генетически детерминирована: так, генотип G/A гена *IL6* (с.471G>A) и аллель T гена *IL1B* (с.315C>T) ассоциированы с повышенным риском развития данной патологии [15]. Следует отметить, что повышенная экспрессия IL-1B, IL-6 и IL-8 является неспецифическим маркером ИЭ, так как данные цитокины являются белками острой фазы воспаления, активно экспрессируемыми во время развития воспалительного процесса как инфекционной, так и неинфекционной этиологии [29].

Провоспалительный IL-16 представляет собой плейотропный цитокин, оказывающий хемотаксическое действие, главным образом, по отношению к CD4⁺T-клеткам, и играющий важную роль в их привлечении в очаг воспаления с последующей активацией иммунного ответа. Кроме того, IL-16 может активировать секрецию IL-1B, IL-6 и TNF α моноцитами [21, 28]. Таким образом, обнаруженное в нашем эксперименте повышение экспрессии IL-16 в створках нативных клапанов сердца, пораженных ИЭ, может является началь-

ным звеном воспалительного сигналинга, приводящего к развитию локального иммунного ответа на патогенную бактериемию, а также фактором, инициирующим привлечение иммунных клеток к очагу воспаления.

Хемокиновый лиганд-1 (CXCL1) относится к группе CXC хемокинов и играет важную роль в развитии воспалительного процесса в качестве хемоаттрактанта для нейтрофилов [17]. Экспрессия *CXCL1* может регулироваться посредством активации пути NF- κ B [35]. Показано, что стрептококковые глюкозилтрансферазы могут активировать интерстициальные клетки клапанов сердца, что приводит к 16,16-кратному увеличению секреции CXCL1 и 11,3-кратному увеличению экспрессии гена *CCL4* с последующим привлечением нейтрофилов и CD4⁺T-клеток в очаг воспаления [37].

CCL4, ранее известный как воспалительный белок макрофагов (MIP-1 β), представляет собой небольшой хемокин, который продуцируется различными клетками и действует как хемоаттрактант для естественных киллеров (NK), моноцитов и гранулоцитов в месте воспаленной или поврежденной ткани, что может привести к острому нейтрофильному воспалению. Он также индуцирует синтез и высвобождение других провоспалительных цитокинов, таких как IL-1, IL-6 и TNF α фибробластами и макрофагами [22, 23]. Показано, что повышенная экспрессия CCL4 ассоциирована с более высокой смертностью у больных ИЭ [26].

CCL5 является классическим провоспалительным хемокином, рекрутирующим T-клетки, эозинофилы, базофилы, моноциты, NK-клетки, дендритные клетки и тучные клетки к месту воспаления [3]. Кроме того, CCL5 может индуцировать пролиферацию и активацию некоторых NK-клеток с образованием CС-хемокин-активируемых клеток-киллеров [18]. Разнообразие клеток, экспрессирующих и опосредующих эффекты CCL5, указывает на то, что этот хемокин участвует во многих биологических процессах, от контроля над патогенами до стимулирования воспаления при некоторых заболеваниях (например, при раке и атеросклерозе) [20].

IL-1 α является членом семейства цитокинов IL-1, ингибирующим провоспалительный эффект IL-1 α и IL-1 β посредством связывания с рецепторами IL-1 [24]. Нарушение регуляции баланса между IL-1 и IL-1 α является одним из факторов патогенеза различных заболеваний [5]. Показано, что уровень IL-1 α в сыворотке крови повышен у больных с сепсисом, раком, метаболическими и аутоиммунными заболева-

ниями, что может свидетельствовать об отсроченной реакции на повышенную секрецию IL-1. Таким образом, IL-1 α может быть использован как мишень для терапии при длительно действующем и/или чрезмерной воспалительной реакции [24].

Ингибитор активатора плазминогена-1 (PAI1) является одним из основных факторов фибринолитической активности в плазме крови человека. Его продукция эндотелиальными клетками, гепатоцитами и фибробластами может быть повышена в присутствии эндотоксина или ряда цитокинов [7]. PAI1 может подавлять активность активаторов плазминогена тканевого и урокиназного типа и формировать протромботический или гипофибринолитический статус, который может обуславливать системную тромбоэмболию [27]. Септические эмболы из вегетаций на сердечных клапанах являются наиболее частой причиной инсульта у пациентов с ИЭ [29]. Известно, что бактериальные инфекции являются фактором риска системной тромбоэмболии; индуцированные воспалением прокоагулянтные изменения активности тромбоцитов играют важную роль в патогенезе данного осложнения [10]. Более того, PAI1 может контролировать ангиогенез — усиление его экспрессии приводит к подавлению трансформации плазминогена в плазмин и синтеза ангиостатина (ингибитора ангиогенеза) [27, 31]. Было высказано предположение, что ИЭ сопровождается неоваскуляризацией вследствие стимулирования экспрессии ангиогенных факторов клапанами сердца [15, 36]. Таким образом, повышенная концентрация PAI1 в нативных клапанах сердца, эксплантированных от пациентов с ИЭ, может быть объяснена активной неоваскуляризацией клапанов в ответ на бактериемию.

Интересно, что мы обнаружили снижение экспрессии ICAM-1 в нативных клапанах сердца, эксплантированных у пациентов с ИЭ. Известно, что активация эндотелия сопровождается повышением экспрессии молекул адгезии, опосредующих адгезию клеток друг к другу, к внеклеточному матриксу и эндотелиальному монослою [14]. Активация эндотелия вносит значительный вклад в системное воспаление в ответ на патогенную бактериемию. Повышенная концентрация VCAM-1 и ICAM-1 зарегистрирована в плазме крови больных с бактериемией; E-селектин и ICAM-1 также были связаны с полиорганной недостаточностью, септическим шоком и летальным исходом. Было показано, что *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus sanguis* и *Staphylococcus epidermidis* могут служить триггером повышения экспрессии VCAM-1 и

ICAM-1 на поверхности эндотелиальных клеток, что приводит к адгезии моноцитов к эндотелию [33]. Адгезия моноцитов к поверхностям, покрытым ICAM-1, может подавляться с помощью CXCL12 посредством LYN-киназы [19].

Заключение

Результаты проведенного исследования показывают, что нативные клапаны сердца, пораженные ИЭ, характеризуются уникальным цитокиновым профилем по сравнению с клапанами, полученными от пациентов с неинфекционной патологией эндокарда. В пораженных ИЭ нативных клапанах сердца отмечается неспецифическое локальное воспаление, активная

неоваскуляризация и снижение резистентности к патогенной бактериемии. Полученные результаты могут способствовать лучшему пониманию фундаментальных механизмов патогенеза ИЭ и сигнальных путей, лежащих в основе этой патологии.

Соблюдение этических стандартов

Исследование выполнено в соответствии со стандартами надлежащей клинической практики (Good Clinical Practice) и принципами Хельсинкской декларации. Протокол исследования одобрен локальным этическим комитетом ФГБНУ НИИ КПССЗ. До включения в исследование у всех участников получено добровольное письменное информированное согласие.

Список литературы / References

1. Завырылина И.Н., Барбараш Н.А., Начева Л.В. Паразитарные поражения сердца // Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний, 2012. № 2. С.60-63. [Zavyrylina I.N., Barbarash N.A., Nacheva L.V. The parasitic heart lesions. *Kompleksnyye problemy serdechno-sosudistykh zabolevaniy* = *Complex Issues of Cardiovascular Diseases*, 2012, no. 2, pp. 60-63. (In Russ.)]
2. Синицкий М.Ю., Асанов М.А., Тхоренко Б.А., Одаренко Ю.Н., Понасенко А.В. Микрофлора периферической крови пациентов с инфекционным эндокардитом // Клиническая лабораторная диагностика, 2018. Т. 63, № 10. С. 636-640. [Sinitsky M.Y., Asanov M.A., Tkhorenko B.A., Odarenko Y.N., Ponasenko A.V. Microflora of peripheral blood obtained from patients with infective endocarditis. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika* = *Russian Clinical Laboratory Diagnostics*, 2018, Vol. 63, no. 10, pp. 636-640. (In Russ.)]
3. Appay V., Rowland-Jones S.L. RANTES: a versatile and controversial chemokine. *Trends Immunol.*, 2001, Vol. 22, no. 2, pp. 83-87.
4. Araújo I.R., Ferrari T.C., Teixeira-Carvalho A., Campi-Azevedo A.C., Rodrigues L.V., Guimarães Júnior M.H., Barros T.L., Gelape C.L., Sousa G.R., Nunes M.C. Cytokine signature in infective endocarditis. *PLoS One*, 2015, Vol. 10, no. 7, e0133631. doi: 10.1371/journal.pone.0133631.
5. Arend W.P. The balance between IL-1 and IL-1Ra in disease. *Cytokine Growth Factor Rev.*, 2002, Vol. 13, no. 4-5, pp. 323-340.
6. Baddour L.M., Wilson W.R., Bayer A.S., Fowler V.G., Tleyjeh I.M., Rybak M.J., Barsic B., Lockhart P.B., Gewitz M.H., Levison M.E., Bolger A.F., Steckelberg J.M., Baltimore R.S., Fink A.M., O'Gara P., Taubert K.A. Infective endocarditis in adults: diagnosis, antimicrobial therapy, and management of complications: a scientific statement for healthcare professionals from the american heart association. *Circulation*, 2015, Vol. 132, no. 15, pp. 1435-1486.
7. Bone R.C. Modulators of coagulation. A critical appraisal of their role in sepsis. *Arch. Intern. Med.*, 1992, Vol. 152, no. 7, pp. 1381-1389.
8. Bustamante J., Arévalo A., Tamayo E., Sarria C., Aguilar-Blanco E.M., Heredia M., Almansa R., Rico L., Iglesias V., Bermejo-Martin J.F. Cytokine profiles linked to fatal outcome in infective prosthetic valve endocarditis. *APMIS*, 2014, Vol. 122, no. 6, pp. 526-529.
9. Bustin S.A., Benes V., Garson J.A., Hellemans J., Huggett J., Kubista M., Mueller R., Nolan T., Pfaffl M.W., Shipley G.L., Vandesompele J., Wittwer C.T. The MIQE Guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin. Chem.*, 2009, Vol. 55, no. 4, pp. 611-622.
10. Buyukasyk N.S., Ileri M., Alper A., Senen K., Atak R., Hisar I., Yetkin E., Turhan H., Demirkan D. Increased blood coagulation and platelet activation in patients with infective endocarditis and embolic events. *Clin. Cardiol.*, 2004, Vol. 27, no. 3, pp. 154-158.
11. Clark B.C., Krishnan A., McCarter R., Scheel J., Sable C., Beaton A. Using a low-risk population to estimate the specificity of the World Heart Federation criteria for the diagnosis of rheumatic heart disease. *J. Am. Soc. Echocardiogr.*, 2016, Vol. 29, no. 3, pp. 253-258.
12. Diab M., Tasar R., Sponholz C., Lehmann T., Pletz M.W., Bauer M., Brunkhorst F.M., Doenst T. Changes in inflammatory and vasoactive mediator profiles during valvular surgery with or without infective endocarditis: A case control pilot study. *PLoS One*, 2020, Vol. 15, no. 2, e0228286. doi: 10.1371/journal.pone.0228286.

13. Gewitz M.H., Baltimore R.S., Tani L.Y., Sable C.A., Shulman S.T., Carapetis J., Remenyi B., Taubert K.A., Bolger A.F., Beerman L., Mayosi B.M., Beaton A., Pandian N.G., Kaplan E.L. American Heart Association Committee on Rheumatic Fever, Endocarditis, and Kawasaki Disease of the Council on Cardiovascular Disease in the Young, Revision of the Jones criteria for the diagnosis of acute rheumatic fever in the era of doppler echocardiography: a scientific statement from the American Heart Association. *Circulation*, 2015, Vol. 131, no. 20, pp. 1806-1818.
14. Golias C., Batistatou A., Bablekos G., Charalabopoulos A., Peschos D., Mitsopoulos P., Charalabopoulos K. Physiology and pathophysiology of selectins, integrins, and IgSF cell adhesion molecules focusing on inflammation. A paradigm model on infectious endocarditis. *Cell Commun. Adhes.*, 2011, Vol. 18, no. 3, pp. 19-32.
15. Grammer J.B., Eichinger W.B., Bleiziffer S., Benz M.R., Lange R., Bauernschmitt R. Valvular chondromodulin-1 expression is downregulated in a rabbit model of infective endocarditis. *J. Heart Valve Dis.*, 2007, Vol. 16, no. 6, pp. 623-630.
16. Habib G., Lancellotti P., Antunes M.J., Bongiorni M.G., Casalta J.P., Del Zotti F., Dulgheru R., El Khoury G., Erba P.A., Iung B., Miro J.M., Mulder B.J., Plonska-Gosciniak E., Price S., Roos-Hesselink J., Snygg-Martin U., Thuny F., Tornos Mas P., Vilacosta I., Zamorano J.L. ESC Scientific Document Group, 2015 ESC Guidelines for the management of infective endocarditis: the Task Force for the Management of Infective Endocarditis of the European Society of Cardiology (ESC). Endorsed by: European Association for Cardio-Thoracic Surgery (EACTS), the European Association of Nuclear Medicine (EANM). *Eur. Heart J.*, 2015, Vol. 36, no. 44, pp. 3075-3128.
17. Korbecki J., Barczak K., Gutowska I., Chlubek D., Baranowska-Bosiacka I. CXCL1: gene, promoter, regulation of expression, mRNA stability, regulation of activity in the intercellular space. *Int. J. Mol. Sci.*, 2022, Vol. 23, no. 2, 792. doi: 10.3390/ijms23020792.
18. Maghazachi A.A., Al-Aoukaty A., Schall T.J. CC chemokines induce the generation of killer cells from CD56⁺ cells. *Eur. J. Immunol.*, 1996, Vol. 26, no. 2, pp. 315-319.
19. Malik M., Chen Y.Y., Kienzle M.F., Tomkowicz B.E., Collman R.G., Ptasznik A. Monocyte migration and LFA-1-mediated attachment to brain microvascular endothelia is regulated by SDF-1 alpha through Lyn kinase. *J. Immunol.*, 2008, Vol. 181, no. 7, pp. 4632-4637.
20. Marques R.E., Guabiraba R., Russo R.C., Teixeira M.M. Targeting CCL5 in inflammation. *Expert Opin. Ther. Targets*, 2013, Vol. 17, no. 12, pp. 1439-1460.
21. Mathy N.L., Scheuer W., Lanzendörfer M., Honold K., Ambrosius D., Norley S., Kurth R. 2000 Interleukin-16 stimulates the expression and production of pro-inflammatory cytokines by human monocytes. *Immunology*, 2000, Vol. 100, no. 1, pp. 63-69.
22. Maurer M., von Stebut E. Macrophage inflammatory protein-1. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 2004, Vol. 36, no. 10, pp. 1882-1886.
23. Menten P., Wuyts A., Van Damme J. Macrophage inflammatory protein-1. *Cytokine Growth Factor Rev.*, 2002, Vol. 13, no. 6, pp. 455-481.
24. Perrier S., Darakhshan F., Hajduch E. IL-1 receptor antagonist in metabolic diseases: Dr Jekyll or Mr Hyde? *FEBS Lett.*, 2006, Vol. 580, no. 27, pp. 6289-6294.
25. Prendergast B.D., Tornos P. Surgery for infective endocarditis: who and when? *Circulation*, 2010, Vol. 121, no. 9, pp. 1141-1152.
26. Ris T., Teixeira-Carvalho A., Coelho R.M.P., Brandao-de-Resende C., Gomes M.S., Amaral L.R., Pinto P.H.O.M., Santos L.J.S., Salles J.T., Roos-Hesselink J., Verkaik N., Ferrari T.C.A., Nunes M.C.P. Inflammatory biomarkers in infective endocarditis: machine learning to predict mortality. *Clin. Exp. Immunol.*, 2019, Vol. 196, no. 3, pp. 374-382.
27. Sillen M., Declerck P.J. Targeting PAI-1 in cardiovascular disease: structural insights into PAI-1 functionality and inhibition. *Front. Cardiovasc. Med.*, 2020, Vol. 7, 622473. doi: 10.3389/fcvm.2020.622473.
28. Souza V.H., Visentainer J.E.L., Zacarias J.M.V., Alencar J.B., Tsuneto P.Y., Silva C.O., Salmeron S., Colli C.M., Sell A.M. Association of IL16 polymorphisms with periodontitis in Brazilians: A case-control study. *PLoS One*, 2020, Vol. 15, no. 9, e0239101. doi: 10.1371/journal.pone.0239101.
29. Steckelberg J.M., Murphy J.G., Ballard D., Bailey K., Tajik A.J., Taliencio C.P., Giuliani E.R., Wilson W.R. Emboli in infective endocarditis: the prognostic value of echocardiography. *Ann. Intern. Med.*, 1991, vol. 114, no. 8, pp. 635-640.
30. Stewart A.G., Beart P.M. Inflammation: maladies, models, mechanisms and molecules. *Br. J. Pharmacol.*, 2016, Vol. 173, no. 4, pp. 631-634.
31. van Tilborg A.A., Sweep F.C., Geurts-Moespot A.J., Wetzels A.M., de Waal R.M., Westphal J.R., Massuger L.F. Plasminogen activators are involved in angiostatin generation in vivo in benign and malignant ovarian tumor cyst fluids. *Int. J. Oncol.*, 2014, Vol. 44, no. 4, pp. 1394-1400.
32. Vandesompele J., De Preter K., Pattyn F., Poppe B., van Roy N., De Paepe A., Speleman F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.*, 2002, Vol. 3, no. 7, research0034.1. doi: 10.1186/gb-2002-3-7-research0034.

33. Veltrop M.H., Thompson J., Beekhuizen H. Monocytes augment bacterial species- and strain-dependent induction of tissue factor activity in bacterium-infected human vascular endothelial cells. *Infect. Immun.*, 2011, Vol. 69, no. 5, pp. 2797-2807.
34. Weinstock M., Grimm I., Dreier J., Knabbe C., Vollmer T. Genetic variants in genes of the inflammatory response in association with infective endocarditis. *PLoS One*, 2014, Vol. 9, no. 10, e110151. doi: 10.1371/journal.pone.0110151.
35. Wilson C., Purcell C., Seaton A., Oladipo O., Maxwell P.J., O'Sullivan J.M., Wilson R.H., Johnston P.G., Waugh D.J. Chemotherapy-induced CXC-chemokine/CXC-chemokine receptor signaling in metastatic prostate cancer cells confers resistance to oxaliplatin through potentiation of nuclear factor-kappaB transcription and evasion of apoptosis. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 2008, Vol. 327, no. 3, pp. 746-759.
36. Yamauchi R., Tanaka M., Kume N., Minami M., Kawamoto T., Togi K., Shimaoka T., Takahashi S., Yamaguchi J., Nishina T., Kitaichi M., Komeda M., Manabe T., Yonehara S., Kita T. Upregulation of SR-PSOX/CXCL16 and recruitment of CD8⁺ T cells in cardiac valves during inflammatory valvular heart disease. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 2004, Vol. 24, no. 2, pp. 282-287.
37. Yeh C.Y., Shun C.T., Kuo Y.M., Jung C.J., Hsieh S.C., Chiu Y.L., Chen J.W., Hsu R.B., Yang C.J., Chia J.S. Activated human valvular interstitial cells sustain interleukin-17 production to recruit neutrophils in infective endocarditis. *Infect. Immun.*, 2015, Vol. 83, no. 6, pp. 2202-2212.

Авторы:

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

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

Казачек Я.В. — к.м.н., главный фармаколог ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», г. Кемерово, Россия

Евтушенко А.В. — д.м.н., заведующий лабораторией пороков сердца ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», г. Кемерово, Россия

Хуторная М.В. — младший научный сотрудник лаборатории геномной медицины отдела экспериментальной медицины ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», г. Кемерово, Россия

Authors:

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

Sinitsky M. Yu., PhD (Biology), Senior Research Associate, Laboratory of Genomic Medicine, Department of Experimental Medicine, Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases, Kemerovo, Russian Federation

Kazachek Ya.V., PhD (Medicine), Chief Pharmacologist, Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases, Kemerovo, Russian Federation

Evtushenko A.V., PhD, MD (Medicine), Head, Laboratory of Heart Diseases, Department of heart and vascular surgery, Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases, Kemerovo, Russian Federation

Khutornaya M.V., Junior Research Associate, Laboratory of Genomic Medicine, Department of Experimental Medicine, Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases, Kemerovo, Russian Federation

Асанов М.А. — младший научный сотрудник лаборатории геномной медицины отдела экспериментальной медицины ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», г. Кемерово, Россия

Поддубняк А.О. — лаборант-исследователь лаборатории геномной медицины отдела экспериментальной медицины ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», г. Кемерово, Россия

Понасенко А.В. — к.м.н., заведующая лабораторией геномной медицины отдела экспериментальной медицины ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», г. Кемерово, Россия

Asanov M.A., Junior Research Associate, Laboratory of Genomic Medicine, Department of Experimental Medicine, Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases, Kemerovo, Russian Federation

Poddubnyak A.O., Research Laboratory Assistant, Laboratory of Genomic Medicine, Department of Experimental Medicine, Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases, Kemerovo, Russian Federation

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

Поступила 16.05.2023
Отправлена на доработку 26.06.2023
Принята к печати 04.10.2023

Received 16.05.2023
Revision received 26.06.2023
Accepted 04.10.2023

ПРОФИЛЬ ЦИТОКИНОВ ПЛАЗМЫ КРОВИ БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКИМ ВИРУСНЫМ ГЕПАТИТОМ С

Арсентьева Н.А.¹, Бацунов О.К.^{1,2}, Любимова Н.Е.¹, Басина В.В.³,
Эсауленко Е.В.^{1,3}, Тотолян Арег А.^{1,2}

¹ ФБУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера», Санкт-Петербург, Россия

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

³ ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Резюме. Хронический вирусный гепатит С (ХВГС) является одной из важнейших проблем здравоохранения. В большинстве случаев инфицирования вирусом гепатита С, инфекция переходит в хроническую форму, для которой характерно развитие фиброза и цирроза печени. При воспалительных процессах в печени вырабатывается большое количество различных цитокинов и хемокинов, которые способны оказывать как протективное, так и повреждающее действие, в частности приводить к гибели гепатоцитов и прогрессированию фиброза печени. Также в патогенезе ХВГС установлено участие ряда ростовых факторов. Целью исследования стала комплексная оценка широкого спектра цитокинов, хемокинов и ростовых факторов в плазме крови больных ХВГС в зависимости от стадии фиброза печени. В исследование было включено 63 пациента с диагнозом «ХВГС», которых в зависимости от стадии фиброза печени разделили три группы. Контрольную группу составили условно здоровые лица (n = 32). В плазме крови определяли концентрации следующих цитокинов: интерлейкинов и некоторых цитокинов (IL-1 α , IL-1 β , IL-1ra, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-9, IL-10, IL-12 (p40), IL-12 (p70), IL-13, IL-15, IL-17A, IL-17-E/IL-25, IL-17F, IL-18, IL-27, IFN α , IFN γ , TNF α , TNF β); хемокинов (CCL2/MCP-1, CCL3/MIP-1 α , CCL4/MIP-1 β , CCL7/MCP-3, CCL11/Eotaxin, CCL22/MDC, CXCL1/GRO α , CXCL8/IL-8, CXCL9/MIG, CXCL10/IP-10, CX3CL1/Fractalkine) и ростовых факторов (EGF, FGF-2, Flt-3L, G-CSF, M-CSF, PDGF-AA, PDGF-AB/BB, TGF- α , VEGF-A) методом мультиплексного анализа, основанного на xMAP-технологии. Для статистического анализа применяли методы непараметрической статистики. В результате исследования установлены повышенные концентрации цитокинов IL-12 (p40), IL-15, IL-17E/IL-25, IL-27, IFN γ , TNF α , хемокинов CXCL9/MIG и CXCL10/IP-10 и ростовых факторов FGF-2 и M-CSF при всех стадиях фиброза пе-

Адрес для переписки:

Арсентьева Наталья Александровна
ФБУН «Санкт-Петербургский
научно-исследовательский институт эпидемиологии
и микробиологии имени Пастера»
197101, Россия, Санкт-Петербург, ул. Мира, 14.
Тел.: 8 (904) 646-57-58.
E-mail: arsentieva_n.a@bk.ru

Address for correspondence:

Natalia A. Arsentieva
Saint Petersburg Pasteur Institute
14 Mira St
St. Petersburg
197101 Russian Federation
Phone: +7 (904) 646-57-58.
E-mail: arsentieva_n.a@bk.ru

Образец цитирования:

Н.А. Арсентьева, О.К. Бацунов, Н.Е. Любимова,
В.В. Басина, Е.В. Эсауленко, Арег А. Тотолян «Профиль
цитокинов плазмы крови больных хроническим
вирусным гепатитом С» // Медицинская иммунология,
2024. Т. 26, № 6. С. 1235-1248.
doi: 10.15789/1563-0625-CPO-3117

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

For citation:

N.A. Arsentieva, O.K. Batsunov, N.E. Lyubimova,
V.V. Basina, E.V. Esaulenko, Areg A. Totolian "Cytokine
profiling of plasma in patients with viral hepatitis C", *Medical
Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2024,
Vol. 26, no. 6, pp. 1235-1248.
doi: 10.15789/1563-0625-CPO-3117

© Arsentieva N.A. et al., 2024
The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License
DOI: 10.15789/1563-0625-CPO-3117

чени. При тяжелом фиброзе/циррозе печени обнаружены повышенные концентрации цитокинов IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-9, IL-10, IL-17F, IFN α , TNF β , хемокинов CCL2/MCP-1, CCL11/Eotaxin, CCL22/MDC и ростовых факторов G-CSF, TGF- α , Flt-3L. Корреляционный анализ выявил связь высокой степени значимости между тяжестью фиброза печени и содержанием цитокинов IL-6, IFN γ , TNF α , IL-7, хемокинов CCL2/MCP-1, CCL11/Eotaxin, CXCL9/MIG, CXCL10/IP-10, CXCL1/GRO α , ростовых факторов TGF- α , PDGF-AA, PDGF-AB/BB. Таким образом, выявлен определенный профиль цитокинов, характерный для ХВГС, обнаружены цитокины, хемокины и ростовые факторы, значимые для фиброза печени при ХВГС.

Ключевые слова: хронический вирусный гепатит С, цитокины, хемокины, факторы роста, фиброз печени, иммунопатогенез, вирус гепатита С

CYTOKINE PROFILING OF PLASMA IN PATIENTS WITH VIRAL HEPATITIS C

Arsentieva N.A.^a, Batsunov O.K.^{a, b}, Lyubimova N.E.^a, Basina V.V.^c, Esaulenko E.V.^{a, c}, Totolian Areg A.^{a, b}

^a Saint Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation

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

^c St. Petersburg State Pediatric Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Abstract. Chronic hepatitis C (CHC) represents a significant public health concern. In the majority of cases, the infection progresses to a chronic form, which is characterised by the development of fibrosis and cirrhosis of the liver. A plethora of cytokines and chemokines are generated as a consequence of inflammatory processes within the liver. These can exert a dual effect, both protective and damaging, particularly in relation to the death of hepatocytes and the progression of liver fibrosis. Furthermore, a number of growth factors have been identified as playing a role in the pathogenesis of CHC. The objective of the study was a comprehensive evaluation of a wide range of cytokines, chemokines and growth factors in the blood plasma of patients with CHC at varying stages of liver fibrosis. The study cohort comprised 63 patients diagnosed with CHC, who were divided into three groups according to the stage of liver fibrosis. The control group comprised healthy individuals (n = 32). Concentrations of the following cytokines were determined in plasma: Interleukins and some cytokines (IL-1 α , IL-1 β , IL-1 α , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-9, IL-10, IL-12 (p40), IL-12 (p70), IL-13, IL-15, IL-17A, IL-17-E/IL-25, IL-17F, IL-18, IL-27, IFN α , IFN γ , TNF α , TNF β); chemokines (CCL2/MCP-1, CCL3/MIP-1 α , CCL4/MIP-1 β , CCL7/MCP-3, CCL11/Eotaxin, CCL22/MDC, CXCL1/GRO α , CXCL8/IL-8, CXCL9/MIG, CXCL10/IP-10, CX3CL1/Fractalkine) and growth factors (EGF, FGF-2, Flt-3L, G-CSF, M-CSF, PDGF-AA, PDGF-AB/BB, TGF- α , VEGF-A) by multiplex analysis based on xMAP technology. Nonparametric statistics methods were used for statistical analysis. As a result of the study, increased concentrations of cytokines IL-12 (p40), IL-15, IL-17E/IL-25, IL-27, IFN γ , TNF α , chemokines CXCL9/MIG and CXCL-10/IP-10 and growth factors FGF-2 and M-CSF were found at all stages of liver fibrosis. Elevated concentrations of cytokines IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-9, IL-10, IL-17F, IFN α , TNF β , chemokines CCL2/MCP-1, CCL11/Eotaxin, CCL22/MDC and growth factors G-CSF, TGF- α , Flt-3L were found in severe liver fibrosis/cirrhosis. Correlation analysis revealed a relationship of high significance between the severity of liver fibrosis and the content of cytokines IL-6, IFN γ , TNF α , IL-7, chemokines CCL2/MCP-1, CCL11/Eotaxin, CXCL9/MIG, CXCL10/IP-10, CXCL1/GRO α , growth factors TGF- α , PDGF-AA, PDGF-AB/BB. Thus, a certain profile of cytokines characteristic for CHC was revealed, cytokines, chemokines and growth factors significant for liver fibrosis in CHC were found.

Keywords: chronic hepatitis C, cytokines, chemokines, growth factors, liver fibrosis, immunopathogenesis, hepatitis C virus

Введение

Вирусный гепатит С — инфекционное заболевание, которое развивается вследствие инфицирования вирусом гепатита С (ВГС), с преимущественным поражением печени. Вирусный гепатит С относят к социально-значимым инфекционным заболеваниям, по данным ВОЗ в мире около 50 миллионов человек страдают хроническим вирусным гепатитом С (ХВГС), при этом ежегодно регистрируют примерно один миллион новых случаев инфицирования ВГС [6]. Вирусный гепатит С может протекать в острой и хронической форме. Спонтанное выздоровление наступает у 15-45% людей в следствие развития адекватного иммунного ответа при инфицировании ВГС. Однако в большинстве случаев вирус способен избежать иммунного ответа, в результате развивается хроническая инфекция с длительной персистенцией вируса [4, 37].

При хроническом повреждении печени происходит формирование фиброза — динамического процесса замещения здоровых клеток соединительной тканью, при этом существует высокий риск развития цирроза и рака печени. Стоит отметить, что повреждение печени обусловлено не только прямым цитопатическим действием ВГС, но и реализацией реакций иммунного ответа.

Иммунопатогенез ХВГС до сих пор остается не до конца изученным. На ранней стадии вирусной инфекции происходит активация НК-клеток, которые составляют около 30-50% внутрипеченочных лимфоцитов [26]. НК-клетки секретируют цитокины $\text{TNF}\alpha$ и $\text{IFN}\gamma$, способные ингибировать репликацию ВГС, также они обладают прямой цитолитической активностью, которая помимо повреждения инфицированных клеток может вызвать побочное повреждение тканей хозяина. Активация НК-клеток важна для созревания дендритных клеток, которые в свою очередь активируют клетки адаптивного иммунитета: вирусспецифичные Т-хелперы, цитотоксические Т-лимфоциты (ЦТЛ) и В-клетки. Естественные Т-киллеры (НКТ) — еще одна группа клеток врожденного иммунитета, их количество среди внутрипеченочных лимфоцитов составляет около 26%, они также обладают цитотоксической активностью и секретируют $\text{IFN}\gamma$, $\text{TNF}\alpha$ и IL-2 [20]. НКТ-клетки пациентов с ВГС демонстрируют повышенную продукцию IL-13, который представляет собой цитокин Th2, он оказывает воздействие на иммунные клетки, аналогичное действию близкородственного ему цитокина IL-4 [40]. При ХВГС показано повышенное содержание регуляторных Т-клеток (Treg) в крови и печени больных, они играют двойную роль: с одной стороны, Treg способны ослаблять

ЦТЛ в печени и снижать риск повреждения органа, вызванный наличием устойчивого цитотоксического ответа, с другой стороны, они поддерживают персистенцию вируса при ХВГС [33].

Сложные взаимодействия между клетками обеспечиваются благодаря цитокинам, представляющим собой большое семейство информационных молекул. Это многочисленная и универсальная в функциональном отношении группа гуморальных факторов системы иммунитета. Источниками цитокинов могут служить различные клетки, в том числе клетки кроветворной и иммунной систем. Цитокины играют важную роль, как в нормальных, так и в патологических процессах в организме [28, 36]. При воспалительных процессах в печени вырабатывается большое количество различных цитокинов, которые способны оказывать как защитное, так и повреждающее действие, в частности опосредовать гибель гепатоцитов и прогрессирование фиброза печени [34]. Кроме того, цитокины способствуют секреции хемокинов, основной функцией которых является контроль миграции иммунных клеток [17, 49]. Например, лиганды хемокинового рецептора CXCR3: CXCL10/IP-10, CXCL9/MIG, CXCL11/I-TAC ответственны за миграцию лимфоцитов, в частности Т-клеток, реализацию действия которых также связывают с прогрессированием фиброза печени [5, 18]. Семейство цитокинов включает различные ростовые факторы, которые принимают участие в иммунном ответе. Показано, что при ХВГС факторы роста TGF, PDGF совместно с цитокинами IL-6, $\text{TNF}\alpha$ приводят к активации звездчатых клеток печени, миофибробластов и фибробластов, играющих ключевую роль в развитии фиброза печени [46].

Учитывая, что цитокины участвуют во многих процессах, происходящих в печени, которые влияют на течение ХВГС, представляет интерес изучение их содержания у больных, инфицированных ВГС, и их связи с фиброзом печени.

Целью нашей работы стала комплексная оценка широкого спектра цитокинов, хемокинов и ростовых факторов в плазме крови больных ХВГС в ассоциации с фиброзом печени.

Материалы и методы

Пациенты

В исследование было включено 63 пациента (51% мужчин, 49% женщин), проходивших стационарное лечение на кафедре инфекционных болезней взрослых и эпидемиологии ГБОУ ВПО Санкт-Петербургского государственного педиатрического медицинского университета МЗ РФ с диагнозом «хронический вирусный гепатит С». Постановку диагноза, клинический осмотр больных, УЗИ органов брюшной полости,

клинический анализ крови и мочи, биохимическое исследование крови, пункционную биопсию и эластометрию печени осуществляли врачи указанного медицинского учреждения. Диагноз «ХВГС» был подтвержден обнаружением в периферической крови пациентов суммарных антител к ВГС и выявлением РНК вируса в крови. Всем пациентам была проведена пункционная биопсия печени или эластометрия печени. Распределение больных по стадиям заболевания проводилось на основании оценки выраженности фиброза в соответствии со стандартизированной системой METAVIR. В зависимости от степени фиброза печени пациенты были разделены три группы: F0-1 — отсутствие/слабовыраженный фиброз, F2 — умеренный (с порто-портальными септами) и F3-4 — тяжелый (с порто-центральной септами) цирроз. Контрольную группу составили условно здоровые лица ($n = 32$), у которых отсутствовали любые клинико-лабораторные и морфологические признаки поражения печени, а также соматические заболевания.

Материалом исследования служила периферическая кровь. Образцы крови забирали в вакуумные пробирки с антикоагулянтом K_2 ЭДТА, центрифугировали при 350g в течение 10 минут для отделения плазмы. Плазму отбирали в криопробирки, замораживали и хранили при -80°C до проведения анализа.

Все исследования выполнены в соответствии с требованиями Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации «Этические принципы проведения научных и медицинских исследований с участием человека» (с поправками 2008 г.) и нормативными документами «Правила клинической практики в Российской Федерации» (утвержденные Приказом Минздрава РФ № 226 от 19.06.2003 г.) и «Правила надлежащей клинической практики в Российской Федерации» (утвержденные Приказом Минздрава РФ № 200н от 01.04.2016 г.). На проведение данного исследования было получено согласие Локального этического комитета ФБУН «Санкт-Петербургский НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера». От всех пациентов получено добровольное информированное согласие перед включением в исследование.

Анализ цитокинов

В плазме крови определяли концентрации следующих цитокинов: интерлейкинов и некоторых цитокинов (IL-1 α , IL-1 β , IL-1 γ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-9, IL-10, IL-12 (p40), IL-12 (p70), IL-13, IL-15, IL-17A, IL-17-E/IL-25, IL-17F, IL-18, IL-27, IFN α , IFN γ , TNF α , TNF β); хемокинов (CCL2/MCP-1, CCL3/MIP-1 α , CCL4/MIP-1 β , CCL7/MCP-3, CCL11/Eotaxin, CCL22/MDC,

CXCL1/GRO α , CXCL8/IL-8, CXCL9/MIG, CXCL10/IP-10, CX3CL1/Fractalkine) и ростовых факторов (EGF, FGF-2, Flt-3L, G-CSF, M-CSF, PDGF-AA, PDGF-AB/BB, TGF- α , VEGF-A). Исследование проводили методом мультиплексного анализа по технологии xMAP (Luminex, США) с использованием наборов с магнитными частицами Milliplex HCYTA-60K-PX48 (Merck-Millipore) согласно инструкции фирмы-производителя. Регистрацию и анализ данных проводили на приборе Luminex MAGPIX (Luminex, США). Данное исследование выполнено на базе центра коллективного пользования «Цитометрия и биомаркеры» ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера.

Статистическая обработка

Статистическую обработку данных проводили в программе GraphPad Prism6. Поскольку полученные данные не подчинялись нормальному распределению, для анализа выборок использовали методы непараметрической статистики. Для межгрупповых сравнений применяли критерий Краскела–Уоллиса, для корреляционного анализа определяли коэффициент корреляции Спирмена. Достоверными считали различия между группами при $p < 0,05$. Результаты представлены в виде медианы (Me) и межквартильного размаха ($Q_{0,25}$ – $Q_{0,75}$).

Результаты

Оценка концентрации интерлейкинов и некоторых цитокинов, ассоциированных с фиброзом печени, у больных ХВГС

Сравнительный анализ содержания интерлейкинов и цитокинов плазмы крови больных ХВГС с различными стадиями фиброза печени представлен на рисунке 1.

В плазме крови всех групп больных ХВГС выявлены значимо повышенные концентрации IL-12 (p40), IL-15, IL-17E/IL-25, IL-27, IFN γ . Более того, при тяжелом фиброзе/циррозе печени (F4) обнаружены повышенные концентрации цитокинов IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-9, IL-10, IL-17F, IFN α и TNF β . Установлена повышенная концентрация цитокина IL-17A в плазме крови больных ХВГС со стадиями фиброза F0-1 и F3-4. Обращает на себя внимание повышенная концентрация IL-7 в плазме крови больных ХВГС фиброзом печени F0-1 и F2, в то время как концентрация этого цитокина у больных с тяжелым фиброзом/циррозом (F3-4) возвращается к значениям контрольной группы. Выявлено достоверно повышенное содержание IL-7 в плазме крови больных со слабовыраженным фиброзом печени (F0-1) по сравнению с тяжелым фиброзом/циррозом (F3-4), ($p = 0,045$).

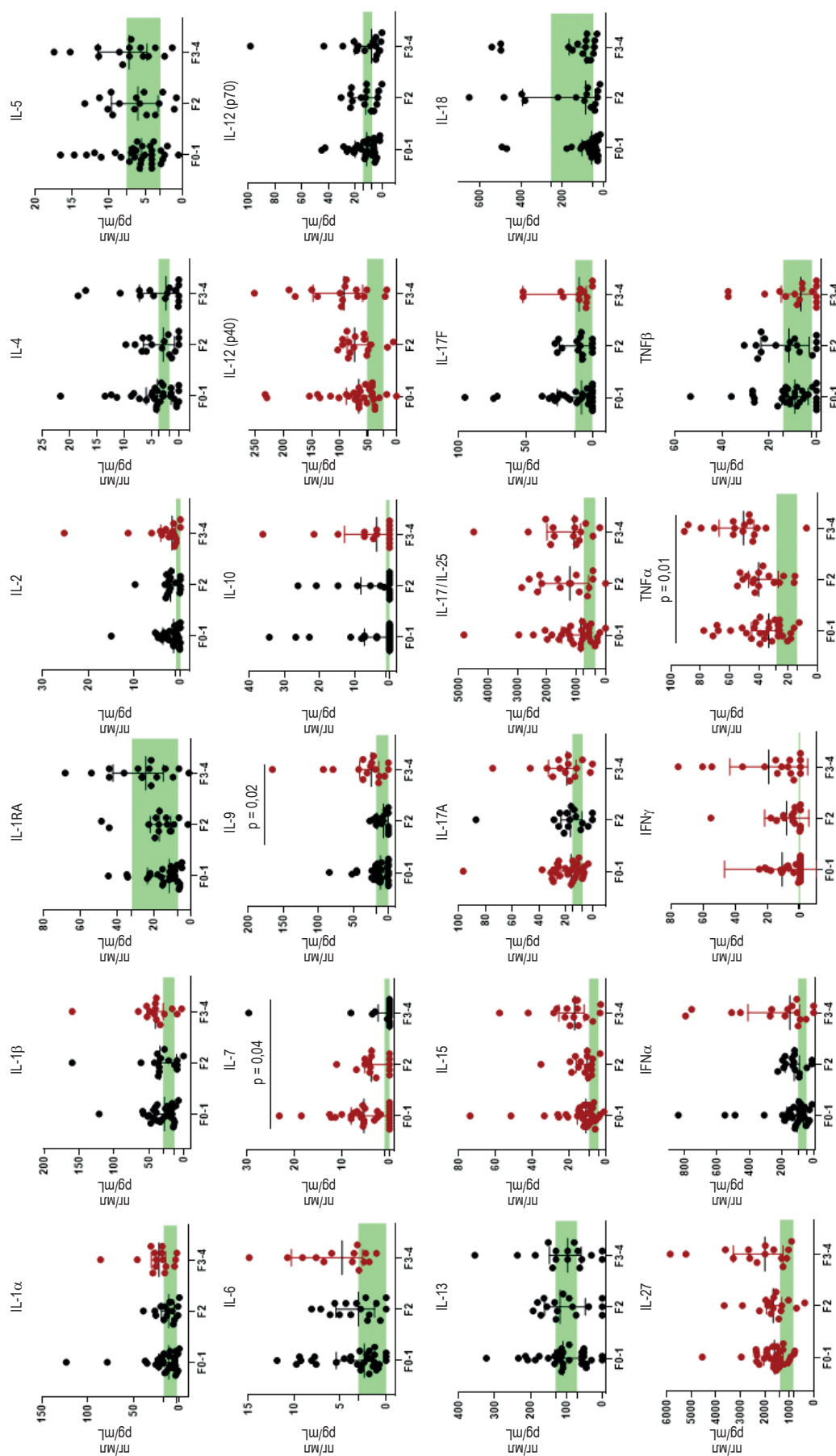


Рисунок 1. Содержание цитокинов в плазме крови больных хроническим вирусным гепатитом С при различной выраженности фиброза печени: F0-1 (n = 31), F2 (n = 16), F3-4 (n = 16)

Примечание. Зеленая горизонтальная полоса обозначает межквартильный интервал (Q_{0.25}-Q_{0.75}) для здоровых доноров (n = 32). Красным цветом выделены группы, которые продемонстрировали статистически значимые различия по сравнению со здоровыми донорами.

Figure 1. Plasma levels of cytokines in chronic hepatitis C patients with different stages of liver fibrosis: F0-1 (n = 31), F2 (n = 16), F3-4 (n = 16)

Note. The green horizontal bar indicates the interquartile range (Q_{0.25}-Q_{0.75}) for healthy donors (n = 32). Groups with statistically significant differences compared to healthy donors are highlighted in red.

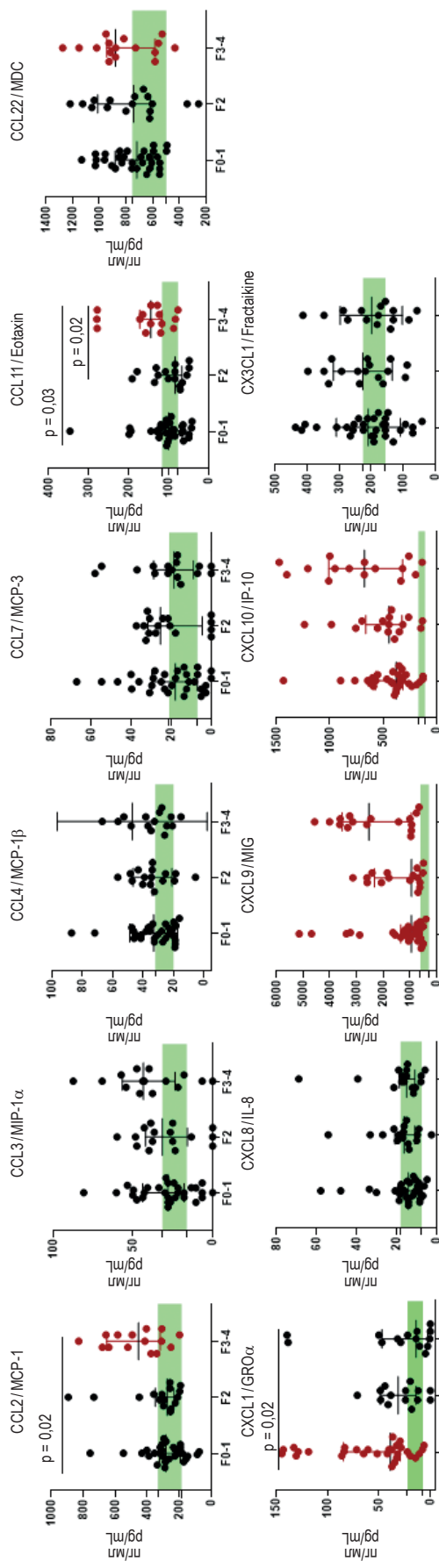


Рисунок 2. Концентрации хемокинов в плазме крови больных хроническим вирусным гепатитом С с различными стадиями фиброза печени: F0-1 (n = 31), F2 (n = 16), F3-4 (n = 16)

Примечание. См. примечание к рисунку 1.

Figure 2. Plasma levels of chemokines in chronic hepatitis C patients with different stages of liver fibrosis: F0-1 (n = 31), F2 (n = 16), F3-4 (n = 16)
Note. As for Figure 1.

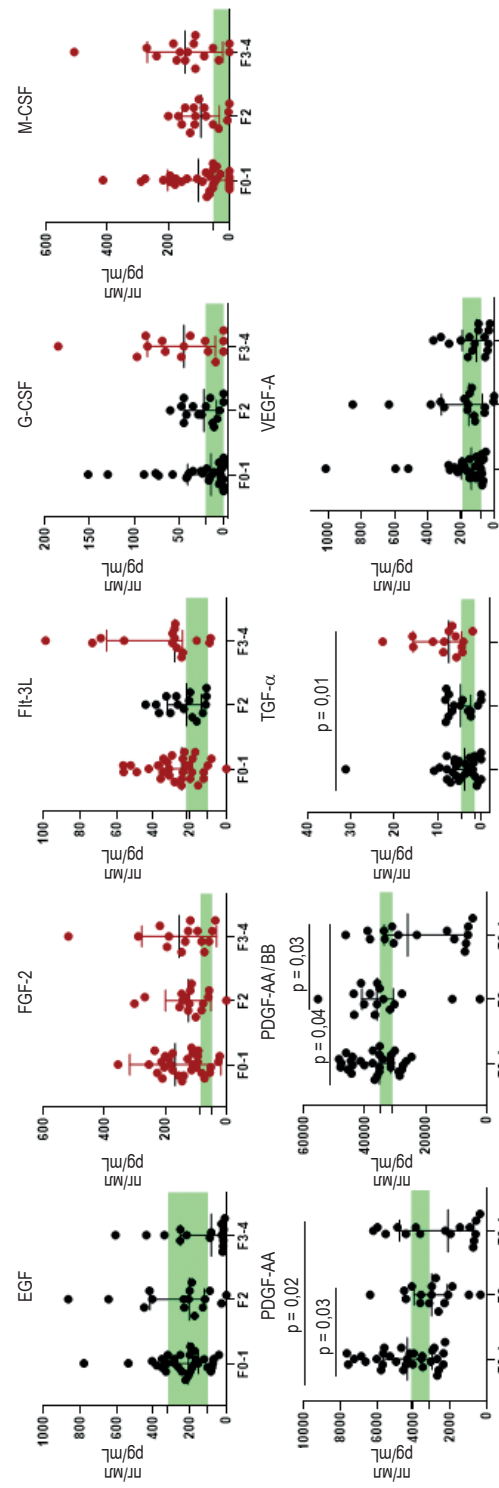


Рисунок 3. Концентрации факторов роста в плазме крови больных хроническим вирусным гепатитом С с различными стадиями фиброза печени: F0-1 (n = 31), F2 (n = 16), F3-4 (n = 16)

Примечание. См. примечание к рисунку 1.

Figure 3. Plasma levels of growth factors in chronic hepatitis C patients with different stages of liver fibrosis: F0-1 (n = 31), F2 (n = 16), F3-4 (n = 16)
Note. As for Figure 1.

Также обнаружены различия в содержании цитокинов между разными стадиями фиброза печени у больных ХВГС. Так, в плазме крови больных с тяжелым фиброзом/циррозом (F3-4) обнаружены достоверно повышенные уровни IL-9 по сравнению с умеренным фиброзом (F2) и TNF α со слабовыраженным фиброзом печени (F0-1) ($p = 0,025$ и $0,047$ соответственно).

Оценка концентрации хемокинов, ассоциированных с фиброзом печени, у больных ХВГС

Результаты определения концентрации хемокинов в плазме крови больных ХВГС с различными стадиями фиброза печени представлены на рисунке 2.

В плазме крови больных ХВГС при всех стадиях фиброза печени выявлено повышенное содержание хемокинов CXCL9/MIG и CXCL10/IP-10. У больных с начальной стадией фиброза печени (F0-1) установлен повышенный уровень CXCL1/GRO α по сравнению с группой контроля и тяжелым фиброзом/циррозом (F3-4), ($p < 0,0001$ и $p = 0,02$ соответственно). При тяжелой степени фиброза печени/циррозе выявлены значимо повышенные концентрации хемокинов CCL2/MCP-1, CCL11/Eotaxin и CCL22/MDC.

Оценка концентрации некоторых ростовых факторов, ассоциированных с фиброзом печени, у больных ХВГС

Сравнительный анализ содержания факторов роста плазмы крови больных ХВГС с различными стадиями фиброза печени представлен на рисунке 3.

В плазме крови больных ХВГС выявлены значимо повышенные концентрации FGF-2 и M-CSF при всех стадиях фиброза печени. При терминальных стадиях фиброза печени (F3-4) обнаружены повышенные концентрации G-CSF, TGF- α , Flt-3L, при этом концентрация Flt-3L была повышенной и при начальной стадии фиброза печени (F0-1). Обращают на себя внимание различия в содержании PDGF: в плазме крови больных с начальной стадией фиброза печени установлен повышенный уровень фактора роста PDGF-AA по сравнению с группой умеренного фиброза и тяжелого фиброза/цирроза ($p = 0,03$ и $p = 0,02$ соответственно); также установлен повышенный уровень фактора роста PDGF-AB/BB при начальном и умеренном фиброзе печени по сравнению с тяжелым фиброзом/циррозом ($p = 0,03$ и $p = 0,004$ соответственно).

Цитокины, хемокины и факторы роста, ассоциированные с тяжестью фиброза печени при ХВГС

Для оценки связи между степенью тяжести фиброза печени при ХВГС и концентрацией исследованных нами цитокинов был применен корреляционный анализ, значимые результаты представлены в таблице 1.

ТАБЛИЦА 1. КОРРЕЛЯЦИОННАЯ ЗАВИСИМОСТЬ МЕЖДУ ТЯЖЕСТЬЮ ФИБРОЗА ПЕЧЕНИ И СОДЕРЖАНИЕМ ЦИТОКИНОВ, ХЕМОКИНОВ И ФАКТОРОВ РОСТА В ПЛАЗМЕ КРОВИ БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКИМ ВИРУСНЫМ ГЕПАТИТОМ С

TABLE 1. CORRELATION OF LIVER FIBROSIS AND THE CONTENT OF CYTOKINES, CHEMOKINES AND GROWTH FACTORS IN THE BLOOD PLASMA IN PATIENTS WITH CHRONIC VIRAL HEPATITIS C

Цитокин Cytokine	r	p
IL-6	0,26	0,043
IL-7	-0,30	0,016
IFN γ	0,28	0,025
TNF α	0,36	0,004
CCL2/MCP-1	0,44	0,0003
CCL11/Eotaxin	0,27	0,036
CXCL1/GRO α	-0,34	0,007
CXCL9/MIG	0,31	0,013
CXCL10/IP-10	0,30	0,017
PDGF-AA	-0,39	0,002
PDGF-AB/BB	-0,35	0,004
TGF- α	0,37	0,003

В процессе корреляционного анализа была выявлена положительная связь высокой степени значимости между тяжестью фиброза печени и содержанием цитокинов: IL-6, IFN γ и TNF α , а также отрицательная корреляционная связь с IL-7.

Установлены положительные корреляционные зависимости тяжести фиброза печени от концентраций хемокинов: CCL2/MCP-1, CCL11/Eotaxin, CXCL9/MIG и CXCL10/IP-10, а также отрицательная связь с CXCL1/GRO α .

Обнаружена положительная связь высокой степени значимости между тяжестью фиброза печени и содержанием TGF- α в плазме крови больных ХВГС и отрицательные связи с ростовыми факторами: PDGF-AA, PDGF-AB/BB.

Таким образом, продемонстрировано, что концентрации цитокинов, хемокинов и факторов роста зависят от стадии фиброза печени при ХВГС. Однако обнаруженные уровни силы связи коэффициентов корреляции являются слабыми и умеренными, что не позволяет сделать однозначный вывод о связи цитокинов и процессов фиброобразования печени при ХВГС.

Обсуждение

Таким образом, выявленный профиль цитокинов, хемокинов и ростовых факторов позволяет уточнить некоторые иммунопатогенетические механизмы ХВГС. У больных ХВГС выявлен повышенный уровень цитокинов Th1: IL-12 (p40), IFN γ , IL-27, цитокинов Th17: IL-17A, IL-17E, IL-17E/IL-25, IL-15 и TNF α . Известно, что IL-15 обладает противовирусной активностью, а также является одним из основных факторов, активирующих NK-клетки, которые в свою очередь секретируют IFN γ . Кроме того, показана сильная корреляция между спонтанным клиренсом ВГС и функцией NK-клеток человека, особенно выработкой ими IFN γ [19]. В экспериментах *in vitro* установлено, что IFN γ и IL-15 блокируют репликацию ВГС [55]. Нами выявлена положительная зависимость между степенью выраженности фиброза печени и концентрацией IFN γ в плазме крови. NK-клетки также являются источником TNF α , обладающим в том числе противовирусными свойствами [38]. В нашем исследовании повышенная концентрация TNF α наблюдается на всех стадиях ХВГС, более того, по мере прогрессирования фиброза печени обнаружено возрастание содержания TNF α . Эти данные подтверждаются нашими более ранними исследованиями [2]. TNF α обладает противоречивыми свойствами: с одной стороны, он способен вызывать гибель гепатоцитов, а с другой — их пролиферацию [48, 56]. Повышенные уровни TNF α в плазме крови также наблюдались другими исследователями даже у пациентов с легким воспалением печени, что указывает на то, что этот цитокин можно использовать в качестве предиктора воспаления печени [11, 41].

Стоит отметить, что при тяжелом фиброзе печени/циррозе нами выявлен повышенный уровень и других провоспалительных цитокинов: IL-1 α , IL-1 β и IL-6. Более того, повышение содержания IL-6 в плазме крови больных ХВГС коррелирует с прогрессированием фиброза печени. Повышенные уровни IL-6 также отмечены другими авторами при ХВГС, циррозе печени и гепатоцеллюлярной карциноме [42, 51]. Положительная корреляция с тяжестью заболевания позволяет предположить, что уровень IL-6 тесно связан с процессами фиброобразования печени, что подтверждается другими исследованиями [12]. Повышение выработки цитокинов свидетельствует об активности, прогрессировании патологического процесса, а дефицит их — об угнетении неспецифической защиты, что также негативно сказывается на течении заболевания [10]. При этом показатели системного воспаления уве-

личиваются при инфекции ВГС, связаны друг с другом и сохраняются после элиминации вируса [50].

IL-2 и IL-9 продуцируются всеми типами Т-клеток, эти цитокины необходимы для их пролиферации. В нашем исследовании показано, что уровни IL-2 и IL-9 были повышенными в плазме крови больных ХВГС с тяжелым фиброзом/циррозом печени. Кроме того, у больных с тяжелым фиброзом/циррозом показан повышенный уровень IL-9 по сравнению с умеренным фиброзом. К семейству IL-2 относят IL-7, он играет важную роль в регуляции гомеостаза и дифференцировке Т-клеток у человека [29]. Основным источником IL-7 являются стромальные клетки костного мозга, лимфатических узлов и эпителиальные клетки тимуса. IL-7 играет важную роль в развитии Т-клеток в тимусе и их выживания путем блокирования аутофагии Т-клеток на периферии [53]. IL-7 способствует активации NK-клеток и секреции IFN γ , а также цитолитической активности NK-клеток [32]. Нами установлен повышенный уровень IL-7 в плазме крови больных ХВГС при слабовыраженном и умеренном фиброзе печени, при этом концентрация IL-7 при тяжелом фиброзе/циррозе печени не отличалась от контрольной группы и была сниженной по сравнению со слабовыраженным фиброзом печени у больных ХВГС. Также обнаружена отрицательная корреляционная связь между содержанием IL-7 и стадией фиброза печени.

IL-10 относят к противовоспалительным цитокинам, поскольку он ингибирует выработку провоспалительных цитокинов и ограничивает активацию и дифференцировку Т-клеток [58]. Основными продуцентами IL-10 являются моноциты, в меньшей степени лимфоциты: Th2 и регуляторные Т-клетки. Нами обнаружен повышенный уровень IL-10 только при тяжелом фиброзе/циррозе печени, аналогичные результаты были получены другими авторами [22], которые предположили, что недостаточный уровень этого цитокина на начальных стадиях заболевания может приводить к персистирующей инфекции. Известно, что структурные белки ВГС могут взаимодействовать с TLR-2 на моноцитах и активировать секрецию IL-10 [52].

Лиганды рецептора CXCR3: CXCL9/MIG и CXCL10/IP-10 являются IFN γ -зависимыми, также их секрецию может активировать TNF α . По мнению многих авторов, именно лиганды CXCR3 являются основными факторами, ответственными за запуск и поддержание воспалительного каскада, характерного для гепатита С [24, 25]. В настоящем исследовании в плазме крови больных ХВГС при всех стадиях фиброза печени выявля-

ны повышенные уровни IFN γ -зависимых хемокинов CXCL9/MIG и CXCL10/IP-10, что подтверждает наши предыдущие результаты [1, 3, 15]. Установлена положительная корреляционная зависимость между концентрациями CXCL9/MIG и CXCL10/IP-10 и степенью фиброза печени. Полученные результаты сопоставимы с данными других авторов, которые полагают, что содержание CXCL10/IP-10 является информативным показателем скорости прогрессирования фиброза печени при ХВГС [14, 16, 27, 59].

При тяжелой степени фиброза печени / циррозе выявлены значимо повышенные концентрации хемокинов CCL2/MCP-1, CCL11/Eotaxin и CCL22/MDC. Показано, что в зависимости от стадии фиброза печени возрастает уровень хемокинов CCL2/MCP-1 и CCL11/Eotaxin. Ранее было установлено, что у пациентов с ХВГС достоверно повышалось содержание мРНК CCL2/MCP-1 в ткани печени по мере прогрессирования заболевания [7, 8]. Содержание мРНК CCL2/MCP-1 в биоптате находилось в прямой зависимости от гистологических изменений. Таким образом, проведенное исследование демонстрирует, что прогрессирование ХВГС реализуется через местную активацию синтеза CCL2/MCP-1, что в дальнейшем приводит к присоединению системной реакции.

У больных со слабовыраженным фиброзом печени обнаружена повышенная концентрация хемокина CXCL1/GRO α . Его продуцируют моноциты и нейтрофилы, CXCL1/GRO α взаимодействует с рецептором CXCR2, который экспрессирован на нейтрофилах [30]. Кроме того, CXCL1/GRO α могут продуцировать гепатоциты и звездчатые клетки печени, при стимуляции IL-1 α , TNF или IL-17 [47]. Показано, что антигены ВГС core и NS3 способны активировать передачу сигнала через TLR2, и индуцировать секрецию CXCL1/GRO α в моноцитах из цельной крови [43]. Нами выявлено повышенное содержание CXCL1/GRO α в плазме крови больных со слабовыраженным фиброзом печени по сравнению с тяжелым фиброзом/циррозом и установлена отрицательная корреляция с фиброзом печени. Подобные результаты описаны одной исследовательской группой: связь степени фиброза печени со снижением уровня CXCL1/GRO α в плазме крови больных ХВГС [31]. С другой стороны, в печени больных ХВГС с тяжелым фиброзом были зарегистрированы повышенные уровни мРНК CXCL1/GRO α [21]. Также на моделях мышей повышение уровней CXCL1/GRO α в печени совпадает с началом фиброза печени [23]. Можно предположить, что концентрации CXCL1/GRO α в плазме крови отражает хемокиновый градиент,

благоприятствующий миграции нейтрофилов, экспрессирующих CXCR2, из печени на ранних стадиях фиброза и в печень у пациентов с более тяжелым фиброзом.

В плазме крови больных ХВГС выявлено значимое превышение контрольных значений концентрации FGF-2 и M-CSF при всех стадиях фиброза печени. Факторы роста фибробластов — FGFs являются митогенами широкого спектра действия и регулируют многие клеточные функции, включая миграцию, пролиферацию, дифференцировку и выживание клеток [57]. FGF-2 известен как основной фактор роста фибробластов, также он участвует в противовирусном иммунном ответе, а также при восстановлении тканей во время вирусной инфекции [39]. На большой выборке пациентов показано, что высокие уровни FGF-2 связаны со спонтанным выздоровлением после инфицирования ВГС. FGF-2 является провоспалительным фактором, его повышенные уровни в сыворотке крови ранее были описаны у пациентов с ХВГС, особенно у пациентов с высокой вирусной нагрузкой [45]. Отмечено, что уровни FGF-2 в сыворотке пациентов с ХВГС, имеющих цирроз печени или гепатоцеллюлярную карциному, были значительно выше, чем у здоровых добровольцев [54]. Кроме того, концентрация FGF-2 возрастала при прогрессировании фиброза печени [9]. FGF-2 может играть важную вирусспецифическую роль, в том числе посредством регуляции иммунного ответа [39].

Одними из основных регуляторов фиброгенеза являются макрофаги, благодаря своей способности контролировать воспаление, участвовать в удалении клеточного детрита и модулировать функциональную активность фибробластов [13]. Макрофагальный колониестимулирующий фактор — M-CSF в печени индуцирует дифференцировку моноцитов в профибротические макрофаги. При этом методом иммуногистохимии выявлена интенсивная экспрессия M-CSF гепатоцитами вокруг очагов поражений печени. Кроме того, инфекция ВГС и воспалительные цитокины усиливают выработку гепатоцитами *in vitro* M-CSF [44]. Таким образом, повышенный уровень M-CSF в плазме крови больных ХВГС может являться неблагоприятным фактором прогрессирования фиброза печени.

При тяжелом фиброзе/циррозе печени обнаружены повышенные концентрации ростовых факторов G-CSF, TGF- α , Flt-3L. Выявлена прямая корреляция между концентрацией TGF- α и степенью фиброза печени.

Несмотря на то, что мы не обнаружили достоверных различий в содержании фактора роста тромбоцитов — PDGF в плазме крови больных

ХВГС и здоровых доноров, этот фактор заслуживает особого внимания. Среди цитокинов PDGF является наиболее мощным фактором, участвующим в стимуляции пролиферации, дифференцировки и миграции звездчатых клеток печени [35]. PDGF дополнительно способствует выработке и отложению коллагена и превращает звездчатые клетки печени в миофибробласты. Блокирование передачи сигналов PDGF ингибирует пролиферацию звездчатых клеток и способствует фиброзированию печени. В нашем исследовании показано, что концентрации PDGF-AA и PDGF-AB/BB в плазме крови больных при слабовыраженном фиброзе печени, повышенные по сравнению с умеренным фиброзом и тяжелым фиброзом/циррозом, таким образом по мере прогрессирования фиброза печени концентрации этих факторов снижаются, что подтверждают данные корреляционного анализа.

Заключение

Цитокины играют важную роль в иммунной защите человека от ВГС, но они также участвуют в повреждении печени, наблюдаемом у большинства хронически инфицированных пациентов. Персистирующая инфекция изменяет баланс между различными цитокинами, что приводит

к длительному воспалению, некрозу, фиброзу и хроническому заболеванию печени. В настоящем исследовании проведен анализ широкого спектра цитокинов, хемокинов и ростовых факторов в плазме крови больных ХВГС в зависимости от стадии фиброза печени. При всех стадиях фиброза печени обнаружены повышенные концентрации цитокинов IL-12 (p40), IL-15, IL-17E/IL-25, IL-27, IFN γ , TNF α , хемокинов CXCL9/MIG и CXCL10/IP-10 и ростовых факторов FGF-2 и M-CSF. При тяжелом фиброзе/циррозе печени обнаружены повышенные концентрации цитокинов IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-9, IL-10, IL-17F, IFN α , TNF β и хемокинов CCL2/MCP-1, CCL11/Eotaxin, CCL22/MDC и ростовых факторов G-CSF, TGF- α , Flt-3L. Выявлены различия в содержании цитокинов в зависимости от стадии фиброза печени у больных ХВГС. Корреляционный анализ выявил связь высокой степени значимости между тяжестью фиброза печени и содержанием некоторых цитокинов, хемокинов и ростовых факторов в плазме крови больных ХВГС. Таким образом, выявлен определенный профиль цитокинов, характерный для ХВГС, обнаружены цитокины, хемокины и ростовые факторы, значимые для различных стадий фиброза печени при ХВГС.

Список литературы / References

1. Арсентьева Н.А., Семенов А.В., Жебрун Д.А., Васильева Е.В., Тотолян А.А. Роль хемокинового рецептора CXCR3 и его лигандов при некоторых иммунопатологических состояниях // Медицинская иммунология, 2019. Т. 21, № 4. С. 617-632. [Arsentieva N.A., Semenov A.V., Zhebrun D.A., Vasilyeva E.V., Totolian A.A. Role of CXCR3 chemokine receptor and its ligands in certain diseases. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2019, Vol. 21, no. 4, pp. 617-632. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2019-4-617-632.
2. Арсентьева Н.А., Семенов А.В., Любимова Н.Е., Басина В.В., Эсауленко Е.В., Козлов К.В., Жданов К.В., Тотолян А.А. Содержание цитокинов и хемокинов в плазме крови больных вирусным гепатитом С // Российский иммунологический журнал, 2015. Т. 18, № 1. С. 80-89. [Arsentieva N.A., Semenov A.V., Lyubimova N.E., Basina V.V., Esaulenko E.V., Kozlov K.V., Zhdanov K.V., Totolian A.A. Contents cytokines and chemokines in blood plasma of patients with chronic viral hepatitis C. *Rossiyskiy immunologicheskii zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2015, Vol. 18, no. 1, pp. 80-89. (In Russ.)]
3. Арсентьева Н.А., Семенов А.В., Любимова Н.Е., Останкова Ю.В., Елезов Д.С., Тотолян А.А. Хемокиновые рецепторы CXCR3 и CCR6 и их лиганды в печени и крови больных хроническим вирусным гепатитом С // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины, 2015. Т. 160, № 8. С. 218-222. [Arsentieva N.A., Semenov A.V., Lyubimova N.E., Ostankova Y.V., Elezov D.S., Totolian A.A., Kudryavtsev I.V., Basina V.V., Esaulenko E.V., Kozlov K.V., Zhdanov K.V. Chemokine receptors CXCR3 and CCR6 and their ligands in the liver and blood of patients with chronic hepatitis C. *Byulleten eksperimentalnoy biologii i meditsiny = Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 2015, Vol. 160, no. 8, pp. 218-222. (In Russ.)]
4. Арсентьева Н.А., Семенов А.В., Тотолян А.А. Роль полиморфизма генов цитокинов при вирусном гепатите С // Инфекция и иммунитет, 2012. Т. 2, № 4. С. 687-698. [Arsentieva N.A., Semenov A.V., Totolian A.A. The role of cytokine genes polymorphism C virus infection. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2012, Vol. 2, no. 4, pp. 687-698. (In Russ.)] doi: 10.15789/2220-7619-2012-4-687-698.
5. Басина В.В., Арсентьева Н.А., Бацунов О.К., Любимова Н.Е., Семенов А.В., Эсауленко Е.В., Тотолян А.А. Особенности экспрессии хемокиновых рецепторов CXCR3 и CCR6 и их лигандов в периферической крови больных хроническим гепатитом С во время проведения противовирусной терапии с использованием пегилированных интерферонов // Медицинская иммунология, 2019. Т. 21, № 1. С. 107-120. [Basina V.V., Arsentieva N.A., Batsunov O.K., Lyubimova N.E., Semenov A.V., Esaulenko E.V., Totolian A.A. Expression patterns

of chemokine receptors CXCR3 and CCR6, and their ligands in peripheral blood of patients with chronic hepatitis C during antiviral therapy using pegylated interferons. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2019, Vol. 21, no. 1, pp. 107-120. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2019-1-107-120.

6. Гепатит С. Всемирная организация здравоохранения. [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://www.who.int/ru/news-room/fact-sheets/detail/hepatitis-c>. [Hepatitis C. World Health Organization]. [Electronic resource]. Access mode: <https://www.who.int/ru/news-room/fact-sheets/detail/hepatitis-c>.

7. Жданов К.В., Гусев Д.А., Чирский В.С., Сысоев К.А., Якубовская Л.А., Шахианов Д.М., Тотолян А.А. Хроническая HCV-инфекция и экспрессия мРНК СС-хемокинов и их рецепторов // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии, 2008. № 4. С. 73-77. [Zhdanov K.V., Gusev D.A., Chirsky V.S., Syssoev K.A., Yakubovskaya L.A., Shakhianov D.M., Totolyan A.A. Chronic HCV infection and expression of mRNA of CC chemokines and their receptors. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*, 2008, no. 4, pp. 73-77. (In Russ.)]

8. Жданов К.В., Гусев Д.А., Чирский В.С., Сысоев К.А., Якубовская Л.А., Шахманов Д.М., Тотолян А.А. Экспрессия хемокинов и их рецепторов в крови и ткани печени при хроническом гепатите С // Медицинская иммунология, 2007. Т. 9, № 4-5. С. 379-388. [Zhdanov K.V., Gussev D.A., Chirskiy V.S., Syssoev K.A., Yakubovskaya L.A., Shakhmanov D.M., Totolian A.A. Chemokines and their receptors expression in blood and liver tissue in chronic hepatitis C. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2007, Vol. 9, no. 4-5, pp. 379-388. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2007-4-5-379-388.

9. Ивкова А.Н., Ильченко Л. Ю., Кушлинский Н.Е., Петренко Н.В., Сторожаков Г.И. Факторы роста в оценке фиброза печени у больных хроническим гепатитом С // Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология, 2008. № 5. С. 42-46. [Ivkova A.N., Ilchenko L.Y., Kushlinsky N.E., Petrenko N.V., Storozhakov G.I. Growth factors in the assessment of liver fibrosis in patients with chronic hepatitis C. *Eksperimentalnaya i klinicheskaya gastroenterologiya = Experimental and Clinical Gastroenterology*, 2008, no. 5, pp. 42-46. (In Russ.)]

10. Кляритская И.Л., Стилиди Е.И. Роль различных цитокинов в фиброгенезе печени при хронических вирусных гепатитах В и С // Крымский терапевтический журнал, 2010. № 1. С. 41-45. [Klyarytskaya I.L., Stilidi E.I. The role of various cytokines in the liver fibrogenesis in chronic viral hepatitis B and C. *Krymskiy terapevticheskiy zhurnal = Crimean Journal of Internal Diseases*, 2010, no. 1, pp. 41-45. (In Russ.)]

11. Кляритская И.Л., Стилиди Е.И. Сывороточные цитокины как маркеры фиброза печени и предикторы эффективности противовирусной терапии при хроническом гепатите С // Крымский терапевтический журнал, 2013. № 1. С. 95-100. [Klyarytskaya I.L., Stilidi E.I. Serum cytokines as markers of liver fibrosis and predictors of antiviral therapy efficiency in chronic hepatitis C. *Krymskiy terapevticheskiy zhurnal = Crimean Journal of Internal Diseases*, 2013, no. 1, pp. 95-100. (In Russ.)]

12. Коротчаева Ю.В., Самоходская Л.М., Сперанский А.И., Козловская Л.В., Гордовская Н.Б., Павленко А.В., Мухин Н.А., Ткачук В.А. Прогностическое значение определения Ил-6 в сыворотке крови и цитохрома Р450 в ткани печени у больных хроническим гепатитом С // Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии, 2008. Т. 18, № 2. С. 42-47. [Korotchayeva Yu.V., Samokhodskaya L.M., Speransky A.I., Kozlovskaya L.V., Gordovskaya M.B., Pavlenko A.V., Mukhin N.A., Tkachuk V.A. Prognostic value of il-6 in blood serum and cytochrome P450 in liver tissue in patients with chronic hepatitis C. *Rossiyskiy zhurnal gastroenterologii, gepatologii, koloproktologii = Russian Journal of Gastroenterology, Hepatology, Coloproctology*, 2008, Vol. 18, no. 2, pp. 42-47. (In Russ.)]

13. Максимова А.А., Шевела Е.Я., Сахно Л.В., Тихонова М.А., Останин А.А., Черных Е.Р. М-CSF и GM-CSF детерминируют фибромодулирующую активность поляризованных макрофагов человека // Медицинская иммунология, 2022. Т. 24, № 5. С. 931-942. [Maksimova A.A., Shevela E.Ya., Sakhno L.V., Tikhonova M.A., Ostanin A.A., Chernykh E.R. M-CSF and GM-CSF determinate fibromodulatory activity of polarized human macrophages. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2022, Vol. 24, no. 5, pp. 931-942. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-MCA-2525.

14. Притулина Ю.Г., Прокопенко С.Е. Иммунологические аспекты терапии хронического гепатита С // Вестник новых медицинских технологий. Электронное издание, 2021. № 1. С. 47-52. Режим доступа: <https://cyberleninka.ru/article/n/immunologicheskie-aspekty-terapii-hronicheskogo-gepatita-s>. [Pritulina Yu.G., Prokopenko S.E. Immunological aspects of treatment of chronic hepatitis C. *Vestnik novykh meditsinskikh tekhnologiy. Elektronnoe izdanie = Journal of New Medical Technologies, e-edition*. 2021, no. 1, pp. 47-52. (In Russ.)] Access mode: <https://cyberleninka.ru/article/n/immunologicheskie-aspekty-terapii-hronicheskogo-gepatita-s>.

15. Семенов А.В., Арсентьева Н.А., Елезов Д.С., Кудрявцев И.В., Эсауленко Е.В., Тотолян А.А. Особенности популяционного состава CXCR3-положительных лимфоцитов периферической крови больных хроническим вирусным гепатитом С // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии, 2013. № 6. С. 69-76. [Semenov A.V., Arsentieva N.A., Elezov D.S., Kudryavtsev I.V., Esaulenko E.V., Totolyan A.A. Features of population composition of peripheral blood CXCR3-positive lymphocytes in chronic viral hepatitis C patients. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*, 2013, no. 5, pp. 69-76. (In Russ.)]

16. Семенов А.В., Арсентьева Н.А., Любимова Н.Е., Тюленев С.В., Басина В.В., Эсауленко Е.В., Тотолян А.А. Роль цитокинов и хемокинов в лабораторной диагностике хронического вирусного гепатита С // Клиническая лабораторная диагностика, 2015. Т. 60, № 8. С. 45-51. [Semenov A.V., Arsentieva N.A., Lubimova N.E., Tulienev S.V., Basina V.V., Esaulenko E.V., Totolyan A.A. The role of cytokines and chemokines in laboratory diagnostic of chronic viral hepatitis C. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika = Russian Clinical Laboratory Diagnostics*, 2015, Vol. 60, no. 8, pp. 45-51. (In Russ.)]
17. Сысоев К.А., Чухловин А.Б., Тотолян А.А. Диагностическая роль определения хемокинов и их рецепторов при хроническом С // Клиническая лабораторная диагностика, 2013. № 2. С. 23-29. [Sysoyev K.A., Tchukhlovin A.B., Totolyan A.A. The diagnostic role of chemokines and their receptors under chronic hepatitis C. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika = Russian Clinical Laboratory Diagnostics*, 2013, no. 2, pp. 23-29. (In Russ.)]
18. Сысоев К.А., Чухловин А.Б., Шахманов Д.М., Жданов К.В., Тотолян А.А. Профиль цитокинов и хемокинов в плазме крови пациентов с хроническим гепатитом С // Инфекция и иммунитет, 2013. Т. 3, № 1. С. 49-58. [Sysoyev K.A., Chukhlovin A.V., Shakhmanov D.M., Zhdanov K.V., Totolian A.A. Cytokines and chemokines in the blood plasma of patients with chronic hepatitis C. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2013, Vol. 3, no. 1, pp. 49-58. (In Russ.)]
19. Ahlenstiel G. The Natural Killer Cell Response to HCV Infection. *Immune Netw.*, 2013, Vol. 13, no. 5, pp. 168-176.
20. Ahmad A., Alvarez F. Role of NK and NKT cells in the immunopathogenesis of HCV-induced hepatitis. *J. Leukoc. Boil.*, 2004, Vol. 76, no. 4, pp. 743-759.
21. Asselah T., Bièche I., Laurendeau I., Paradis V., Vidaud D., Degott C., Martinot M., Bedossa P., Valla D., Vidaud M., Marcellin P. Liver gene expression signature of mild fibrosis in patients with chronic hepatitis C. *Gastroenterology*, 2005, Vol. 129, no. 6, pp. 2064-2075.
22. Bruno C.M., Valenti M., Bertino G., Ardiri A., Amoroso A., Consolo M., Mazzarino C.M., Neri S. Relationship between circulating interleukin-10 and histological features in patients with chronic C hepatitis. *Ann. Saudi. Med.*, 2011, Vol. 31, no. 4, pp. 360-364.
23. Burke M.L., McManus D.P., Ramm G.A., Duke M., Li Y., Jones M.K., Gobert G.N. Temporal expression of chemokines dictates the hepatic inflammatory infiltrate in a murine model of schistosomiasis. *PLoS Negl. Trop. Dis.*, 2010, Vol. 4, no. 2, e598. doi: 10.1371/journal.pntd.0000598.
24. Butera D., Marukian S., Iwamaye A.E., Hembrador E., Chambers T.J., Di Bisceglie A.M., Charles E.D., Talal A.H., Jacobson I.M., Rice C.M., Dustin L.B. Plasma chemokine levels correlate with the outcome of antiviral therapy in patients with hepatitis C. *Blood*, 2005, Vol. 106, no. 4, pp. 1175-1182.
25. Casrouge A., Decalf J., Ahloulay M., Lababidi C., Mansour H., Vallet-Pichard A., Mallet V., Mottez E., Mapes J., Fontanet A., Pol S., Albert M.L. Evidence for an antagonist form of the chemokine CXCL10 in patients chronically infected with HCV. *J. Clin. Invest.*, 2011, Vol. 121, no. 1, pp. 308-317.
26. Corado J., Toro F., Rivera H., Bianco N.E., Deibis L., De Sanctis J.B. Impairment of natural killer (NK) cytotoxic activity in hepatitis C virus (HCV) infection. *Clin. Exp. Immunol.*, 1997, Vol. 109, no. 3, pp. 451-457.
27. Elia G., Fallahi P. Hepatocellular carcinoma and CXCR3 chemokines: a narrative review. *Clin. Ter.*, 2017, Vol. 168, no. 1, pp. e37-e41.
28. Falasca K., Ucciferri C., Dalessandro M., Zingariello P., Mancino P., Petrarca C., Pizzigallo E., Conti P., Vecchiet J. Cytokine patterns correlate with liver damage in patients with chronic hepatitis B and C. *Ann. Clin. Lab. Sci.*, 2006, Vol. 36, no. 2, pp. 44-50.
29. Fry T.J., Connick E., Falloon J., Lederman M.M., Liewehr D.J., Spritzler J., Steinberg S.M., Wood L.V., Yarchoan R., Zuckerman J., Landay A., Mackall C.L. A potential role for interleukin-7 in T-cell homeostasis. *Blood*, 2001, Vol. 97, no. 10, pp. 2983-2990.
30. Haskill S., Peace A., Morris J., Sporn S.A., Anisowicz A., Lee S.W., Smith T., Martin G., Ralph P., Sager R. Identification of three related human GRO genes encoding cytokine functions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1990, Vol. 87, pp. 7732-7736.
31. Johansson S., Talloen W., Tuefferd M., Darling J.M., Scholliers A., Fanning G., Fried M.W., Aerssens J. Plasma levels of growth-related oncogene (CXCL1-3) associated with fibrosis and platelet counts in HCV-infected patients. *Aliment. Pharmacol. Ther.*, 2015, Vol. 42, no. 9, pp. 1111-1121.
32. Judge C.J., Kostadinova L., Sherman K.E., Butt A.A., Falck-Ytter Y., Funderburg N.T., Landay A.L., Lederman M.M., Sieg S.F., Sandberg J.K., Anthony D.D. CD56bright NK IL-7R α expression negatively associates with HCV level, and IL-7-induced NK function is impaired during HCV and HIV infections. *J. Leukoc. Biol.*, 2017, Vol. 102, no. 1, pp. 171-184.
33. Keynan Y., Card C.M., McLaren P.J., Dawood M.R., Kasper K., Fowke K.R. The role of regulatory T cells in chronic and acute viral infections. *Clin. Infect. Dis.*, 2008, Vol. 46, no. 7, pp. 1046-1052.
34. Khan S., Bhargava A., Pathak N., Maudar K.K., Varshney S., Mishra P.K. Circulating biomarkers and their possible role in pathogenesis of chronic hepatitis B and C viral infections. *Indian J. Clin. Biochem.*, 2011, Vol. 26, no. 2, pp. 161-168.

35. Kocabayoglu P., Lade A., Lee Y.A., Dragomir A.C., Sun X., Fiel M.I., Thung S., Aloman C., Soriano P., Hoshida Y., Friedman S.L. β -PDGF receptor expressed by hepatic stellate cells regulates fibrosis in murine liver injury, but not carcinogenesis. *J. Hepatol.*, 2015, Vol. 63, pp. 141-147.
36. Larrubia J.R., Benito-Martínez S., Miquel-Plaza J., Sanz-de-Villalobos E., González-Mateos F., Parra T. Cytokines – their pathogenic and therapeutic role in chronic viral hepatitis. *Rev. Esp. Enferm. Dig.*, 2009, Vol. 101, no. 5, pp. 343-351.
37. Lauer G.M., Walker B.D. Hepatitis C virus infection. *N. Engl. J. Med.*, 2001, Vol. 345, no. 1, pp. 41-52.
38. Lee S.H., Miyagi T., Biron C.A. Keeping NK cells in highly regulated antiviral warfare. *Trends Immunol.*, 2007, Vol. 28, no. 6, pp. 252-259.
39. Lottini G., Plicanti E., Lai M., Quaranta P., Pistello M., Freer G. Canonical fibroblast growth factors in viral infection. *Rev. Med. Virol.*, 2023, Vol. 33, no. 4, e2452. doi: 10.1002/rmv.2452.
40. Minty A., Chalon P., Derocq J.M., Dumont X., Guillemot J.C., Kaghad M. Interleukin-13 is a new human lymphokine regulating inflammatory and immune responses. *Nature*, 1993, Vol. 362, no. 6417, pp. 248-250.
41. Moura A.S., Carmo R.A., Teixeira A.L., da Costa Rocha M.O. Soluble inflammatory markers as predictors of hepatocellular damage and therapeutic response in chronic hepatitis C. *Braz. J. Infect. Dis.*, 2009, Vol. 13, pp. 375-382.
42. Mourtzikou A., Alepakia M., Stamoulic M., Pouliakisa A., Sklirisc A., Karakitsos P. Evaluation of serum levels of IL-6, TNF- α , IL-10, IL-2 and IL-4 in patients with chronic hepatitis. *Immunologia*, 2014, Vol. 33, no. 16, pp. 41-50.
43. Nischalke H.D., Berger C., Luda C., Müller T., Berg T., Coenen M., Krämer B., Körner C., Trebicka J., Grünhage F., Lammert F., Nattermann J., Sauerbruch T., Spengler U. The CXCL1 rs4074 A allele is associated with enhanced CXCL1 responses to TLR2 ligands and predisposes to cirrhosis in HCV genotype 1-infected Caucasian patients. *J. Hepatol.*, 2012, Vol. 56, no. 4, pp. 758-764.
44. Preisser L., Miot C., Le Guillou-Guillemette H., Beaumont E., Foucher E.D., Garo E., Blanchard S., Frémaux I., Croué A., Fouchard I., Lunel-Fabiani F., Boursier J., Roingeard P., Calès P., Delneste Y., Jeannin P. IL-34 and macrophage colony-stimulating factor are overexpressed in hepatitis C virus fibrosis and induce profibrotic macrophages that promote collagen synthesis by hepatic stellate cells. *Hepatology*, 2014, Vol. 60, no. 6, pp. 1879-1890.
45. Radkowski M., Grabarczyk P., Kryczka T., Caraballo Cortès K., Kubicka-Russel D., Janiak M., Osuch S., Perlejewski K., Laskus T. Cytokine profile and viral diversity in the early seronegative stage of community-acquired hepatitis C virus (HCV) infection. *Sci. Rep.*, 2023, Vol. 13, no. 1, 20045. doi: 10.1038/s41598-023-47335-x.
46. Ramadori G., Saile B. Inflammation, damage repair, immune cells, and liver fibrosis: specific or nonspecific, this is the question. *Gastroenterology*, 2004, Vol. 127, no. 3, pp. 997-1000.
47. Rowell D.L., Eckmann L., Dwinell M.B., Carpenter S.P., Raucy J.L., Yang S.K., Kagnoff M.F. Human hepatocytes express an array of proinflammatory cytokines after agonist stimulation or bacterial invasion. *Am. J. Physiol.*, 1997, Vol. 273, pp. 322-332.
48. Schwabe R.F., Brenner D.A. Mechanisms of liver injury: TNF- α -induced liver injury: role of IKK, JNK, ROS pathways. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, 2006, Vol. 290, pp. G583-G589.
49. Shields P.L., Morland C.M., Salmon M., Qin S., Hubscher S.G., Adams D.H. Chemokine and chemokine receptor interactions provide a mechanism for selective T cell recruitment to specific liver compartments within hepatitis C-infected liver. *J. Immunol.*, 1999, Vol. 163, no. 11, pp. 6236-6243.
50. Shive C.L., Kowal C.M., Desotelle A.F., Nguyen Y., Carbone S., Kostadinova L., Davitkov P., O'Mara M., Reihls A., Siddiqui H., Wilson B.M., Anthony D.D. Endotoxemia associated with liver disease correlates with systemic inflammation and T-cell exhaustion in hepatitis C virus infection. *Cells*, 2023, Vol. 12, no. 16, 2034. doi: 10.3390/cells12162034.
51. Soresi M., Giannitrapani L., D'Antona F., Florena A.M., La Spada E., Terranova A., Cervello M., d'Alessandro N., Montalto G. Interleukin-6 and its soluble receptor in patients with liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *World J. Gastroenterol.*, 2006, Vol. 12, no. 16, pp. 2563256-2563258.
52. Szabo G., Dolganiuc A. Subversion of plasmacytoid and myeloid dendritic cell functions in chronic HCV infection. *Immunobiology*, 2005, Vol. 210, no. 2-4, pp. 237-247.
53. Tan J.T., Dudl E., LeRoy E., Murray R., Sprent J., Weinberg K.I., Surh C.D. IL-7 is critical for homeostatic proliferation and survival of naive T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2001, Vol. 98, no. 15, pp. 8732-8737.
54. Tsunematsu H., Tatsumi T., Kohga K., Yamamoto M., Aketa H., Miyagi T., Hosui A., Hiramatsu N., Kanto T., Hayashi N., Takehara T. Fibroblast growth factor-2 enhances NK sensitivity of hepatocellular carcinoma cells. *Int. J. Cancer*, 2012, Vol. 130, no. 2, pp. 356-364.
55. Vahedi F., Lee A.J., Collins S.E., Chew M.V., Lusty E., Chen B., Dubey A., Richards C.D., Feld J.J., Russell R.S., Mossman K.L., Ashkar A.A. IL-15 and IFN- γ signal through the ERK pathway to inhibit HCV replication, independent of type I IFN signaling. *Cytokine*, 2019, Vol. 124, 154439. doi: 10.1016/j.cyt.2018.06.006.
56. Wullaert A., van Loo G., Heyninck K., Beyaert R. Hepatic TNF signaling and NF- κ B: effects on liver homeostasis and beyond. *Endocr. Rev.*, 2007, Vol. 28, no. 4, pp. 365-386.

57. Xie Y., Su N., Yang J., Tan Q., Huang S., Jin M., Ni Z., Zhang B., Zhang D., Luo F., Chen H., Sun X., Feng J.Q., Qi H., Chen L. FGF/FGFR signaling in health and disease. *Signal Transduct. Target. Ther.*, 2020, Vol. 5, no. 1, 181. doi: 10.1038/s41392-020-00222-7.

58. Zdanov A. Structural features of the interleukin-10 family of cytokines. *Curr. Pharm. Des.*, 2004, Vol. 10, no. 31, pp. 3873-3884.

59. Zeremski M., Petrovic L.M., Talal A.H. The role of chemokines as inflammatory mediators in chronic hepatitis C virus infection. *J. Viral. Hepat.*, 2007, Vol. 14, no. 10, pp. 675-687.

Авторы:

Арсентьева Н.А. — к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории молекулярной иммунологии ФБУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера», Санкт-Петербург, Россия

Бацунов О.К. — младший научный сотрудник лаборатории молекулярной иммунологии ФБУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера»; ассистент кафедры иммунологии ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Любимова Н.Е. — к.б.н., научный сотрудник лаборатории молекулярной иммунологии ФБУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера», Санкт-Петербург, Россия

Басина В.В. — к.м.н., доцент кафедры инфекционных болезней взрослых и эпидемиологии ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Есауленко Е.В. — д.м.н., профессор, заведующая лабораторией вирусных гепатитов ФБУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера»; заведующая кафедрой инфекционных болезней взрослых и эпидемиологии ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Тотolian Арег А. — д.м.н., профессор, академик РАН, директор ФБУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера»; заведующий кафедрой иммунологии ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Authors:

Arsentieva N.A., PhD (Biology), Senior Research Associate, Laboratory of Molecular Immunology, Saint Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation

Batsunov O.K., Junior Research Associate, Laboratory of Molecular Immunology, Saint Petersburg Pasteur Institute; Assistant Professor, Department of Immunology, First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Lyubimova N.E., PhD (Biology), Research Associate, Laboratory of Molecular Immunology, Saint Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation

Basina V.V., PhD (Medicine), Associate Professor, Department of Infectious Diseases of Adults and Epidemiology, St. Petersburg State Pediatric Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Esaulevskiy E.V., PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Laboratory of Viral Hepatitis, Saint Petersburg Pasteur Institute; Head, Department of Infectious Diseases of Adults and Epidemiology, St. Petersburg State Pediatric Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Totolian Areg A., PhD, MD (Medicine), Full Member, Russian Academy of Science, Director, Saint Petersburg Pasteur Institute; Head, Department of Immunology, First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

ИССЛЕДОВАНИЕ АССОЦИАЦИИ ПОЛИМОРФНЫХ МАРКЕРОВ В ГЕНАХ *IL33* И *IL37* С РИСКОМ РАЗВИТИЯ АТОПИЧЕСКОГО ДЕРМАТИТА

Свитич О.А.^{1,2}, Олисова О.Ю.², Потапова М.Б.¹, Меремьянина Е.А.^{1,3},
Рассказова Н.Д.¹, Белокопытова Е.А.¹, Солодкова А.А.¹,
Мурзина А.А.¹, Семенова И.Б.¹, Упатова А.Г.¹

¹ ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова», Москва, Россия

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

³ ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования», Москва, Россия

Резюме. Атопический дерматит (АтД) является хроническим рецидивирующим воспалительным заболеванием, которое сопровождается сильным зудом. Ведущим механизмом развития АтД является изменение соотношения иммунного ответа Th1/Th2-клеток, что приводит к повышению синтеза медиаторов воспаления, в том числе цитокинов семейства IL-1. В данное семейство входят открытые относительно недавно IL-33 и IL-37, роль которых активно изучается в патогенезе АтД. IL-33 является эндогенным сигналом опасности и за счет индукции выработки IL-31 вызывает снижение функции кожного барьера, зуд и расчесывание. Обладающий как иммуномодулирующим, так и иммуносупрессивным действием IL-37 снижает степень инфильтрации очага воспаления лейкоцитами и активность провоспалительных цитокинов, а также участвует в регуляции транскрипции ДНК. Целью исследования был поиск ассоциации полиморфных маркеров в генах *IL33* и *IL37* с риском развития АтД. В исследование были включены 98 пациентов с установленным диагнозом АтД, из которых 59 человек имели среднюю и 39 — тяжелую степень тяжести по шкале SCORAD. Контрольная группа состояла из 72 здоровых добровольцев. Материалом исследования была венозная кровь. Для анализа полиморфных маркеров rs7019575 в гене *IL33*, rs3811046 и rs3811047 в гене *IL37* проводилось выделение РНК и постановка ПЦР-РВ. При распределении по частотам аллелей и генотипов полиморфных маркеров rs7019575 в гене *IL33* и rs3811047 в гене *IL37* статистически значимых отличий не выявлено. Исследование полиморфного маркера rs3811046 в гене *IL37* показало, что риск развития АтД уменьшается почти в 2 раза у носителей аллеля G и увеличивается более чем в 2 раза у носителей гомозиготы TT. Анализ распределения по гаплотипам в гене *IL37* показал, что у носителей гаплотипа GTAA риск

Адрес для переписки:

Потапова Мария Борисовна
ФГБНУ «Научно-исследовательский институт
вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова»
105064, Россия, Москва, Малый Казенный пер., 5а.
Тел.: 8 (929) 927-52-35.
E-mail: ptpv.msh@gmail.com

Address for correspondence:

Maria B. Potapova
I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera
5a Malyi Kazenniy Lane
Moscow
105064 Russian Federation
Phone: +7 (929) 927-52-35.
E-mail: ptpv.msh@gmail.com

Образец цитирования:

О.А. Свитич, О.Ю. Олисова, М.Б. Потапова,
Е.А. Меремьянина, Н.Д. Рассказова,
Е.А. Белокопытова, А.А. Солодкова, А.А. Мурзина,
И.Б. Семенова, А.Г. Упатова «Исследование
ассоциации полиморфных маркеров в генах *IL33* и
IL37 с риском развития атопического дерматита»
// Медицинская иммунология, 2024. Т. 26, № 6.
С. 1249-1256.
doi: 10.15789/1563-0625-ABP-2936

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

For citation:

O.A. Svitich, O.Yu. Olishova, M.B. Potapova,
E.A. Meremianina, N.D. Rasskazova, E.A. Belokopytova,
A.A. Solodkova, A.A. Murzina, I.B. Semenova, A.G. Upatova
“Association between polymorphisms of *IL33* and *IL37*
and atopic dermatitis”, *Medical Immunology (Russia)/*
Meditsinskaya Immunologiya, 2024, Vol. 26, no. 6,
pp. 1249-1256.
doi: 10.15789/1563-0625-ABP-2936

© Svitich O.A. et al., 2024
The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License
DOI: 10.15789/1563-0625-ABP-2936

развития АтД увеличивается примерно в 10 раз, а у носителей гаплотипа TTGG — увеличивается более чем в 2 раза. Таким образом, в результате проведенного исследования выявлены SNP-маркеры, которые могут быть использованы при прогнозировании риска развития патологии у лиц с отягощенным семейным анамнезом по atopическому дерматиту.

Ключевые слова: atopический дерматит, TLR, SNP, маркер, atopические заболевания, врожденный иммунитет

ASSOCIATION BETWEEN POLYMORPHISMS OF *IL33* AND *IL37* AND ATOPIC DERMATITIS

Svitich O.A.^{a, b}, Olisova O.Yu.^b, Potapova M.B.^a, Meremianina E.A.^{a, c},
Rasskazova N.D.^a, Belokopytova E.A.^a, Solodkova A.A.^a, Murzina A.A.^a,
Semenova I.B.^a, Upatova A.G.^a

^a I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation

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

^c Russian Medical Academy of Continuous Professional Education, Moscow, Russian Federation

Abstract. Atopic dermatitis (AD) is a chronic recurrent inflammatory disease accompanied by severe itching. One of the leading mechanisms underlying the development of AD is an imbalance of the Th1/Th2 cells immune response, which leads to an increased production of inflammatory mediators, including IL-1 family. The IL-1 family includes the recently discovered IL-33 and IL-37, and their role in the pathogenesis of AD has been actively studied. IL-33 functions as an alarmin that can induce IL-31 production, thereby leading to skin barrier impairment, pruritus and scratching. Having both immunomodulatory and immunosuppressive properties, IL-37 suppresses leukocyte infiltration of the affected skin and reduces the activity of proinflammatory cytokines. The aim of our study was to search for associations between gene polymorphisms of *IL33*, *IL37* genes, and risk of AD.

A total of 98 patients with moderate and severe AD were included in the study. The control group included 72 healthy volunteers. Polymorphic markers were determined in peripheral blood. After extraction of total RNA, polymorphic markers rs7019575 in the *IL33* gene, rs3811046 and rs3811047 in the *IL37* gene were analyzed using RT-PCR. There was no statistically significant difference in allele frequency and genotype distribution of rs7019575 (*IL33*) and rs3811047 (*IL37*). Studying the rs3811046 polymorphic marker in the *IL37* gene showed that the risk of AD was almost 2 times lower for the G allele carriers and more than 2-fold higher for TT homozygous carriers. The haplotype analysis revealed that the GTAA and TTGG haplotypes of *IL37* were associated with AD, thus increasing the risk of AD development by 2 and 10 times, respectively. In conclusion, SNP markers identified in this study can be used to predict the risk of AD development in the subjects with a positive family history of atopical diseases.

Keywords: atopical dermatitis, TLR, SNP, marker, atopical diseases, innate immunity

Введение

Атопический дерматит (АтД) — хроническое рецидивирующее воспалительное заболевание, характеризующееся дефектом кожного барьера и выраженным зудом [7]. АтД является одним из наиболее распространенных заболеваний, составляя от 20% до 40% в структуре всех дерматологических патологий [20]. Согласно показателям шкалы дерматологического индекса качества жизни (The Dermatology Life Quality Index) симптомы заболевания негативно сказываются на профессиональной деятельности и взаимоотношениях с близкими людьми, ограничивая социальную активность. Кроме того, кожный зуд

может привести к нарушению сна, оказывая влияние на качество жизни пациента [6].

В основе патогенеза АтД лежит дисбаланс Th1/Th2-иммунного ответа с вовлечением иммунных клеток (макрофагов, кератиноцитов, тучных и дендритных клеток, эозинофилов и др.) [2]. Для АтД характерно развитие Th2-опосредованного иммунного ответа, которое сопровождается повышением уровней IL-4, IL-13 и других медиаторов воспаления. Основными последствиями усиления выработки цитокинов Th2-профиля являются подавление выработки инволюкрина и лорикрина в пораженных участках кожи и увеличение количества *Staphylococcus aureus* за счет ингибирования выработки анти-микробных пептидов [4].

В последнее десятилетие активно изучается роль IL-33 и IL-37 в патогенезе различных воспалительных заболеваний, включая АД. Оба цитокина являются представителями семейства IL-1 и способствуют реализации защитных функций с участием различных факторов врожденного иммунитета [13, 14].

IL-33 экспрессируется многими клетками организма [8]. Увеличение его экспрессии отмечается при механическом повреждении тканей, некрозе и апоптозе клеток, в результате чего цитокин выделяется в межклеточное пространство [15]. Высвобожденный IL-33 взаимодействует с иммунными клетками, участвуя в запуске реакций Th2-типа. Таким образом, внеклеточный IL-33 выступает в роли эндогенного сигнала опасности или алармина [1, 3].

Было показано, что при АД IL-33 способствует индукции выработки IL-31, вызывая тем самым снижение барьерной функции кожи и зуд. При этом расчесывание вследствие зуда приводит к нарушению целостности кожного барьера, способствуя разрушению кератиноцитов и высвобождению IL-33 [14]. Таким образом, возникает порочный круг.

IL-37 является еще одним представителем семейства IL-1, известный ранее как IL-1F7. В отличие от большинства цитокинов данного семейства, IL-37 обладает в основном иммуносупрессивным действием, которое проявляется уменьшением инфильтрации очагов воспалительного процесса эозинофилами и нейтрофилами, а также в подавлении провоспалительных цитокинов [9].

В человеческом организме IL-37 представлен в пяти формах (IL-37a-e), полученных в результате альтернативного сплайсинга, из которых IL-37b является наиболее распространенной изоформой, продуцируемой моноцитами, кератиноцитами и другими клетками [10].

Из-за противодействующего влияния IL-33 и IL-37 при развитии воспалительного процесса изучение этих цитокинов часто проводится одновременно [11, 13, 16]. В настоящее время перспективным направлением исследований является анализ однонуклеотидных полиморфизмов (SNP) при атопическом дерматите. Поиск полиморфных маркеров и их ассоциации с риском развития патологии позволяет не только расширить понимание о патогенетических механизмах развития изучаемого заболевания, но и использовать их в качестве предикторов в группе людей с отягощенным семейным анамнезом в отношении атопического дерматита. Поэтому **целью нашего исследования** было изучить ассоциацию полиморфных маркеров rs7019575 в гене *IL33*, а также rs3811046 и rs3811047 в гене *IL37* с риском развития АД у взрослых.

Материалы и методы

Набор пациентов осуществлялся на базе клиники кожных и венерических болезней им. Рахманинова Сеченовского университета. Количество пациентов с атопическим дерматитом составило 98 человек в возрасте от 18 до 65 лет. Диагноз «атопический дерматит» был поставлен с учетом международных диагностических критериев Hanifin J.M. и Rajka G. [5]. Оценка степени тяжести заболевания осуществлялась при поступлении в стационар с использованием шкалы SCORAD (SCORing Atopic Dermatitis), согласно которой у 59 пациентов была средняя и у 39 — тяжелая степень тяжести [5]. Контрольная группа состояла из 72 добровольцев с неотягощенным анамнезом в отношении атопического дерматита и аллергических заболеваний. Возраст участников группы также варьировал от 18 до 65 лет.

Материалом для лабораторного исследования являлась венозная кровь. При заборе были использованы вакуумные пробирки с ЭДТА объемом 4 мл (VACUETTE® TUBE 4 mL K3E K3EDTA, Greiner Bio-One). Дальнейшая работа с образцами проводилась на базе ФГБНУ «НИИВС им. И.И. Мечникова». На первом этапе из крови проводилось выделение РНК с использованием набора для выделения нуклеиновых кислот AmpliPRIME RIBO-sorb («АмплиСенс», Россия), и затем производилась постановка ПЦР-РВ с использованием использованием компонентов из набора SYBR Green I RT-PCR (ООО «НПФ Синтол», Россия) на детектирующем амплификаторе DTrprime 5 (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия). В ходе исследования проводился анализ полиморфных маркеров: rs7019575, rs3811046 и rs3811047. Статистическая обработка данных была осуществлена с использованием критерия χ^2 . При этом критерием достоверности являлось значение $p < 0,05$.

Результаты

На первом этапе в работе проводилось исследование ассоциаций полиморфных маркеров rs7019575 в гене *IL33*, rs3811046 и rs3811047 в гене *IL37*. В исследовании было показано, что полиморфный маркер rs7019575 в гене *IL33* не показал статистически значимых различий в распределении аллелей и генотипов. Анализ показал, что частота встречаемости аллеля G составила 0,655 в группе с АД и 0,664 в контрольной выборке, а частота встречаемости аллеля С — 0,345 и 0,336 соответственно. В группе с АД гомозигота GG встречалась с частотой 0,402, гомозигота CC — 0,093, гетерозигота — 0,505. Распределение генотипов в контрольной выборке составило 0,448, 0,119 и 0,433 соответственно. Полученные значения представлены в таблицах 1 и 2.

ТАБЛИЦА 1. РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ЧАСТОТ АЛЛЕЛЕЙ В ИЗУЧАЕМЫХ ГЕНАХ И РЕЗУЛЬТАТ АНАЛИЗА ИХ АССОЦИАЦИЙ С АтД

TABLE 1. DISTRIBUTION OF ALLELE FREQUENCIES IN PATIENTS WITH AD AND HEALTHY CONTROLS

SNPs	Аллели Alleles	Частота встречаемости Frequency of occurrence		OR (95% CI)	p value
		АтД Atopic dermatitis	Контрольная группа Control group		
rs7019575 (<i>IL33</i>)	G	0,655	0,664	0,96 (0,60-1,53)	p > 0,05
	C	0,345	0,336		
rs3811046 (<i>IL37</i>)	G	0,245	0,375	0,54 (0,33-0,87)	p < 0,05
	T	0,755	0,625		
rs3811047 (<i>IL37</i>)	A	0,321	0,287	1,18 (0,73-1,90)	p > 0,05
	G	0,679	0,713		

ТАБЛИЦА 2. РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ЧАСТОТ ГЕНОТИПОВ В ИЗУЧАЕМЫХ ГЕНАХ И РЕЗУЛЬТАТ АНАЛИЗА ИХ АССОЦИАЦИЙ С АтД

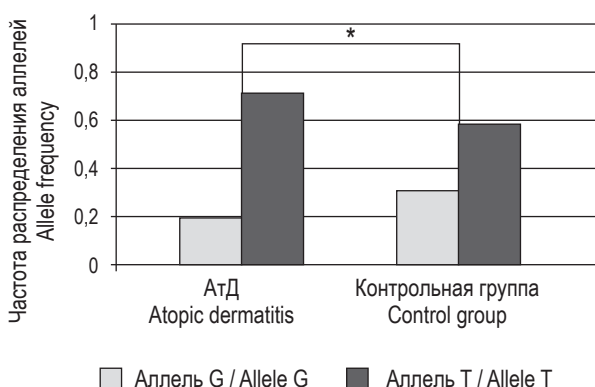
TABLE 2. DISTRIBUTION OF GENOTYPE FREQUENCIES IN PATIENTS WITH AD AND HEALTHY CONTROLS

SNPs	Генотипы Genotypes	Частота встречаемости Frequency of occurrence		OR (95% CI)	p value
		АтД Atopic dermatitis	Контрольная группа Control group		
rs7019575 (<i>IL33</i>)	GG	0,402	0,448	0,83 (0,44-1,56)	p > 0,05
	GC	0,505	0,433	1,34 (0,72-2,50)	p > 0,05
	CC	0,093	0,119	0,75 (0,28-22,07)	p > 0,05
rs3811046 (<i>IL37</i>)	GG	0,000	0,059	–	p > 0,05
	GT	0,490	0,632	0,56 (0,30-1,05)	p > 0,05
	TT	0,510	0,309	2,33 (1,22-4,48)	p < 0,05
rs3811047 (<i>IL37</i>)	AA	0,137	0,074	2,00 (0,68-5,90)	p > 0,05
	AG	0,368	0,426	0,78 (0,42-1,48)	p > 0,05
	GG	0,495	0,500	0,98 (0,53-1,83)	p > 0,05

При изучении полиморфного маркера rs3811046 в гене *IL37* было показано, что аллель Т встречался чаще ($p < 0,05$) в группе с АтД (частота встречаемости – 0,755) по сравнению с контрольной выборкой (0,625). Частота аллеля G составила 0,245 и 0,375 соответственно ($p < 0,05$). Риск развития АтД у носителей аллеля G был меньше в 2 раза ($OR = 0,54$; $95\% CI = 0,33-0,87$) (табл. 1

и рис. 1). В группе с АтД гомозигота ТТ встречалась с частотой 0,510, гетерозигота – 0,490, гомозигота GG не встречалась, в это время частоты распределения генотипов в контрольной группе составили 0,309, 0,632 и 0,059 соответственно. При этом было выявлено, что риск развития АтД увеличивается более чем в 2 раза у носителей го-

А (А)



Б (В)

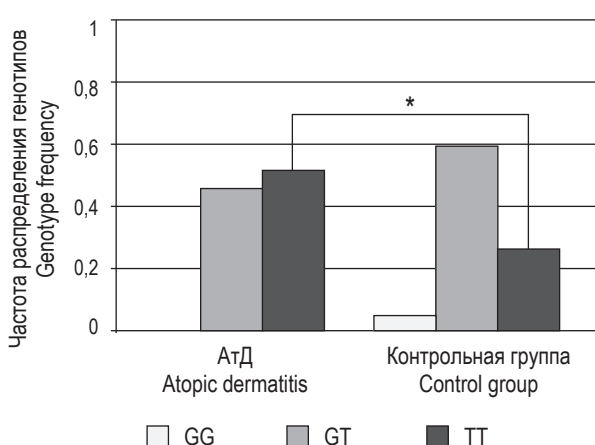


Рисунок 1. Распределение частот аллелей (А) и генотипов (Б) полиморфного маркера rs3811046 в гене *IL37* в группе с АтД и контрольной группе

Примечание. * – $p < 0,05$.

Figure 1. Frequency distribution of alleles (A) and genotypes (B) of the polymorphic marker rs3811046 in the *IL37* gene in AD group and healthy controls

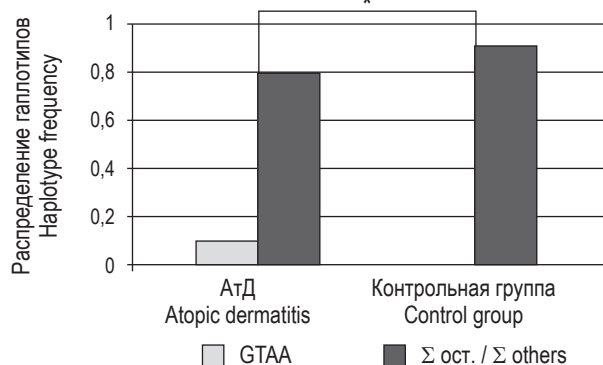
Note. *, $p < 0.05$.

моzigоты TT ($p < 0,05$; OR = 2,33, 95% CI = 1,22–4,48) (табл. 2 и рис. 1).

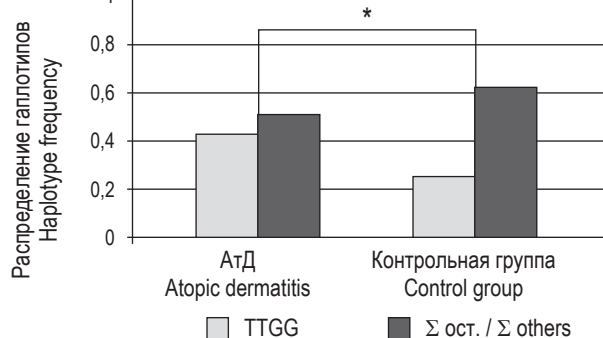
Распределение частот аллелей и генотипов полиморфного маркера rs3811047 в гене *IL37* не показало статистически значимых результатов. Как в группе с АтД, так и в контрольной выборке наблюдалось преобладание аллеля G (0,679 и 0,713 соответственно) и гомозиготы GG (0,495 и 0,500 соответственно), а наименьшую долю составила гомозигота AA (0,137 и 0,074 соответственно) (табл. 1 и 2).

Далее был проведен анализ распределения гаплотипов в гене *IL37* в группе с АтД и контрольной группе. Исследование показало, что гаплотип GTAA значительно чаще ($p < 0,05$) встречался в группе с АтД (частота встречаемости – 0,137)

А (А)



Б (В)



В (С)

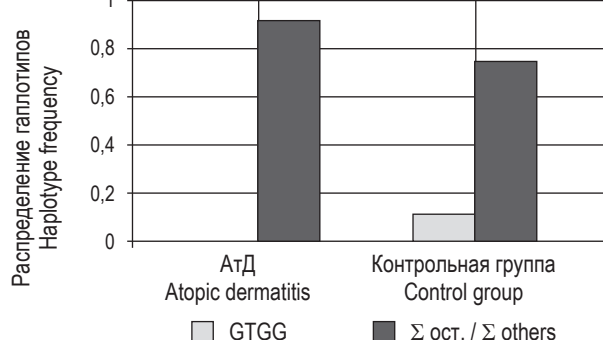


Рисунок 2. Распределение частот гаплотипов GTAA (А), GTGG (Б) и TTGG (В) в гене *IL37* в группе с АтД и контрольной группе

Примечание. * – $p < 0,05$.

Figure 2. Frequency distribution of haplotypes GTAA (A), GTGG (B) and TTGG (C) in the *IL37* gene in AD group and healthy controls

Note. *, $p < 0.05$.

по сравнению с контрольной выборкой (0,015). Риск развития АтД у носителей гаплотипа GTAA увеличивается больше, чем в 10 раз (OR = 10,62; 95% CI = 1,35–83,29) (рис. 2). Гаплотип GTGG у пациентов с АтД, наоборот, встречался значительно реже (частота встречаемости – 0,011; $p < 0,01$), чем у контрольной группы (0,191), и был ассоциирован с пониженным риском разви-

тия заболевания (OR = 0,05; 95% CI = 0,01-0,35) (рис. 2). Гаплотип TTGG ($p < 0,05$) встречался с частотой 0,484 в группе с АтД и 0,399 в контрольной группе. Риск развития АтД у носителей данного гаплотипа увеличивается более чем в 2 раза (OR = 2,10; 95% CI = 1,09-4,04) (рис. 2).

Обсуждение

В ходе нашего исследования впервые были исследованы полиморфные маркеры rs7019575 в гене *IL33*, а также rs3811046 и rs3811047 в гене *IL37* в выборке пациентов с АтД. При анализе полученных данных выявлено, что два из трех изученных SNP ассоциированы с риском развития АтД. С повышенным риском развития заболевания были ассоциированы аллель Т и генотип ТТ полиморфного маркера rs3811046, а также гаплотипы GTAA и TTGG полиморфных маркеров rs3811046 – rs3811047 в гене *IL37*. Протективную роль относительно риска развития АтД выполнял аллель G полиморфного маркера rs3811046 и гаплотип GTGG полиморфных маркеров rs3811046 и rs3811047 в гене *IL37*. Данные представлены на рисунках 1 и 2.

На сегодняшний день по данным литературы не было выявлено ассоциаций между полиморфным маркером rs7019575 в гене *IL33* и риском развития каких-либо заболеваний.

И в то же время была изучена роль полиморфных маркеров rs3811046 и rs3811047 в гене *IL37* в отношении других воспалительных заболеваний.

Отмечено, что маркера в гене *IL37* (rs3811046 и rs3811047) ассоциированы с COVID-19 [19], а SNP rs3811046 – с риском развития среднетяжелого и тяжелого пародонтита в бразильской популяции [12]. Также в популяции жителей северного Китая у носителей аллеля А выявили симптомы заболевания ревматоидного артрита, такие как выраженность боли и припухлость суставов, были выражены в меньшей степени [17].

Заключение

В ходе исследования были выявлены два маркера rs3811046 и rs3811047 в гене *IL37*, которые могут быть использованы в прогностических целях в отношении тяжести АтД. Носительство гомозиготного генотипа ТТ полиморфного маркера rs3811046 в гене *IL37* ассоциированы с повышенным риском заболевания, увеличивая его в 2 раза. В то время как носительство аллеля G снижает риск развития атопического дерматита в 2 раза. Также среди носителей гаплотипов GTAA и TTGG (в полиморфных маркерах rs3811046 и rs3811047) в гене *IL37* встречается у больных чаще в 10 и 2 раза соответственно.

Таким образом, дальнейшее изучение полиморфных маркеров позволит в будущем выявлять генетическую предрасположенность к заболеванию с целью коррекции образа жизни для снижения риска развития АтД, а также составления индивидуального плана терапии.

Список литературы / References

1. Абатуров А.Е., Волосовец А.П., Юлиш Е.И. Участие интерлейкинового семейства 1 в развитии воспалительной реакции при инфекционном процессе. 4. Роль IL-1F11 (il-33) // Здоровье ребенка, 2014. № 5 (56). С. 158-161. [Abaturvov A.E., Volosovets A.P., Yulish E.I. Participation of the interleukin family 1 in the development of the inflammatory response during the infectious process. 4. Role of the IL-1F11 (il-33). *Zdorovye rebenka = Child's Health*, 2014, no. 5 (56), pp. 158-161. (In Russ.)]
2. Гонсорунова Д.С., Огородова Л.М., Фёдорова О.С., Камалтынова Е.М., Белоногова Е.Г., Кремер Е.Э. Участие Т-регуляторных клеток в иммунном ответе при атопическом дерматите // Бюллетень сибирской медицины, 2011. № 4. С. 82-88. [Gonsorunova D.S., Ogorodova L.M., Fyodorova O.S., Kamaltynova E.M., Belonogova E.G., Kremer E.E. Participation of T-regulatory cells in the immune response in atopic dermatitis. *Byulleten sibirskoy meditsiny = Bulletin of Siberian Medicine*, 2011, no. 4, pp. 82-88. (In Russ.)]
3. Горбачева А.М., Митькин Н. А. Интерлейкин-33: друг или враг в борьбе против опухоли? // Молекулярная биология, 2019. Т. 53, № 5. С. 774-789. [Gorbacheva A.M., Mitkin N.A. Interleukin-33: friend or enemy in the fight against the tumor? *Molekulyarnaya biologiya = Molecular Biology*, 2019, Vol. 53, no. 5, pp. 774-789. (In Russ.)]
4. Дрожжина М.Б., Суслова Е.В. Иммунный ответ при атопическом дерматите. Основные патогенетические механизмы и корреляции стадийности в возрастном аспекте. Взаимосвязь с системными процессами дерматологического и недерматологического профиля // Медицинская иммунология, 2021. Т. 23, № 2. С. 237-244. [Drozhdina M.B., Suslova E.V. Immune response in atopic dermatitis: main pathogenetic mechanisms and stage-dependent correlations with age in regard to dermatological and non-dermatological systemic processes. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2021, Vol. 23, no. 2, pp. 237-244. (In Russ.)]

5. Кубанов А.А., Намазова-Баранова Л.С., Хаитов Р.М., Ильина Н.И., Амбарчян А.Т., Аршинский М.И., Астафьева Н.Г., Вишнева Е.А., Данилычева И.В., Елисютина О.Г., Епишев Р.В., Жестков А.В., Жилова М.Б., Заславский Д.В., Знаменская Л.Ф., Карамова А.Э., Материкин А.И., Мишина О.С., Монахов К.Н., Мурашкин Н.Н., Ненасева Н.М., Пампура А.Н., Притуло О.А., Сапунцова С.Г., Селимзянова Л.Р., Скороходкина О.В., Феденко Е.С., Фролова З.В., Хаитов М.Р., Чикин В.В. Федеральные клинические рекомендации: Атопический дерматит, 2020. [Электронный ресурс]. Режим доступа: https://www.nrcii.ru/specialistam/klinrecommend/atopic_dermatitis_2020.pdf. [Kubanov A.A., Namazova-Baranova L.S., Khaitov R.M., Ilyina N.I., Ambarchyan A.T., Arshinsky M.I., Astafieva N.G., Vishneva E.A., Danilycheva I.V., Elisyutina O.G., Epishev R.V., Zhestkov A.V., Zhilova M.B., Zaslavsky D.V., Znamenskaya L.F., Karamova A.E., Materikin A.I., Mishina O.S., Monakhov K.N., Murashkin N.N., Nenasheva N.M., Pampura A.N., Pritulo O.A., Sapuntsova S.G., Selimzyanova L.R., Skorokhodkina O.V., Fedenko E.S., Frolova Z.V., Khaitov M.R., Chikin V.V. Federal clinical recommendation: Atopic dermatitis, 2020. [Electronic resource]. Access mode: https://www.nrcii.ru/specialistam/klinrecommend/atopic_dermatitis_2020.pdf.
6. Поздеев О.П. Оценка влияния атопического дерматита на качество жизни пациента // Практическая медицина, 2013. № 1-4 (73). С. 112-113. [Pozdeev O.P. Assessment of the impact of atopic dermatitis on the patient's quality of life. *Prakticheskaya meditsina = Practical Medicine*, 2013, no. 1-4 (73), pp. 112-113 (In Russ.)]
7. Трофимова И.Б. Атопический дерматит // Лечебное дело. 2004. № 3. С. 9-16. [Trofimova I.B. Atopic dermatitis. *Lechebnoye delo = Medicine*, 2004, no. 3, pp. 9-16. (In Russ.)]
8. Учасова Е.Г., Груздева О.В., Дылева Ю.А., Каретникова В.Н. Интерлейкин-33 и фиброз: современный взгляд на патогенез // Медицинская иммунология, 2018. Т. 20, № 4. С. 477-484. [Uchasova E.G., Gruzdeva O.V., Dileva Yu.A., Karetnikova V.N. Interleukin 33 and fibrosis: pathogenesis updated. *Meditinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2018, Vol. 20, no. 4, pp. 477-484. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2018-4-477-484.
9. Шиловский И.П., Дынева М.Е., Курбачева О.М., Кудлай Д.А., Хаитов М.Р. Роль интерлейкина-37 в патогенезе аллергических заболеваний // Acta Naturae, 2019. № 4 (43). С. 54-64. [Shilovskiy I.P., Dyneva M.E., Kurbatcheva O.M., Kudlai D.A., Khaitov M.R. The role of interleukin-37 in pathogenesis of allergic diseases. *Acta Naturae = Acta Naturae*, 2019, no. 4 (43), pp. 54-64. (In Russ.)]
10. Boraschi D., Lucchesi D., Hainzl S., Leitner M., Maier E., Mangelberger D., Oostingh J.G., Pfaller T., Pixner C., Posselt G., Italiani P., Nold M.F., Nold-Petry C.A., Bufler P., Dinarello C.A. IL-37: a new anti-inflammatory cytokine of the IL-1 family. *Eur. Cytokine Network*, 2011, Vol. 22, no. 3, pp. 127-147.
11. Borgia F., Custurone P., Li Pomi F., Vaccaro M., Alessandrello C., Gangemi S. IL-33 and IL-37: A Possible Axis in Skin and Allergic Diseases. *Int. J. Mol. Sci.*, 2023, Vol. 24, 372. doi: 10.3390/ijms24010372.
12. Cirelli T., Nepomuceno R., Orrico S.R.P., Rossa C. Jr., Cirelli J.A., North K.E., Graff M., Barros S.P., Scarel-Caminaga R.M. Validation in a Brazilian population of gene markers of periodontitis previously investigated by GWAS and bioinformatic studies. *J. Periodontol.*, 2021, Vol. 92, no. 5, pp. 689-703.
13. Hou T., Sun X., Zhu J., Hon K.L., Jiang P., Chu I. M., Tsang M.S., Lam C.W., Zeng H., Wong C.K. IL-37 ameliorating allergic inflammation in atopic dermatitis through regulating microbiota and AMPK-mTOR signaling pathway-modulated autophagy mechanism. *Front. Immunol.*, 2020, Vol. 11, 752. doi: 10.3389/fimmu.2020.00752.
14. Imai Y. Interleukin-33 in atopic dermatitis. *J. Dermatol. Sci.*, 2019, Vol. 96, no. 1, pp. 2-7.
15. Oboki K., Nakae S., Matsumoto K., Saito H. IL-33 and airway inflammation. *Allergy Asthma Immunol. Res.*, 2011, Vol. 3, no. 2, pp. 81-88.
16. Schröder A., Lunding L.P., Zissler U.M., Vock C., Webering S., Ehlers J.C., Orinska Z., Chaker A., Schmidt-Weber C.B., Lang N.J., Schiller H.B., Mall M.A., Fehrenbach H., Dinarello C.A., Wegmann M. IL-37 regulates allergic inflammation by counterbalancing pro-inflammatory IL-1 and IL-33. *Allergy*, 2022, Vol. 77, no. 3, pp. 856-869.
17. Shi L.P., He Y., Liu Z.D. Correlation between single nucleotide polymorphism of rs3811047 in IL-1 F7 gene and rheumatoid arthritis susceptibility among Han population in central plains of China. *Asian Pac. J. Trop. Med.*, 2013, Vol. 6, no. 1, pp. 73-75.
18. Sullivan G.P., Davidovich P., Muñoz-Wolf N., Ward R.W., Hernandez Santana Y.E., Clancy D.M., Gorman A., Najda Z., Turk B., Walsh P.T., Lavelle E.C., Martin S.J. Myeloid cell-derived proteases produce a proinflammatory form of IL-37 that signals via IL-36 receptor engagement. *Sci. Immunol.*, 2022, Vol. 7, no. 78, eade5728. doi: 10.1126/sciimmunol.ade5728.

19. Tokajian S., Merhi G., Al Khoury C., Nemer G. Interleukin-37: A link between COVID-19, diabetes, and the black fungus. *Front. Microbiol.*, 2022, Vol. 12, 788741. doi: 10.3389/fmicb.2021.788741.
20. Wollenberg A., Christen-Zäch S., Taieb A., Paul C., Thyssen J.P., de Bruin-Weller M., Vestergaard C., Seneschal J., Werfel T., Cork M.J., Kunz B., Fölster-Holst R., Trzeciak M., Darsow U., Szalai Z., Deleuran M., von Kobyletzki L., Barbarot S., Heratizadeh A., Gielier U., Hijnen D.J., Weidinger S., de Raeve L., Svensson Å., Simon D., Stalder J.F., Ring J. European task force on atopic dermatitis/EADV eczema task force. ETFAD/EADV Eczema task force 2020 position paper on diagnosis and treatment of atopic dermatitis in adults and children. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.*, 2020, Vol. 34, no. 12, pp. 2717–2744.
21. Yan N., Meng S., Song R.H., Qin Q., Wang X., Yao Q., Jiang Y., Jiang W., Shi L., Xu J., Zhang J. Polymorphism of IL37 gene as a protective factor for autoimmune thyroid disease. *J. Mol. Endocrinol.*, 2015, Vol. 55, no. 3, pp. 209–218.

Авторы:

Свитич О.А. — д.м.н., профессор, член-корр. РАН, директор, заведующая лабораторией молекулярной иммунологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова»; профессор кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Министерства здравоохранения РФ (Сеченовский университет), Москва, Россия

Олисова О.Ю. — д.м.н., профессор, член-корр. РАН, заведующая кафедрой кожных и венерических болезней имени Рахманова ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Министерства здравоохранения РФ (Сеченовский университет), Москва, Россия

Потапова М.Б. — аспирант, младший научный сотрудник ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова», Москва, Россия

Меремьянина Е.А. — к.м.н., научный сотрудник ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова»; старший преподаватель ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования», Москва, Россия

Рассказова Н.Д. — младший научный сотрудник ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова», Москва, Россия

Белокопытова Е.А. — лаборант-исследователь ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова», Москва, Россия

Солодкова А.А. — лаборант-исследователь ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова», Москва, Россия

Мурзина А.А. — научный сотрудник ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова», Москва, Россия

Семенова И.Б. — д.м.н., ведущий научный сотрудник ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова», Москва, Россия

Упатова А.Г. — лаборант-исследователь ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова», Москва, Россия

Authors:

Svitich O.A., PhD, MD (Medicine), Professor, Corresponding Member, Russian Academy of Sciences, Director, Head, Laboratory of Molecular Immunology, I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera; Professor, Department of Microbiology, Virology and Immunology, I. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russian Federation

Olisova O.Yu., PhD, MD (Medicine), Professor, Corresponding Member, Russian Academy of Sciences, Head, V. Rakhmanov Department of Skin and Venereal Diseases, I. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russian Federation

Potapova M.B., Postgraduate Student, Junior Research Associate, I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation

Meremianina E.A., PhD (Medicine), Research Associate, I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera; Senior Lecturer, Russian Medical Academy of Continuous Professional Education, Moscow, Russian Federation

Rasskazova N.D., Junior Research Associate, I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation

Belokopytova E.A., Laboratory Assistant, I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation

Solodkova A.A., Laboratory Assistant, I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation

Murzina A.A., Research Associate, I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation

Semenova I.B., PhD, MD (Medicine), Leading Researcher, I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation

Upatova A.G., Laboratory Assistant, I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation

ИММУНОАНАЛИЗ ЕСТЕСТВЕННЫХ НЕЙРОТРОПНЫХ АУТОАНТИТЕЛ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ БОЛЬНЫХ С COVID-19-АССОЦИИРОВАННЫМИ ИШЕМИЧЕСКИМИ ИНСУЛЬТАМИ

Расулова Х.А., Расулова М.А.

Термезский филиал Ташкентской медицинской академии, г. Термез, Республика Узбекистан

Резюме. Цель исследования заключалась в проведении сравнительного анализа содержания естественных нейротропных аутоантител (еАТ) в сыворотке крови больных с COVID-19-ассоциированными ишемическими инсультами (ИИ) в динамике заболевания.

Всего в проспективное исследование были включены 150 больных с впервые возникшим ИИ, из которых 100 пациентов были с ИИ на фоне COVID-19 пневмонии (основная или 1-я группа) и 50 больных с острым ИИ без симптомов и положительного теста на COVID-19 (группа сравнения или 2-я группа). Тяжесть инсульта и сознание оценивались по шкале NIHSS и шкале ком Глазго. Методом иммуноферментного анализа в сыворотке крови больных ($n = 110$) были изучены уровни е-АТ IgG к белкам NF-200, GFAP, S100 β , ОБМ, рецепторам к дофамину, серотонину, холину, глутамату, ГАМК. Анализ проводили на 5-й, 14-й и 28-й день заболевания.

В 1-й группе ($n = 80$) увеличились уровни еАТ к NF-200 ($132,9 \pm 4,1$ усл. ед.) в 1,09 и 1,8 раза, GFAP ($118,9 \pm 3,9$ усл. ед.) в 1,4 и 2 раза, S100 β ($129,5 \pm 10,2$ усл. ед.) в 1,05 и 1,6 раза, ОБМ ($97,3 \pm 4,5$ усл. ед.) в 1,14 и 1,6 раза, к рецепторам к дофамину ($77,9 \pm 4,4$ усл. ед.) в 1,2 раза и 1,6 раза, серотонину ($81,96 \pm 3,25$ усл. ед.) в 1,2 и 1,4 раза, холину ($61,42 \pm 3,6$ усл. ед.) в 1,4 и 1,8 раза, глутамату ($85,28 \pm 4,25$ усл. ед.) в 1,19 и 1,4 раза, ГАМК ($82,4 \pm 5,2$ усл. ед.) в 1,5 и 1,8 раза соответственно по сравнению с аналогичными показателями во 2-й группе и контроле. Изучение уровня е-АТ у больных с COVID-19-ассоциированными ИИ в динамике заболевания показал наибольший прирост уровня е-АТ на 28-е сутки к белку S-100, NF-200 и ОБМ.

У больных с COVID-19-ассоциированными ишемическими инсультами выявлена более усиленная продукция сывороточных аутоантител к нейробелкам и рецепторам нейромедиаторов, что сопровождало более худшее течение ИИ и может рассматриваться как предиктор неблагоприятного исхода заболевания.

Ключевые слова: COVID-19, нейроиммунология, ишемический инсульт, нейротропные аутоантитела, сыворотка крови, динамика заболевания

Адрес для переписки:

Расулова Хуршидахон Абдубориевна
Термезский филиал Ташкентской медицинской
академии
132000, Республика Узбекистан, г. Термез,
ул. И. Каримова, 64.
Тел.: +998 90 9101550.
E-mail: khurshidakhon@gmail.com

Address for correspondence:

Khurshidakhon A. Rasulova
Termez Affiliation of Tashkent Medical Academy
64 I. Karimov St
Termez
132000 Republic of Uzbekistan
Phone: +998 90 9101550.
E-mail: khurshidakhon@gmail.com

Образец цитирования:

Х.А. Расулова, М.А. Расулова «Иммуноанализ естественных нейротропных аутоантител в сыворотке крови больных с COVID-19-ассоциированными ишемическими инсультами» // Медицинская иммунология, 2024. Т. 26, № 6. С. 1257-1268.
doi: 10.15789/1563-0625-IAO-2888
© Расулова Х.А., Расулова М.А., 2024
Эта статья распространяется по лицензии Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

Kh.A. Rasulova, M.A. Rasulova "Immune analysis of natural neurotropic autoantibodies in blood serum of patients with COVID-19 associated ischemic stroke", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2024, Vol. 26, no. 6, pp. 1257-1268.
doi: 10.15789/1563-0625-IAO-2888
© Rasulova Kh.A., Rasulova M.A., 2024
The article can be used under the Creative Commons Attribution 4.0 License
DOI: 10.15789/1563-0625-IAO-2888

IMMUNE ANALYSIS OF NATURAL NEUROTROPIC AUTOANTIBODIES IN BLOOD SERUM OF PATIENTS WITH COVID-19 ASSOCIATED ISCHEMIC STROKE

Rasulova Kh.A., Rasulova M.A.

Termez, Affiliation of Tashkent Medical Academy, Termez, Republic of Uzbekistan

Abstract. The aim of the present study was to perform a comparative quantitative analysis of natural neurotropic autoantibodies (Nabs) in blood serum of patients with COVID-19 associated ischemic strokes (IS) in dynamics of disease.

A total of 150 consecutive patients with acute primary IS were included, being divided in two groups: 100 patients with IS on the background of COVID-19 pneumonia (main group No. 1) and 50 patients with IS without COVID-19 symptoms and positive viral test (comparison group No. 2). The stroke severity and consciousness were measured by NIHSS and Glasgow coma scale. In blood serum of patients ($n = 110$), we have studied the levels of IgG Nabs to NF-200, GFAP, S100 β , MBP, receptors to dopamine, serotonin, choline, glutamate, GABA by means of ELISA technique. The blood samples for analyses were taken at the 5th, 14th and 28th days of disease.

In group 1 ($n = 80$), the Nabs levels have been increased as follows: antibodies to NF-200 (132.9 ± 4.1 CU), by 1.09 and 1.8 times; for GFAP (118.9 ± 3.9 CU), by 1.4 and 2 times; S100 β antibodies (129.5 ± 10.2 CU), by 1.05 and 1.6 times; MBP antibodies (97.3 ± 4.5 CU) were 1.14 and 1.6 times higher; antibodies to dopamine receptors (77.9 ± 4.4 CU) in 1.2 and 1.6 times; to serotonin receptors (81.96 ± 3.25 CU) in 1.2 and 1.4 times; choline receptor antibodies (61.42 ± 3.6 CU) were increased 1.4- and 1.8-fold; to glutamate (85.28 ± 4.25 CU) by 1.19 and 1.4 times; to GABA (82.4 ± 5.2 CU) the increase was 1.5- and 1.8-fold, respectively, when compared with group 2 and controls. The time-dependent monitoring of Nabs level in patients with COVID-19 associated ischemic stroke showed the highest increase in Nabs to the S-100, NF-200 and MBP proteins at the day +28 following the brain stroke.

In patients with COVID-19 associated IS, more enhanced production of serum autoantibodies to neuroproteins and neurotransmitter receptors was detected, which accompanied a worse course of IS and can be considered as a predictor of unfavorable outcome of disease.

Keywords: COVID-19, neuroimmunology, ischemic stroke, neurotropic autoantibodies, blood serum, disease dynamics

Введение

Неврологические синдромы, обусловленные продукцией антител к нервной ткани при коронавирусной инфекции COVID-19, являются новой областью современной клинической неврологии, вызывающей большой интерес с теоретических и практических позиций. Заметно влияя на иммунную систему, COVID-19 обуславливает аутоиммунные и метаболические перестройки, которые происходят в организме человека при попадании инфекции как в остром, так и отдаленном (постковидном) периоде [9, 23, 24, 26].

Одним из хорошо задокументированных дополнительных клинических проявлений COVID-19 являются острые нарушения мозгового кровообращения (ОНМК) [7, 21]. Ишемический инсульт (ИИ), вторичный по отношению к тяжелому COVID-19, является распространенным явлением и часто приводит к летальному ис-

ходу. Изучение механизмов, с помощью которых SARS-CoV-2 вызывает ИИ, стало популярной темой исследований. Еще первым L. Мао и соавт. (2020) продемонстрировали, что у пациентов с тяжелым течением COVID-19 чаще развивались осложнения ИИ, которые были связаны с более высокими показателями смертности [23].

Известно, что различные функциональные состояния организма сопровождаются сдвигами в содержании естественных аутоантител (е-АТ), связанными с изменением обменных процессов ключевых эндогенных мишеней развития заболевания или обеспечивающих физиологическую норму. Подобные исследования по анализу содержания е-АТ проводились при различных неврологических и психиатрических заболеваниях: ишемический [2, 11, 15, 16] и геморрагический инсульт [29], эпилепсия [14], шизофрения и психозы [10], деменции, болезнь Альцгеймера [5, 6], хроническая алкогольная интоксикация [1], ней-

родегенеративные заболевания [17, 18], энцефалиты [19] и другие.

Значительная вариабельность патогенетических событий, возникающих при COVID-19, обуславливает полиорганность поражения, в развитии которой определенную роль могут играть и иммунопатогенные свойства SARS-CoV-2. Аутоантитела, встречающиеся при ряде аутоиммунных заболеваний, были обнаружены у пациентов с COVID-19 [20, 22, 25, 27]. Исследователи выявили наличие антинуклеарных антител (ANA), антицитоплазматических нейтрофильных антител (ANCA) и антиантифосфолипидных (APL) антител у пациентов с COVID-19. Результаты показали, что 45% пациентов были положительными по крайней мере на одно аутоантитело, а пациенты с положительными аутоантителами имели тенденцию иметь худший прогноз и значительно более высокую частоту дыхания при поступлении. Положительный показатель для ANA составил 33%, положительный показатель для антикардиолипидных антител (IgG и/или IgM) составил 24%, а у трех пациентов были получены положительные результаты на антитела против β 2-гликопротеина-I (IgG и/или IgM) (9%). Однако ANCA был отрицательным у всех пациентов [13, 20, 28].

Анализ содержания е-АТ, которые сохраняют все изменения системы эндогенных биорегуляторов у больных с COVID-19-ассоциированными ИИ, позволят решить задачу диагностики и лечения неврологических синдромов при COVID-19.

Цель исследования заключалась в проведении сравнительного анализа содержания естественных нейротропных аутоантител в сыворотке крови больных с COVID-19-ассоциированными ИИ в динамике заболевания.

Материалы и методы

В основу клинического исследования вошли результаты наблюдения за 150 больными в остром и раннем восстановительном периодах ИИ, из которых 100 пациентов были с ИИ на фоне COVID-19-пневмонии (основная группа, или 1-я группа) и 50 больных — с острым ИИ без симптомов и положительного теста на COVID-19 (группа сравнения, или 2-я группа). Клинические исследования проводились в отделениях реанимации и интенсивной терапии, неврологии Специализированных многопрофильных инфекционных больниц Зангиота-1 и Зангиота-2, а также Городской клинической больницы № 5 г. Ташкента в период 2020–2022 гг.

Возраст пациентов 1-й группы составил от 41 до 89 лет (средний возраст — $68,3 \pm 9,8$ года) и во

2-й группе — от 42 до 83 лет (средний возраст — $64,2 \pm 10,2$ года).

Контрольная группа состояла из 16 лиц без инсульта и COVID-19 в возрасте от 50 до 68 лет (средний возраст $61,2 \pm 5,7$ года) с дисциркуляторной энцефалопатией 1-й стадии, данные которых применялись для сравнения иммунологических показателей.

Критериями включения в исследование больных основной группы явились впервые возникший острый ИИ, перенесенная коронавирусная инфекция COVID-19 в течение до 1 месяца; группы сравнения: впервые возникший острый ИИ, отсутствие клинических симптомов и положительного теста на COVID-19, отсутствие COVID-19 инфекции до начала ИИ (включены больные, заболевшие ИИ до марта 2020 г.).

Критерии исключения больных из исследования: геморрагический инсульт, поздний восстановительный период и последствия ИИ, повторный инсульт, наличие нейрокогнитивных расстройств до COVID-19 и инсульта, нейродегенеративные и экстрапиримидные заболевания, тяжелая ЧМТ, эпилепсия, психические и онкологические болезни, тяжелые соматические заболевания в стадии декомпенсации.

Все больные подвергались детальному клинико-неврологическому обследованию по классической методике. Оценка сознания и степень выраженности его нарушения проводилась по шкале ком Глазго. Выраженность неврологического дефицита и степень тяжести ИИ оценивалась по Шкале тяжести инсульта Национальных институтов здоровья США (National Institutes of Health Stroke Scale — NIHSS). Оценка состояния больных проводилась однократно на момент первичного осмотра в клиниках на 1-5-е, 14-е, 28-е сутки заболевания.

Формулировка диагноза «COVID-19-ассоциированный ИИ» осуществлялась на основании результатов эпидемиологического анамнеза, клинико-неврологического осмотра и данных лабораторно-инструментального исследования в соответствии с критериями МКБ-10 (U07.1 — U07.2), Национального руководства по неврологии и общепринятых документов (European Stroke Organisation (ESO) Executive Committee; ESO Writing Committee, Guidelines for management of ischemic stroke and transient ischemic attack, 2008), Временных методических рекомендаций Минздрава России «Профилактика, диагностика и лечение новой коронавирусной инфекции COVID-19» [3, 4]. Для выявления COVID-19 пневмоний, их осложнений, дифференциальной диагностики с другими заболеваниями легких, а также для определения степени выраженности

и динамики изменений, оценки эффективности проводимой терапии проводилась МСКТ грудной клетки. Согласно стандартам обследования для уточнения характера патологического процесса и исключения геморрагического инсульта всем пациентам при поступлении в клиники выполнялась КТ головного мозга.

Базовое лабораторное исследование стационарных пациентов включало стандартные общеклинический и биохимический анализы крови, развернутую коагулограмму, общий анализ мочи. Согласно Протоколам диагностики COVID-19, также исследовали уровни С-реактивного белка (СРБ), прокальцитонина, D-димера, ферритина, фибриногена, триглицеридов. Основное значение для этиологической лабораторной диагностики COVID-19 имело выявление иммуноглобулинов классов М и G (IgM и IgG) с применением иммунохимических методов. Основным видом биоматериала для лабораторного исследования методом ПЦР на РНК SARS-CoV-2 являлся материал, полученный при заборе мазка из носоглотки (из двух носовых ходов) и ротоглотки. Мазки со слизистой оболочки носоглотки и ротоглотки собирались в одну пробирку для большей концентрации вируса.

В образцах сыворотки крови всех наблюдавшихся пациентов с ИИ, а также в образцах крови контрольной группы ($n = 16$) проводилось количественное определение сывороточной иммунореактивности нейротропных аутоантител класса IgG (естественных нейротропных аутоантител — е-АТ1 и их функциональных противовесов — антиидиотипических антител — АиАТ2), направленных к белкам нервной ткани NF-200, GFAP, S-100, ОБМ, рецепторам к дофамину Доф-Р, серотонину Сер-Р, холину Хол-Р, глутамату Глу-Р и ГАМК-Р, а также к вольтажзависимым кальциевым каналам.

Определение содержания нейротропных аутоантител (НААТ) проводилось с помощью стандартных процедур твердофазного иммуноферментного анализа ЭЛИ-Н-Тест и одноименных тест-наборов производства МИЦ «Иммункулус» (Россия) по методике А.Б. Полетаева [11, 12]. Уровень сывороточного содержания е-АТ к каждому из нейроантигенов выражался в условных единицах (усл. ед.): процентах отклонений от ИР сыворотки-стандарта. За норму принимали значения иммунореактивности аАТ от 80 до 140 усл. ед., индекс иммунореактивности АТ1/АиАТ2 от 0,8 до 1,2 [14].

Полученные результаты фиксировались в индивидуальных регистрационных картах пациентов и затем вносились в электронную базу данных программы Microsoft Excel 2010. Применялись

общепринятые методы вариационной статистики. Результаты представлены в виде M (среднее значение) $\pm m$ (ошибка) и μ (среднее значение) $\pm$ (стандартное отклонение). После подтверждения нормальности распределения данных анализ количественных показателей проводился с помощью t -критерия Стьюдента. Различия считались статистически достоверными при уровне значимости не менее 95% ($p < 0,05$). Степень связи между полученными показателями определяли по уравнению регрессии, учитывая силу связи и ее направление с помощью вычисления коэффициента корреляции (r) по Пирсону.

Результаты и обсуждение

В таблице 1 представлены сравнительные данные измерения нейротропных е-АТ в кровотоке обследованных лиц с COVID-19-ассоциированными ИИ, включая контрольную группу и группу ИИ без COVID-19. Анализ образцов сыворотки крови в перечисленных группах проводили в соответствии срокам сбора крови больных (5-й, 14-й и 28-й день).

При изучении особенностей сывороточной иммунореактивности наблюдавшихся нами больных мы использовали тест-систему, представленную четырьмя белками, непосредственно связанными с функциями нервных клеток: белком NF-200, белком GFAP (белок промежуточных филаментов астроцитов), белком S-100 (кальций-зависимый регулятор многих клеточных функций, метаболических процессов в нервной ткани, в частности нейротрофический фактор серотонинергических нейронов, регулятор апоптоза) и основным белком миелина (ОБМ).

Белок NF-200 является специфическим белком аксонов. Рост е-АТ ему сопровождает процессы дегенерации нервных волокон (в том числе при диабетической нейропатии) [12]. Проведенный анализ результатов иммунологического мониторинга позволил установить достоверное увеличение уровня е-АТ к белку NF-200 у всех обследованных больных 1-й и 2-й группы ($132,9 \pm 4,1$ vs $121,56 \pm 2,8$ усл. ед. соответственно) в 1,8 и 1,6 раза соответственно по сравнению с параметрами, полученными для лиц контрольной группы ($72,88 \pm 6,83$ усл. ед.) ($p < 0,001$) (табл. 1). При этом отмечалась тенденция к более высокому приросту е-АТ у больных 1-й группы в 1,09 раза ($p < 0,05$) от значений 2-й группы, что может свидетельствовать о выраженных дегенеративных изменениях аксонов при ИИ на фоне COVID-19 (рис. 1).

Астроглиальный белок GFAP является главным структурным компонентом промежуточных

ТАБЛИЦА 1. ПОКАЗАТЕЛИ ЕСТЕСТВЕННЫХ НЕЙРОТРОПНЫХ АУТОАНТИТЕЛ ($M \pm m$) В СЫВОРОТКЕ КРОВИ У ОБСЛЕДОВАННЫХ БОЛЬНЫХ С ИИ (УСЛ. ЕД.)

TABLE 1. INDICATORS OF NATURAL NEUROTROPIC AUTOANTIBODIES ($M \pm m$) IN THE BLOOD SERUM OF THE EXAMINED PATIENTS WITH ISCHEMIC STROKES (CU)

Значения е-АТ Value of autoantibodies	COVID-19 + ИИ COVID-19 + IS (n = 50)	ИИ IS (n = 30)	Контроль Control (n = 16)	p
NF-200	132,9 $\pm$ 4,1	121,56 $\pm$ 2,80	72,88 $\pm$ 6,83	< 0,001
GFAP	118,9 $\pm$ 3,9	82,70 $\pm$ 3,42	57,88 $\pm$ 5,49	< 0,001
S-100	129,5 $\pm$ 10,2	122,8 $\pm$ 4,9	77,47 $\pm$ 7,32	< 0,001
ОБМ MBP	97,3 $\pm$ 4,5	85,56 $\pm$ 3,40	58,76 $\pm$ 5,36	< 0,001
Доф-Р Dop-R	77,9 $\pm$ 4,4	63,16 $\pm$ 3,80	46,94 $\pm$ 4,79	< 0,001
Сер-Р Ser-R	81,96 $\pm$ 3,25	63,8 $\pm$ 2,8	56,16 $\pm$ 4,49	< 0,001
Хол-Р Chol-R	61,42 $\pm$ 3,60	42,23 $\pm$ 1,80	33,89 $\pm$ 3,15	< 0,001
Глу-Р Glu-R	85,28 $\pm$ 4,25	71,26 $\pm$ 4,00	57,19 $\pm$ 4,77	< 0,001
ГАМК-Р GABA-R	82,4 $\pm$ 5,2	53,3 $\pm$ 3,3	45,38 $\pm$ 4,77	< 0,001
Ca²⁺-каналы Ca²⁺ channel	105,08 $\pm$ 4,00	87,7 $\pm$ 3,8	45,5 $\pm$ 2,5	< 0,001

Примечание. p – достоверность значений по отношению к контрольной группе.

Note. p, the reliability of the values relative to the control group.

филаментов астроцитов. Изменения его экспрессии наблюдаются при различных патологических процессах, вовлекающих глию головного мозга (глиоз как следствие ишемических поражений, следствие кровоизлияний, травмы, токсических воздействий и др.) [2, 8, 12]. Уровень иммунореактивности белка GFAP и количества GFAP-позитивных клеток является маркером нейрональной потери в разных молекулярных слоях гиппокампа вплоть до зубчатой извилины, указывая на тесную связь между нейрональной и глиальной дисфункцией [11]. У всех больных ИИ происходило достоверное увеличение уровня е-АТ к белку GFAP в отличие от группы контроля (57,88 $\pm$ 5,49 усл. ед.) в 2 и 1,1 раза соответственно 1-й и 2-й группы ($p < 0,001$) (табл. 1). Наибольший прирост е-АТ отмечался в 1-й группе (118,9 $\pm$ 3,9 усл. ед.) в 1,4 раза в сравнении с показателями 2-й группы (82,7 $\pm$ 3,42 усл. ед.) ($p < 0,05$) (рис. 1). Увеличение уровня GFAP является чувствительным маркером повреждения мозга, степень повышения которого была связана с тяжестью инсульта и развитием COVID-19-

пневмонии. Рост антител к GFAP сопровождается аномально активной пролиферацией клеток астроглии (глиоз), что может являться исходом перенесенного инфаркта (повреждения) мозга и воспалительных процессов в центральной нервной системе.

Белок S-100 – нейроспецифическая изоформа белка S-100, является Ca²⁺-связывающим белком и трофическим фактором для серотонинергических нейронов. Синтезируется глией и имеет преимущественную локализацию в цитоплазме астроцитов. Имеются данные о том, что функции S-100 связаны с регуляцией проницаемости ионных каналов (стимулирует увеличение уровня внутриклеточного кальция в нейронах), а также с механизмами обучения, памяти, эмоционально-мотивационных реакций, т. е. интегративной деятельностью мозга [8, 10, 11]. Кроме того, поскольку S-100 белки во внеклеточном секторе проявляют свойства цитокинов и взаимодействуют с RAGE-рецепторами, которые экспрессируются в нервной системе не только нейронами, микроглией и астроцитами, но и

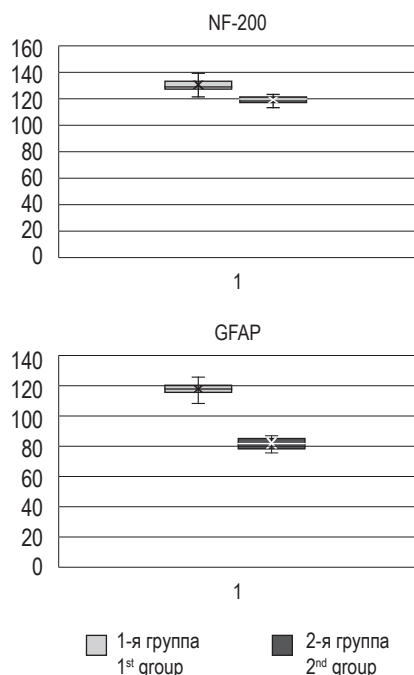


Рисунок 1. Сравнительное содержание аутоантител к белкам NF-200 и GFAP в сыворотке крови обследованных больных (усл. ед.)

Figure 1. Comparative content of autoantibodies to proteins NF-200 and GFAP in the blood serum of the examined patients (CU)

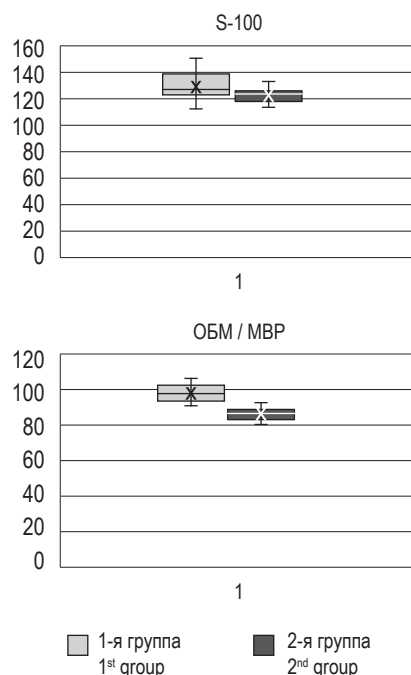


Рисунок 2. Сравнительное содержание аутоантител к белкам S-100 и ОБМ в сыворотке крови обследованных больных (усл. ед.)

Figure 2. Comparative content of autoantibodies to proteins S-100 and MBP in blood serum of the examined patients (CU)

клетками сосудистой стенки, можно предположить вовлеченность в воспалительную реакцию и сосудистой сети [18]. Больные с COVID-19-ассоциированными ИИ достоверно отличались по индивидуальному сывороточному уровню е-АТ к белку S-100 ($129,5 \pm 10,2$ усл. ед.) с тенденцией к увеличению их содержания в 1,05 и 1,6 раза по сравнению со 2-й группой ($122,8 \pm 4,9$ усл. ед.) и контролем ($77,47 \pm 7,32$) ($p < 0,001$) (табл. 1). При этом уровень е-АТ к S-100 во 2-й группе был выше значений контроля в 1,5 раза ($p < 0,05$) (рис. 2).

Основной белок миелина (ОБМ) — белок миелиновых оболочек нервных волокон. ОБМ является основной мишенью патологических аутоиммунных процессов, сопровождающих демиелинизирующие заболевания нервной системы. Рост АТ к нему типичен для невритов (радикулоневритов). ОБМ обеспечивает быстрое проведение нервного импульса по аксонам, которые он окружает [20, 29]. Нами был выявлен наибольший разброс показателей иммунореактивности по уровню е-АТ к ОБМ. Так, наибольшее достоверное ($p < 0,001$) повышение титра е-АТ к ОБМ наблюдали в 1-й группе ($97,3 \pm 4,5$ усл. ед.) в 1,6 раза в сравнении с контро-

лем ($58,76 \pm 5,36$ усл. ед.) и в 1,14 раза по сравнению со 2-й группой ($85,56 \pm 3,4$ усл. ед.) (табл. 1). Во 2-й группе было зарегистрировано увеличение уровня е-АТ к ОБМ в 1,4 раза в сравнении с контролем ($p < 0,001$) (рис. 2).

С помощью ЭЛИ-Н-теста производилась недифференцированная оценка сывороточного содержания е-АТ к разным изоформам соответствующих рецепторов (А- и В-ГАМК-рецепторы; глутаматные NMDA- и AMPA-рецепторы; D1...D5 дофаминовые рецепторы; 5-HT₁...5-HT₇ рецепторы серотонина, холинорецепторы). Зафиксировано повышение индивидуального уровня сывороточной иммунореактивности всех е-АТ к рецепторам нейромедиаторов. Так, в 1-й группе титры е-АТ к Доф-Р повышались ($77,9 \pm 4,4$ усл. ед.) в 1,2 раза и 1,6 раза, Сер-Р ($81,96 \pm 3,25$ усл. ед.) в 1,2 и 1,4 раза, Хол-Р ($61,42 \pm 3,6$ усл. ед.) в 1,4 и 1,8 раза соответственно по сравнению с аналогичными показателями во 2-й группе ($63,16 \pm 3,8$ усл. ед.; $63,8 \pm 2,8$ усл. ед. и $42,23 \pm 1,8$ усл. ед. соответственно) и контроле ($46,94 \pm 4,79$ усл. ед.; $56,16 \pm 4,49$ усл. ед. и $33,89 \pm 3,15$ усл. ед. соответственно) ($p < 0,001$) (табл. 1). При этом уровни е-АТ к Доф-Р, Сер-Р и Хол-Р во 2-й группе и контроле достоверно различались в 1,3; 1,1 и 1,2 раза со-

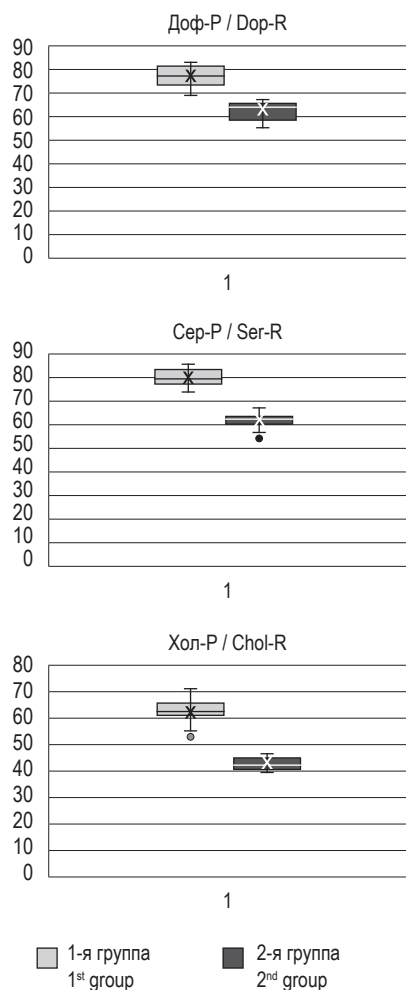


Рисунок 3. Сравнительное содержание аутоантител к дофаминовым (Доп-Р), серотониновым (Сер-Р) и холинорецепторам (Хол-Р) в сыворотке крови обследованных больных (усл. ед.)

Figure 3. Comparative content of autoantibodies to dopamine (Dop-R), serotonin (Ser-R) and cholinergic receptors (Chol-R) in the blood serum of the examined patients (CU)

ответственно ($p < 0,05$) (рис. 3). Аномальное повышение е-АТ к лиганд-связывающему сайту рецепторов нейромедиаторов указывает на изменения в соответствующих системах нейронов. В частности, Хол-Р участвуют в регуляции вегетативных функций, а также когнитивных функций и памяти.

Известно, что медиаторами физиологических процессов возбуждения и торможения являются глутаминовая (глутамат) и гамма-аминомасляная кислоты (ГАМК). Именно эти аминокислоты обеспечивают гуморальную связь иммунной и нейроэндокринной систем с головным мозгом [8, 17]. Указанные биомолекулы имеют наибольшее значение при возникновении стрес-

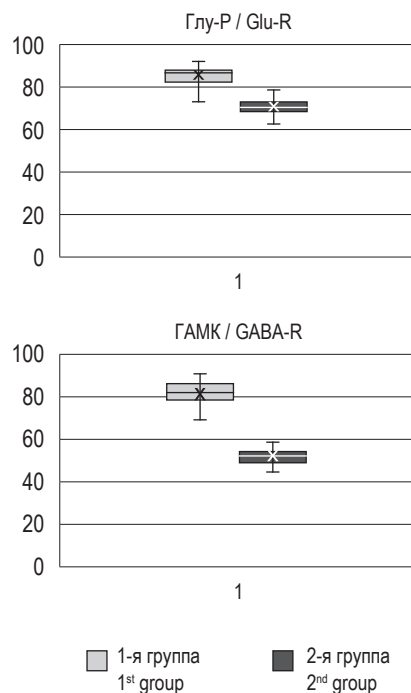


Рисунок 4. Сравнительное содержание аутоантител к глутаматным (Глу-Р) и ГАМК рецепторам (ГАМК-Р) (усл. ед.)

Figure 4. Comparative content of autoantibodies to glutamate (Glu-R) and GABA receptors (GABA-R) (CU)

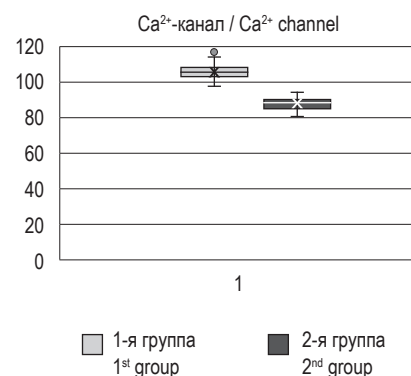


Рисунок 5. Сравнительное содержание аутоантител к белку вольтажзависимых кальциевых каналов (усл. ед.).

Figure 5. Comparative content of autoantibodies to the protein of voltage-dependent calcium channels (CU)

совых реакций организма, передаче импульсов боли, отвечают за полноценное дыхание, сохранение памяти, способности к обучению и др. [17, 19]. Проведенный иммуноанализ позволил установить достоверное увеличение уровня е-АТ к Глу-Р и ГАМК-Р у обследованных больных ИИ

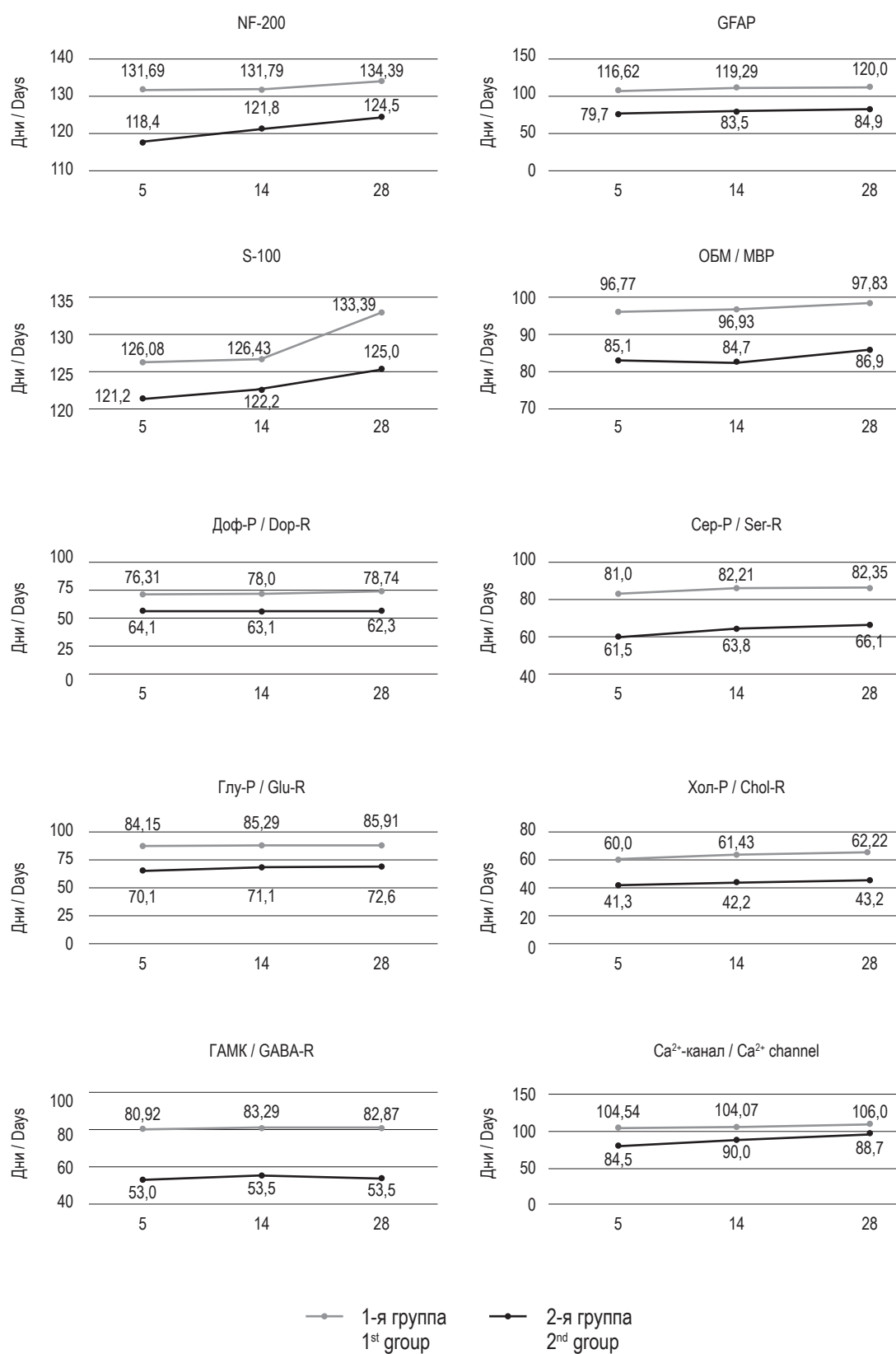


Рисунок 6. Динамика изменений сыывороточного уровня нейротропных аутоантител у больных с COVID-19-ассоциированными ИИ (усл. ед.)

Figure 6. Dynamics of changes in the serum level of neurotropic autoantibodies in patients with COVID-19 associated IS (CU)

по сравнению с параметрами, полученными для лиц контрольной группы. Наибольший прирост е-АТ к исследованным биомолекулам отмечался у больных с COVID-19-ассоциированными ИИ: к Глут-Р ($85,28 \pm 4,25$ усл. ед.) в 1,19 и 1,4 раза, ГАМК-Р ($82,4 \pm 5,2$ усл. ед.) в 1,5 и 1,8 раза соответственно по сравнению с аналогичными показателями во 2-й группе ($71,26 \pm 4,0$ усл. ед. и $53,3 \pm 3,3$ усл. ед. соответственно) и контроле ($57,19 \pm 4,77$ усл. ед. и $45,38 \pm 4,77$ усл. ед. соответственно) ($p < 0,001$) (табл. 1). При этом уровни е-АТ к Глут-Р и ГАМК-Р во 2-й группе были достоверно выше значений контроля в 1,2 и 1,1 раза соответственно ($p < 0,05$) (рис. 4). Возрастание содержания е-АТ к Глут-Р и ГАМК-Р свидетельствует о нарушении процессов возбуждения и торможения в нервной системе.

Нами было выявлено достоверное повышение е-АТ к белку вольтажзависимых кальциевых каналов (Ca^{2+} -каналов) у больных ИИ, указывающее на нарушение нервно-мышечной проводимости. Причем уровни е-АТ в 1-й группе ($105,08 \pm 4,0$ усл. ед.) превышали значения 2-й группы ($87,5 \pm 3,9$ усл. ед.) в 1,2 раза ($p < 0,001$) и в 2,31 раза показатели контроля ($45,5 \pm 2,5$ усл. ед.) ($p < 0,05$) (табл. 1). Во 2-й группе было зарегистрировано увеличение уровня е-АТ к Ca^{2+} -каналам в 1,9 раза в сравнении с контролем ($p < 0,05$) (рис. 5). Можно предположить, что это объясняется нарушениями синаптической трансмиссии при инсульте, особенно на фоне COVID-19.

Изучение уровня е-АТ у больных с COVID-19-ассоциированными ИИ в динамике заболевания показал наибольший прирост уровня е-АТ на 28-е сутки к белку S-100 (возрастал в 1,1 раза в сравнении с 5-ми и 14-ми сутками и значениями 2-й группы), NF-200 (возрастал в 1,1 раза в сравнении с 5-ми сутками и значениями 2-й группы) и ОБМ (возрастал в 1,1 раза в сравнении с 5-ми сутками и значениями 2-й группы). Уровни е-АТ к другим нейромедиаторам не имели существенных различий в динамике инсульта, хотя достоверно превышали значения 2-й группы и контроля (рис. 6). На наш взгляд, повышение уровня е-АТ к белку S-100 в динамике может обуславливать спектр нейropsychических проявлений COVID-19 от обратимой активации до формирования глиального рубца, что подтверждено некоторыми исследованиями [24], с сохранением воспалительной реакции в сосудистой сети. Прирост е-АТ к белку NF-200 в динамике может свидетельствовать о прогрессировании дегенеративных изменений аксонов при ИИ на фоне COVID-19. ОБМ, являясь основной мишенью аутоиммунных нарушений, может обуславливать прогрессирование демиелинизирующих процессов в нервной си-

стеме. Это выражается более длительным сохранением двигательных, чувствительных и речевых нарушений у данной группы больных.

Таким образом, результаты иммунологического мониторинга позволили установить наличие изменения уровня естественных аутоантител к нейромедиаторам у больных с COVID-19-ассоциированными ИИ по сравнению с параметрами, полученными для больных ИИ без COVID-19 и лиц контрольной группы. Увеличение уровня нейротропных антител у больных с ИИ, особенно на фоне COVID-19-пневмонии, является косвенным доказательством усиленной выработки нейромедиаторов, задействованных в процессе стабилизации гомеостатического равновесия и нейровоспалительных, аутоиммунных процессов.

Выводы

1. У больных с COVID-19-ассоциированными ишемическими инсультами выявлены различия в содержании естественных нейротропных аутоантител в сыворотках крови в сравнении с больными с ИИ без COVID-19. У больных с ИИ на фоне COVID-19 пневмонии выявлена более усиленная продукция сывороточных аутоантител к нейробелкам и рецепторам нейромедиаторов, что сопровождало более худшее течение ИИ и может рассматриваться как предиктор неблагоприятного исхода заболевания.

2. Изучение уровня е-АТ у больных с COVID-19-ассоциированными ИИ в динамике заболевания показало наибольший прирост уровня е-АТ на 28-е сутки к белку S-100, NF-200 и ОБМ, что вполне может объяснить разнообразие симптомов COVID-19 и длительные последствия коронавирусной инфекции (постковидные синдромы) у больных, перенесших острые cerebrovasкулярные катастрофы.

3. Исследование нейротропных аутоантител с помощью ЭЛИ-Нейро-теста может служить дополнительным методом иммунологического мониторинга состояния нервной системы при COVID-19. Изученные аутоантитела могут служить в качестве нейровоспалительных, нейроиммунных, нейрокогнитивных, нейродегенеративных маркеров для уточнения диагноза, выявления тяжести и прогнозирования течения ишемического церебрального инсульта на фоне COVID-19.

4. Полученные свидетельства участия естественных нейротропных антител расширяют существующие в настоящее время представления о дисрегуляторных механизмах нейроиммунных взаимодействий при COVID-19 и в дальнейшем

могут являться основой для разработки дополнительной иммунотерапии при данном заболевании.

Заявление о конфликте интересов

Исследование не имело спонсорской поддержки. Конфликт интересов отсутствует. Авто-

ры несут полную ответственность за предоставление окончательной версии рукописи в печать. Все авторы принимали участие в разработке концепции статьи и написании рукописи. Окончательная версия рукописи была одобрена всеми авторами.

Список литературы / References

1. Абдуллаева М.И. Естественные нейротропные аутоантитела к нейрорецепторам при хронической алкогольной интоксикации // Вестник ТМА, 2019. № 2. С. 50-53. [Abdullayeva M.I. Natural neurotropic autoantibodies to neuroreceptors at chronic alcohol intoxication. *Vestnik TMA = Bulletin of the Tashkent Medical Academy*, 2019, Vol. 2, pp. 50-53. (In Russ.)]
2. Алферова В., Гехт Б., Полетаев А.Б., Абросимова А.А., Беликова Л.П., Чумакова А.А., Николаева Т.Я., Гусев Е.И. Нейротропные естественные аутоантитела класса IgG в сыворотке крови больных с ишемическим инсультом // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова, 2008. Т. 108, № 1. С. 56-60. [Alferova V.V., Gekht A.B., Poletaev A.B., Abrosimova A.A., Belikova L.P., Chumakova A.A., Nikolaeva T.Ia., Gusev E.I. Natural neurotrophic IgG autoantibodies in the blood serum of patients with different clinical outcomes after ischemic stroke. *Zhurnal nevrologii i psikhiatrii im. S.S. Korsakova = S. Korsakov Journal of Neurology and Psychiatry*, 2008, Vol. 108, no. 1, pp. 56-60. (In Russ.)]
3. Временные методические рекомендации «Профилактика, диагностика и лечение новой коронавирусной инфекции (COVID-19)», версия 10, утверждены Минздравом России, 08.02.2021. [Электронный ресурс]. Режим доступа: https://static-0.minzdrav.gov.ru/system/attachments/attaches/000/054/662/original/Vremennye_MP_COVID-19_%28v.10%29.pdf. [Temporary guidelines "Prevention, diagnosis and treatment of new coronavirus infection (COVID-19)", version 10, approved by the Ministry of Health of Russia, 08.02.2021]. [Electronic resource]. Access mode: https://static-0.minzdrav.gov.ru/system/attachments/attaches/000/054/662/original/Vremennye_MP_COVID-19_%28v.10%29.pdf.
4. Временные методические рекомендации «Профилактика, диагностика и лечение новой коронавирусной инфекции (COVID-19)», версия 15, утверждены Минздравом России, 22.02.2022. [Электронный ресурс]. Режим доступа: https://static-0.minzdrav.gov.ru/system/attachments/attaches/000/059/392/original/BMP_COVID-19_V15.pdf. [Temporary guidelines "Prevention, diagnosis and treatment of new coronavirus infection (COVID-19)", version 15, approved by the Ministry of Health of Russia, 22.02.2022]. [Electronic resource]. Access mode: https://static-0.minzdrav.gov.ru/system/attachments/attaches/000/059/392/original/BMP_COVID-19_V15.pdf.
5. Горбатов В.Ю., Фомина В.Г., Давыдова Т.В. Влияние антител к глутамату на память крыс с экспериментальной болезнью Альцгеймера // Нейроиммунология, 2009. Т. 8, № 1. С. 26-27. [Gorbatov V.Yu., Fomina V.G., Davydova T.V. The effect of antibodies to glutamate on the memory of rats with experimental Alzheimer's disease. *Neyroimmunologiya = Journal of Neuroimmunology*, 2009, Vol. 8, no. 1, pp. 26-27. (In Russ.)]
6. Давыдова Т.В., Воскресенская Н.И., Горбатов В.Ю., Фомина В.Г., Доронина О.А., Максимова И.В. Особенности образования аутоантител к глутамату при деменциях альцгеймеровского типа // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины, 2009. Т. 147, № 4. С. 385-387. [Davydova T.V., Voskresenskaya N.I., Gorbatov V.Yu., Fomina V.G., Doronina O.A., Maksunova I.V. Features of the formation of autoantibodies to glutamate in Alzheimer's type dementia. *Byulleten eksperimentalnoy biologii i meditsiny = Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 2009, Vol. 147, no. 4, pp. 385-387. (In Russ.)]
7. Заболотная С.В., Боголепова А.Н., Таирова Р.Т. COVID-19-ассоциированный инсульт // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. Спецвыпуски, 2021. Т. 121, № 8-2. С. 5-10. [Zabolotnaya S.V., Bogolepova A.N., Tairova R.T. COVID-19-associated stroke. *Zhurnal nevrologii i psikhiatrii im. S.S. Korsakova = S. Korsakov Journal of Neurology and Psychiatry*, 2021, Vol. 121, no. 8-2, pp. 5-10. (In Russ.)]
8. Мягкова М.А., Петроченко С.Н., Орлова Е.А. Анализ естественных антител к глутамату и ГАМК для оценки тренировочного процесса спортсмена // Современные проблемы науки и образования. 2018. № 5. [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://science-education.ru/ru/article/view?id=27984>. [Myagkova M.A., Petrochenko S.N., Orlova E.A. Analysis of natural antibodies to glutamate and GABA for evaluation of the training process of the athlete. *Sovremennye problemy nauki i obrazovaniya = Modern Problems of Science and Education*, 2018, no. 5. [Electronic resource]. Access mode: <https://science-education.ru/ru/article/view?id=27984>. (In Russ.)]
9. Насонов Е.Л., Бекетова Т.В., Решетняк Т.М., Лиля А.М., Ананьева Л.П., Лисицына Т.А., Соловьев С.К. Коронавирусная болезнь 2019 (COVID-19) и иммуновоспалительные ревматические заболевания: на перекрестке проблем тромбовоспаления и аутоиммунитета // Научно-практическая ревматология, 2020. Т. 58, № 4. С. 353-367. [Nasonov E.L., Beketova T.V., Reshetnyak T.M., Lila A.M., Ananieva L.P., Lisitsyna T.A.,

Soloviev S.K. Coronavirus disease 2019 (COVID-19) and immune-mediated inflammatory rheumatic diseases: at the crossroads of thromboinflammation and autoimmunity. *Nauchno-prakticheskaya revmatologiya = Rheumatology Science and Practice*, 2020, Vol. 58, no. 4, pp. 353-367. (In Russ.)]

10. Орлова В.А., Михайлова И.И., Минутко В.Л., Симонова А.В., Погодина Е.А. Аномалии уровней сывороточных аутоантител к антигенам нервной ткани у больных шизоаффективным психозом: связь с вирусами группы герпеса // Доктор Ру, 2020. Т. 19, № 4. С. 43-49. [Orlova VA, Mikhailova II, Minutko VL, Simonova AV, Pogodina EA. Abnormal Serum Levels of Autoantibodies to Neural Tissue Antigens in Patients with Schizoaffective Psychosis: Relationship with Herpes Viruses. *Doktor Ru = Doctor.Ru*, 2020, Vol. 19, no. 4, pp. 43-49. (In Russ.)]

11. Полетаев А.Б., Алферова В.В., Абросимова А.А., Комиссарова И.А., Соколов М.А., Гусев Е.И. Естественные нейротропные аутоантитела и патология нервной системы // Нейроиммунология, 2003. № 1 (1). С. 11-17. [Poletaev A.B., Alferova V.V., Abrosimova A.A., Komissarova I.A., Sokolov M.A., Gusev E.I. Natural neurotropic autoantibodies and pathology of the nervous system. *Neyroimmunologiya = Journal of Neuroimmunology*, 2003, Vol. 1, no. 1, pp. 11-17. (In Russ.)]

12. Полетаев А.Б. Иммунофизиология и иммунопатология. М.: МИА, 2008. 207 с. [Poletaev A.B. Immunophysiology and immunopathology]. Moscow: MIA, 2008. 207 p.

13. Петриков С.С., Боровкова Н.В., Попугаев К.А., Сторожева М.В., Квасников А.М., Годков М.А. Аутоантитела к интерферону альфа и их значение при COVID-19 // Инфекция и иммунитет, 2022. Т. 12, № 2. С. 279-287. [Petrikov S.S., Borovkova N.V., Popugaev K.A., Storozheva M.V., Kvasnikov A.M., Godkov M.A. Anti-interferon alpha autoantibodies and their significance in COVID-19. *Infection and Immunity = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2022, Vol. 12, no. 2, pp. 279-287. (In Russ.)] doi: 10.15789/2220-7619-AAA-1789.

14. Расулова Х.А., Азизова Р.Б. Естественные нейротропные аутоантитела в сыворотке крови больных, страдающих эпилепсией // Вестник Российской академии медицинских наук, 2014. № 5-6. С. 111-115. [Rasulova Kh.A., Azizova R.B. Natural neurotropic autoantibodies in blood serum of epilepsy patients. *Vestnik Rossiyskoy akademii meditsinskikh nauk = Annals of the Russian Academy of Medical Sciences*, 2014, Vol. 5-6, pp. 111-115. (In Russ.)]

15. Романова Г.А., Шакова Ф.М., Горбатов В.Ю., Квашенникова Ю.Н., Давыдова Т.В. Антитела к глутамату при экспериментальном ишемическом повреждении головного мозга // Нейроиммунология, 2009. Т. 8, № 1. С. 89. [Romanova G.A., Shakova F.M., Gorbатов V.Yu., Kvashennikova Yu.N., Davydova T.V. Antibodies to glutamate in experimental ischemic brain injury. *Neyroimmunologiya = Journal of Neuroimmunology*, 2009, Vol. 8, no. 1, p. 89. (In Russ.)]

16. Черний В.И., Городник Г.А., Куглер С.Е. Оценка степени повреждения мозговой ткани методом иммунохимического анализа в острейшем периоде ишемического инсульта // Международный неврологический журнал, 2014. №. 4 (66). С. 53-58. [Cherniy V.I., Gorodnik G.A., Kugler S.E. Assessment of brain tissue damage level using immuchemical assay in peracute ischemic stroke. *Mezhdunarodnyy nevrologicheskiy zhurnal = International Journal of Neurology*, 2014, no. 4 (66), pp. 53-58. (In Russ.)]

17. Ariño H., Gresa-Arribas N., Blanco Y., Martínez-Hernández E., Sabater L., Petit-Pedrol M., Rouco I., Bataller L., Dalmau J.O., Saiz A., Graus F. Cerebellar ataxia and glutamic acid decarboxylase antibodies: immunologic profile and long-term effect of immunotherapy. *JAMA Neurol.*, 2014, Vol. 71, no. 8, pp. 1009-1016.

18. Arumugam T., Simeone D.M., Schmidt A.M., Logsdon C.D. S100P stimulates cell proliferation and survival via receptor for activated glycation products (RAGE). *J. Biol. Chem.*, 2004, Vol. 279, no. 7, pp. 5059-5065.

19. Boronat A., Sabater L., Saiz A., Dalmau J., Graus F. GABA(B) receptor antibodies in limbic encephalitis and anti-GAD-associated neurologic disorders. *Neurology*, 2011, Vol. 76, no. 9, pp. 795-800.

20. Crowe J.E. Jr. Human antibodies for viral infections. *Annu. Rev. Immunol.*, 2022, Vol. 40, pp. 349-386.

21. Dhamoon M.S., Thaler A., Gururangan K., Kohli A., Sisniega D., Wheelwright D., Mensching C., Fifi J.T., Fara M.G., Jette N., Cohen E., Dave P., DiRisio A.C., Goldstein J., Loebel E.M., Mayman N.A., Sharma A., Thomas D.S., Vega Perez R.D., Weingarten M.R., Wen H.H., Tuhirim S., Stein L.K.; Mount Sinai Stroke Investigators*. Acute Cerebrovascular Events With COVID-19 Infection. *Stroke*, 2021, Vol. 52, no. 1, pp. 48-56.

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

23. Mao L., Jin H., Wang M., Hu Y., Chen S., He Q., Chang J., Hong C., Zhou Y., Wang D., Miao X., Li Y., Hu B. Neurologic manifestations of hospitalized patients with coronavirus disease 2019 in Wuhan, China. *JAMA Neurol.*, 2020, Vol. 77, no. 6, pp. 683-690.

24. Nepal G., Rehrig J.H., Shrestha G.S., Shing Y.K., Yadav J.K., Ojha R., Pokhrel G., Tu Z.L., Huang D.Y. Neurological manifestations of COVID-19: a systematic review. *Crit. Care*, 2020, Vol. 24, no. 1, 421. doi: 10.1186/s13054-020-03121-z.

25. Pantaleo G., Correia B., Fenwick C., Joo V.S., Perez L. Antibodies to combat viral infections: development strategies and progress. *Nat. Rev. Drug Discov.*, 2022, Vol. 21, no. 9, pp. 676-696.

26. Sarioğlu E., Yilmaz Sarialtin S., Çoban T. Neurological complications and potential effects of COVID-19: Symptoms and conceivable mechanisms. *Brain Hemorrhages*, 2023. doi: 10.1016/j.hest.2023.02.001.

27. Vabret N., Britton G.J., Gruber C., Hegde S., Kim J., Kuksin M., Levantovsky R., Malle L., Moreira A., Park M.D., Pia L., Risson E., Saffern M., Salomé B., Esai Selvan M., Spindler M.P., Tan J., van der Heide V., Gregory J.K., Alexandropoulos K., Bhardwaj N., Brown B.D., Greenbaum B., Gümüş Z.H., Homann D., Horowitz A., Kamphorst A.O., Curotto de Lafaille M.A., Mehandru S., Merad M., Samstein R.M.; Sinai Immunology Review Project. Immunology of COVID-19: Current State of the Science. *Immunity*, 2020, Vol. 52, no. 6, pp. 910-941.

28. van der Linden J., Almskog L., Liliequist A., Grip J., Fux T., Rysz S., Ågren A., Oldner A., Ståhlberg M. Thromboembolism, hypercoagulopathy, and antiphospholipid antibodies in critically ill Coronavirus disease 2019 patients: a before and after study of enhanced anticoagulation. *Crit. Care Explor.*, 2020, Vol. 2, no. 12, e0308. doi: 10.1097/CCE.0000000000000308.

29. Wąsik N., Sokół B., Hołysz M., Mańko W., Juszkat R., Jagodziński P.P., Jankowski R. Serum myelin basic protein as a marker of brain injury in aneurysmal subarachnoid haemorrhage. *Acta Neurochir. (Wien)*, 2020, Vol. 162, no. 3, pp. 545-552.

Авторы:

Расулова Х.А. — д.м.н., доцент, заместитель директора по научным работам и инновациям, Термезский филиал Ташкентской медицинской академии, г. Термез, Республика Узбекистан

Расулова М.А. — соискатель кафедры медицинской психологии, неврологии и психиатрии, Термезский филиал Ташкентской медицинской академии, г. Термез, Республика Узбекистан

Authors:

Rasulova Kh.A., PhD, MD (Medicine), Associate Professor, Termez Affiliation of Tashkent Medical Academy, Termez, Republic of Uzbekistan

Rasulova M.A., Research Fellow, Department of Medical Psychology, Neurology and Psychiatry, Termez Affiliation of Tashkent Medical Academy, Termez, Republic of Uzbekistan

Поступила 05.07.2023
Отправлена на доработку 10.10.2023
Принята к печати 19.10.2023

Received 05.07.2023
Revision received 10.10.2023
Accepted 19.10.2023

АНТИИДИОТИПИЧЕСКИЕ АУТОАНТИТЕЛА, СПЕЦИФИЧНЫЕ К СТЕРОИДНЫМ ГОРМОНАМ, И ПРОЛИФЕРАТИВНАЯ АКТИВНОСТЬ ОПУХОЛИ У БОЛЬНЫХ РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Глушков А.Н.¹, Поленок Е.Г.¹, Мун С.А.¹, Гордеева Л.А.¹,
Антонов А.В.², Байрамов П.В.², Вержбицкая Н.Е.²,
Колпинский Г.И.^{3,4}

¹ ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр угля и углехимии Сибирского отделения Российской академии наук», г. Кемерово, Россия

² ГБУЗ «Кузбасский клинический онкологический диспансер имени М.С. Раппопорта», г. Кемерово, Россия

³ ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный медицинский университет», г. Кемерово, Россия

⁴ ГАУЗ «Клинический консультативно-диагностический центр имени И.А. Колпинского», г. Кемерово, Россия

Резюме. В экспериментах *in vitro* показано внегеномное биологическое действие антител, специфичных к мембранным рецепторам стероидных гормонов. В сыворотке крови больных раком молочной железы (РМЖ) обнаружены аутоантитела против эстрогеновых рецепторов (ER), содержание которых коррелировало с пролиферативной активностью опухоли, определяемой по наличию протеина Ki-67. Такие антитела были способны индуцировать пролиферацию опухолевых клеток *in vitro*. Такой же активностью обладали антиидиотипические антитела против моноклонального антитела, специфичного к эстрадиолу. Однако участие аутоантител, специфичных к рецептору прогестерона (PR), оставалось неизвестным. Цель настоящей работы – исследовать взаимосвязи сывороточных антиидиотипических аутоантител, специфичных к эстрадиолу и прогестерону (IgG₂-E2 и IgG₂-Pg) с содержанием в опухоли протеина Ki-67 у больных РМЖ. Исследовали IgG₂-E2 и IgG₂-Pg в 204 образцах сыворотки здоровых женщин и 663 образцах сыворотки больных РМЖ с ER⁺/PR⁺ опухолями с помощью ELISA, используя моноклональные антитела против E2 и Pg в качестве адсорбированных антигенов. Ki-67, ER и PR в опухолях исследовали с помощью иммуногистохимических методов. У больных РМЖ I стадии высокие уровни IgG₂-E2 встречались чаще, чем у здоровых женщин (63,9% против 40,2%, $p < 0,001$). У больных РМЖ I стадии с содержанием в опухоли Ki-67 > 14 высокие уровни IgG₂-E2 обнаруживали чаще, чем при Ki-67 ≤ 14 (68,9% против 56,9%, $p = 0,03$). Аналогичные взаимосвязи IgG₂-Pg с Ki-67 у больных РМЖ I стадии отсутствовали. Одновременно низкие индиви-

Адрес для переписки:

Мун Стелла Андреевна
Институт экологии человека ФГБНУ «Федеральный
исследовательский центр угля и углехимии Сибирского
отделения Российской академии наук»
650065, Россия, г. Кемерово, Ленинградский пр., 10.
Тел.: 8 (3842) 57-50-79, 8 (983) 214-71-54.
E-mail: stellamun@yandex.ru

Address for correspondence:

Stella A. Mun
Institute of Human Ecology, Federal Research Center of Coal
and Coal Chemistry, Siberian Branch, Russian Academy
of Sciences
10 Leningradsky Ave
Kemerovo
650065 Russian Federation
Phone: +7 (3842) 57-50-79, +7 (983) 214-71-54.
E-mail: stellamun@yandex.ru

Образец цитирования:

А.Н. Глушков, Е.Г. Поленок, С.А. Мун, Л.А. Гордеева,
А.В. Антонов, П.В. Байрамов, Н.Е. Вержбицкая,
Г.И. Колпинский «Антиидиотипические
аутоантитела, специфичные к стероидным гормонам,
и пролиферативная активность опухоли у больных
раком молочной железы» // Медицинская иммунология,
2024. Т. 26, № 6. С. 1269-1278.
doi: 10.15789/1563-0625-AIA-2874

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

For citation:

A.N. Glushkov, E.G. Polenok, S.A. Mun, L.A. Gordeeva,
A.V. Antonov, P.V. Bairamov, N.E. Verzhbitskaya,
G.I. Kolpinsky "Anti-idiotypic antibodies specific to steroid
hormones and proliferative activity of tumor in breast cancer
patients", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya
Immunologiya, 2024, Vol. 26, no. 6, pp. 1269-1278.
doi: 10.15789/1563-0625-AIA-2874

© Glushkov A.N. et al., 2024
The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License
DOI: 10.15789/1563-0625-AIA-2874

дуальные уровни IgG₂-E2 и IgG₂-Pg у больных РМЖ I стадии с Ki-67 ≤ 14 обнаруживали в 55,2%, а с Ki-67 > 30 — в 22,4%. Одновременно высокие уровни IgG₂-E2 и IgG₂-Pg выявлены у 35,7% больных I стадией РМЖ с Ki-67 ≤ 14 и у 28,6% с Ki-67 > 30 (p = 0,03). У больных РМЖ II-IV стадиями с содержанием в опухоли Ki-67 > 30, наоборот, высокие уровни IgG₂-E2 встречались реже, чем при Ki-67 ≤ 14 (49,1% против 64,2%, p = 0,03). Аналогичная взаимосвязь имела место при анализе IgG₂-Pg (47,2% против 62,2%, p = 0,03). Одновременно высокие индивидуальные уровни IgG₂-E2 и IgG₂-Pg у больных РМЖ II-IV стадиями обнаруживали при Ki-67 ≤ 14 и Ki-67 > 30 в 38,0% и 37,0% соответственно. При одновременно низких уровнях исследуемых антител или одного из них (при высоких уровнях другого) соответствующие показатели составили 21,5% и 53,9% (p = 0,003). Таким образом, одновременно высокие уровни IgG₂-E2 и IgG₂-Pg ассоциированы с высокой пролиферативной активностью ER⁺/PR⁺ РМЖ на начальных этапах канцерогенеза (на I стадии) и с низкой при последующем росте опухоли (на II-IV стадиях).

Ключевые слова: рак молочной железы, антиидиотипические антитела к прогестерону, антиидиотипические антитела к эстрадиолу, Ki-67, рецептор прогестерона, рецептор эстрадиола

ANTI-IDIOTYPIC ANTIBODIES SPECIFIC TO STEROID HORMONES AND PROLIFERATIVE ACTIVITY OF TUMOR IN BREAST CANCER PATIENTS

Glushkov A.N.^a, Polenok E.G.^a, Mun S.A.^a, Gordeeva L.A.^a,
Antonov A.V.^b, Bairamov P.V.^b, Verbitskaya N.E.^b, Kolpinsky G.I.^{c,d}

^a Federal Research Center of Coal and Coal Chemistry, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Kemerovo, Russian Federation

^b M. Rappoport Kuzbass Clinical Oncological Dispensary, Kemerovo, Russian Federation

^c Kemerovo State Medical University, Kemerovo, Russian Federation

^d I. Kolpinsky Clinical Consulting and Diagnostic Center, Kemerovo, Russian Federation

Abstract. Nongenomic effects of antibodies specific to membrane steroid receptors are well known. Auto-antibodies against estrogen receptor (ER) were revealed in blood serum of breast cancer patients (BCP). Their serum levels correlated with Ki-67, a protein tumor proliferation marker. Purified antibodies stimulated *in vitro* proliferation of cultured MCF-7 tumor cells. Antiidiotypic antibodies against monoclonal antibodies, specific to estradiol, showed similar agonist activity. However, the function of auto-antibodies against progesterone receptor (PR) remained unknown. The purpose of this study was to search for an association between serum antiidiotypic antibodies specific to estradiol and progesterone (IgG₂-E2 and IgG₂-Pg), and expression of Ki-67 tumor protein in BCP. The IgG₂-E2 and IgG₂-Pg were studied in 204 healthy women and 663 BCP with ER⁺/PR⁺ tumors using ELISA technique with adsorbed monoclonal antibodies against E2 and Pg. Ki-67, ER and PR were detected by immunohistochemical methods. High levels of IgG₂-E2 in stage I BCP were detected more frequently than in healthy women (63.9% vs 40.2%, p < 0.001), being more common in cases with Ki-67 > 14, than with tumors with Ki-67 ≤ 14 (63.9% vs 56.9%, p = 0.03). Similar association of IgG₂-Pg with Ki-67 was not revealed. The individually low levels of both IgG₂-E2 and IgG₂-Pg in stage I BCP with Ki-67 ≤ 14 tumors were found in 55.2%, compared to 22.4% in cases with Ki-67 > 30. The cooperatively high IgG₂-E2 and IgG₂-Pg levels were detected in 35.7% of stage I BCP with Ki-67 ≤ 14 tumors and in 28.6% with Ki-67 > 30 cases (p = 0.03). On the contrary, high IgG₂-E2 levels in BCP II-IV stages with tumor Ki-67 > 30 were less common, than with Ki-67 ≤ 14 (49.1% vs 64.2%, p = 0.03). Similar association was found with IgG₂-Pg (47.2% vs 62.2%, p = 0.03). The cooperatively high individual IgG₂-E2 and IgG₂-Pg levels were detected in BCP at II-IV stages with Ki-67 ≤ 14 and Ki-67 > 30 (respectively, 38.0% and 37.0%). These indices comprised 21.5% and 53.9% when the levels of studied antibodies were low (p = 0.003). In conclusion, high individual levels of both IgG₂-E2 and IgG₂-Pg were associated with high proliferative activity of ER⁺/PR⁺ breast cancer at initial tumor growth (stage I), and with low proliferation rates at subsequent tumor growth (stages II-IV).

Keywords: breast cancer, antibodies, anti-idiotypic, progesterone-specific, estradiol-specific, Ki-67, progesterone receptor, estradiol receptor

Введение

Повсеместный рост заболеваемости раком молочной железы (РМЖ) у женщин остается наиболее актуальной проблемой в плане доклинической диагностики, профилактики и лечения [14]. Не вызывает сомнений роль половых стероидных гормонов в возникновении и росте РМЖ [7]. В частности, показано, что эстрадиол (E2) усиливает прогрессию РМЖ [8], а прогестерон (Pg) ингибирует пролиферацию опухолевых клеток, экспрессирующих рецепторы E2 [11].

Хорошо изучены геномные эффекты стероидных гормонов после их связывания с цитоплазматическими рецепторами и транслокации гормон-рецепторных комплексов в ядро. Вместе с тем известно и внегеномное действие стероидных гормонов, опосредованное мембранными рецепторами E2 и Pg (ER и PR) [3, 6].

Внегеномными эффектами обладают и антитела, специфичные к мембранным стероидным рецепторам, как было показано в экспериментах *in vitro* на различных клеточных моделях. Причем в одних случаях такие антитела выступали как антагонисты соответствующего гормона [9, 12], а в других — как агонисты, т. е. имитировали биологическое действие гормона [15]. В последних экспериментах в качестве антител против ER использовали полученные этими авторами антиидиотипические антитела, направленные против моноклонального антитела, специфичного к E2.

В сыворотке крови больных РМЖ обнаружены аутоантитела против ER, содержание которых прямо коррелировано с пролиферативной активностью опухоли, определяемой по наличию маркера пролиферации — протеина Ki-67. Антитела, выделенные из сыворотки больных РМЖ, были способны распознавать ER эпитопы на поверхности ER⁺ опухолевых клеток линии MCF-7 и индуцировать их пролиферацию [10]. Вместе с тем функции аутоантител против PR, потенциально способных моделировать пролиферативную активность опухолевых клеток, остались неизвестными.

Роль аутоантител против ER и PR могут выполнять антиидиотипические антитела, специфичные к моноклональным антителам против E2 и Pg, уровень которых при определенных условиях оказался выше у больных РМЖ I стадии с ER⁺/PR⁺ опухолями, чем у здоровых женщин [1]. Однако взаимосвязи антиидиотипических аутоантител к стероидным гормонам с пролиферативной активностью опухоли не были исследованы. В том числе оставались неизученными особенности иммуномодуляции пролиферативной активности опухоли такими антителами на различных стадиях заболевания.

Цель настоящей работы — исследовать взаимосвязи сывороточных антиидиотипических аутоантител, специфичных к эстрадиолу и прогестерону (IgG₂-E2 и IgG₂-Pg), с содержанием в опухоли протеина Ki-67 у больных РМЖ.

Материалы и методы

Нами были обследованы 867 женщин в постменопаузе. В исследуемую группу вошли 663 женщины с первично установленным диагнозом «инвазивная карцинома молочной железы неспецифического типа». Все женщины исследуемой группы впервые обратились в Кузбасский клинический онкологический диспансер г. Кемерово. По TNM классификации у большинства женщин была выявлена I и II стадии заболевания (49,3% и 37,6% соответственно), III и IV стадии были выявлены у 12,4% и 0,7% женщин соответственно. Наличие ER, PR и Ki-67 исследовали с помощью стандартных иммуногистохимических методов. Медиана возраста всех женщин составила 65 года (интерквартильный размах 60-71). В группу сравнения были включены 204 условно здоровых женщины без патологии молочной железы. У здоровых женщин медиана возраста составила 57 лет (интерквартильный размах 53-61).

Периферическую кровь для иммуноанализа забирали в соответствии с этическими принципами Хельсинкской декларации (2013) и согласно «Правилам клинической практики в Российской Федерации» (Приказ Минздрава РФ № 266 от 19.06.2003 г.). У всех женщин было взято письменное информированное согласие на участие в обследовании.

Антиидиотипические антитела, специфичные к E2 и Pg (IgG₂-E2, IgG₂-Pg), определяли с помощью коммерческих наборов «ИммуноФА-Эстрадиол» и «ИммуноФА-ПГ» (ЗАО НВО «Иммуно-тех», Москва, Россия) с иммобилизованными на пластике моноклональными антителами против E2 в Pg. Перед внесением образцов сыворотки крови в лунки планшета закапывали блокирующий буферный раствор, содержащий 0,5% бычьего сывороточного альбумина и 0,05% Твин-20, для исключения неспецифической сорбции. Сыворотку крови разводили 1/100 в блокирующем буферном растворе, в лунки вносили по 100 мкл и инкубировали на термостатируемом шейкере при 37 °С в течение 1 ч. Для определения связавшихся с моноклональными антителами против E2 и Pg искомым антиидиотипическим антител в лунки планшета вносили по 100 мкл козьих антител против IgG человека, меченных пероксидазой хрена (Invitrogen, США), с разведением 1/30 000. Инкубировали на термостатируемом шейкере при 37 °С в течение 1 ч. После каждого этапа инкубации планшеты отмывались 4-5 раз натрий-

фосфатным буферным раствором, содержащим 0,05% Твин-20, по 250 мкл в каждую лунку. На последнем этапе в лунки вносили по 100 мкл субстратного буферного раствора, содержащего хромоген 3,3',5,5'-тетраметилбензидин, инкубировали 4 мин в темноте и затем измеряли оптическую плотность на фотометре Multiscan FC (Thermo Scientific, Финляндия) при длине волны 450 нм. Уровни IgG₂-E2 и IgG₂-Pg выражали в условных единицах и рассчитывали по формуле:

$$\text{IgG}_2 - X = (\text{OD}_{\text{Х-МАТ}} - \text{OD}_{\text{фон}}) / \text{OD}_{\text{фон}},$$

где X = E2 или Pg; OD_{Х-МАТ} — оптическая плотность связывания сывороточных антиидиотипических антител с моноклональными антителами (МАТ) против E2 или Pg, OD_{фон} — оптическая плотность фонового связывания меченных пероксидазой хрена козьих антител против IgG человека с моноклональными антителами против E2 или Pg без добавления сыворотки крови.

Все полученные данные обрабатывали с помощью программы Statistica 8.0 (StatSoft Inc., США). Тип распределения исследуемых показателей оценивали с помощью W-критерия Шапиро—Уилка. Так как распределение показателей имело ненормальный характер, в дальнейшем использовали непараметрический критерий χ^2 с поправкой Йейтса на непрерывность вариации. Критический уровень значимости принимался

$p < 0,05$. С помощью ROC-анализа [4] были рассчитаны значения порогов отсечения антител (cut-off value), по которым сравниваемые группы имели оптимальные различия. Ассоциации антиидиотипических антител с риском возникновения РМЖ оценивали с помощью величины отношения шансов (OR) с доверительным интервалом (CI) при 95% уровне значимости.

Результаты

Сначала рассчитали пороговые значения (cut-off) уровней исследуемых антиидиотипических антител, по которым больные ER⁺/PR⁺ РМЖ I стадии с содержанием в опухоли Ki-67 ≤ 14 и Ki-67 > 30 имели максимальные различия. Такими оказались 3,5 для IgG₂-E2 и 2,5 для IgG₂-Pg. Затем сравнили здоровых женщин и больных РМЖ I стадии с различным содержанием в опухоли Ki-67 положительных клеток в зависимости от низких и высоких уровней указанных антител.

Оказалось (табл. 1), что у больных ER⁺/PR⁺ РМЖ I стадии высокие уровни IgG₂-E2 $> 3,5$ встречались чаще, чем у здоровых женщин (63,9% против 40,2%, $p < 0,001$, OR = 2,6). При этом удельный вес случаев с высоким содержанием в сыворотке IgG₂-E2 $> 3,5$ составил 56,9% для больных с содержанием в опухоли Ki-67 ≤ 14 ($p = 0,003$, OR = 2,0); 68,8% для Ki-67 в интервале

ТАБЛИЦА 1. ЧИСЛО (n) И ЧАСТОТА ВСТРЕЧАЕМОСТИ (%) НИЗКИХ ($\leq$) И ВЫСОКИХ ($>$) УРОВНЕЙ АНТИИДИОТИПИЧЕСКИХ АНТИТЕЛ, СПЕЦИФИЧНЫХ К ЭСТРАДИОЛУ И ПРОГЕСТЕРОНУ (IgG₂-E2 и IgG₂-Pg), В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ЗДОРОВЫХ ЖЕНЩИН И БОЛЬНЫХ РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ (РМЖ) I СТАДИИ С ER⁺/PR⁺ ТИПОМ ОПУХОЛИ И С РАЗНЫМ УРОВНЕМ Ki-67

TABLE 1. NUMBER (n) AND PREVALENCE (%) OF LOW ($\leq$) AND HIGH ($>$) LEVELS OF ANTI-IDIOtypic ANTIBODIES SPECIFIC TO ESTRADIOL AND PROGESTERONE (IgG₂-E2 AND IgG₂-Pg) IN THE BLOOD SERUM OF HEALTHY WOMEN AND PATIENTS WITH STAGE I BREAST CANCER (BCP) WITH ER⁺/PR⁺ TUMOR TYPE AND WITH DIFFERENT LEVELS OF Ki-67

Группы Groups	IgG ₂ -E2 $\leq 3,5$	IgG ₂ -E2 $> 3,5$	IgG ₂ -Pg $\leq 2,5$	IgG ₂ -Pg $> 2,5$
	n/% χ^2 (p) OR (95% CI)	n/% χ^2 (p) OR (95% CI)	n/% χ^2 (p) OR (95% CI)	n/% χ^2 (p) OR (95% CI)
1. Здоровые женщины 1. Healthy women	122/59,8	82/40,2	87/42,6	117/57,4
2. РМЖ I стадии 2. BCP I stage ER ⁺ /PR ⁺	118/36,1 27,6 ($< 0,001$) 0,4 (0,3-0,5)	209/63,9 27,6 ($< 0,001$) 2,6 (1,8-3,8)	150/45,9 0,4 (0,52) 1,1 (0,8-1,6)	177/54,1 0,4 (0,52) 0,9 (0,6-1,2)
2.1. Ki-67 ≤ 14	59/43,1 8,6 (0,003) 0,5 (0,3-0,8)	78/56,9 8,6 (0,003) 2,0 (1,3-3,1)	70/51,1 2,0 (0,15) 1,4 (0,9-2,2)	67/48,9 2,0 (0,15) 0,7 (0,5-1,1)
2.2. Ki-67 15–30	29/31,2 19,8 ($< 0,001$) 0,3 (0,2-0,5)	64/68,8 19,8 ($< 0,001$) 3,3 (2,0-5,5)	34/36,6 0,7 (0,39) 0,8 (0,5-1,3)	59/63,4 0,7 (0,39) 1,3 (0,8-2,1)
2.3. Ki-67 > 30	30/30,9 20,8 ($< 0,001$) 0,3 (0,2-0,5)	67/69,1 20,8 ($< 0,001$) 3,3 (2,0-5,6)	46/47,4 0,4 (0,51) 1,2 (0,7-2,0)	51/52,6 0,4 (0,51) 0,8 (0,5-1,3)

15–30 ($p < 0,001$, OR = 3,3) и 69,1% для Ki-67 > 30 ($p < 0,001$, OR = 3,3).

Искомых различий между здоровыми женщинами и больными ER⁺/PR⁺ РМЖ I стадии по удельному весу низких и высоких уровней IgG₂-Pg не было выявлено.

Аналогичное сравнение здоровых женщин и больных РМЖ в зависимости от четырех возможных индивидуальных комбинаций низких и высоких уровней IgG₂-E2 и IgG₂-Pg показало следующее (табл. 2). Одновременно низкие уровни исследуемых антител (комбинация 1) встречались у здоровых женщин в 26,9%, а у больных РМЖ с содержанием в опухоли Ki-67 > 30 в 15,5% ($p = 0,04$, OR = 0,5). Высокие уровни IgG₂-E2 > 3,5 с одновременно низкими уровнями IgG₂-Pg ≤ 2,5 (комбинация 2) у здоровых женщин обнаруживали в 15,7%, а у больных РМЖ Ki-67 > 30 в 32,0% ($p < 0,002$, OR = 2,5). Низкие уровни IgG₂-E2 ≤ 3,5 с одновременно высокими IgG₂-Pg > 2,5 (комбинация 3) встречались у 32,8% здоровых женщин, а у больных РМЖ значительно реже (16,1% и ниже) при любом содержании в опухоли Ki-67 положительных клеток ($p = 0,002$ и $p < 0,001$; OR = 0,4). Комбинация 4, с одновременно высокими уровнями исследуемых антител обнаружена у 24,5 здоровых женщин и была значимо выше у больных РМЖ: 48,4% для Ki-67

15–30 ($p = 0,001$ и $p = 2,9$) и 37,1% для Ki-67 > 30 ($p = 0,03$, OR = 1,8).

Безотносительно содержанию в опухоли Ki-67 высокие уровни IgG₂-E2 встречались чаще у больных I стадией РМЖ, чем у здоровых женщин, независимо от уровней IgG₂-Pg. Вместе с тем при низких уровнях IgG₂-E2 низкие уровни IgG₂-Pg обнаруживали с примерно одинаковой частотой у больных (20,5%) и у здоровых (26,9%), а высокие уровни IgG₂-Pg у больных – значительно реже, чем у здоровых (12,5% против 32,8%, $p = 0,011$).

Далее исследовали особенности распределения низких и высоких уровней IgG₂-E2 и IgG₂-Pg у больных ER⁺/PR⁺ РМЖ I и II-IV стадиями с учетом содержания в опухоли Ki-67 положительных клеток. Предварительно выяснили, что у больных II-IV стадиями по сравнению с I стадией удельный вес опухолей с содержанием Ki-67 ≤ 14 снижался с 41,9% до 26,8%, а с Ki-67 > 30 возрастал до 48,5% с 29,7%. Удельный вес больных с количеством Ki-67 положительных клеток в интервале 15–30 в сравниваемых группах был примерно одинаков (28,4% и 24,7%). Различия между больными ER⁺/PR⁺ РМЖ I и II-IV стадиями по содержанию в опухоли Ki-67 оказались статистически значимыми ($p < 0,001$).

В таблице 3 представлены абсолютные значения и удельные веса низких и высоких уровней

ТАБЛИЦА 2. ЧИСЛО (n) И ЧАСТОТА ВСТРЕЧАЕМОСТИ (%) КОМБИНАЦИЙ НИЗКИХ (≤) И ВЫСОКИХ (>) УРОВНЕЙ АНТИИДИОТИПИЧЕСКИХ АНТИТЕЛ, СПЕЦИФИЧНЫХ К ЭСТРАДИОЛУ (IgG₂-E2) И ПРОГЕСТЕРОНУ (IgG₂-Pg), В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ЗДОРОВЫХ ЖЕНЩИН И БОЛЬНЫХ РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ (РМЖ) I СТАДИИ С ER⁺/PR⁺ ТИПОМ ОПУХОЛИ И С РАЗНЫМ УРОВНЕМ Ki-67

TABLE 2. NUMBER (n) AND PREVALENCE (%) OF COMBINATIONS OF LOW (≤) AND HIGH (>) LEVELS OF ANTIIDIOTYPIC ANTIBODIES, SPECIFIC TO ESTRADIOL (IgG₂-E2) AND PROGESTERONE (IgG₂-Pg), IN THE BLOOD SERUM OF HEALTHY WOMEN AND BREAST CANCER PATIENTS (BCP) STAGE I WITH ER⁺/PR⁺ TUMOR TYPE AND DIFFERENT LEVELS OF Ki-67

Комбинации антител Antibodies combinations	Здоровые женщины Healthy women	РМЖ I стадии ER ⁺ /PR ⁺ BCP I stage ER ⁺ /PR ⁺		
		Ki-67 ≤ 14	Ki-67 15-30	Ki-67 > 30
	n/%	n/% χ ² (p) OR (95% CI)	n/% χ ² (p) OR (95% CI)	n/% χ ² (p) OR (95% CI)
1. IgG ₂ -E2 ≤ 3,5 + IgG ₂ -Pg ≤ 2,5	55/26,9	37/27,0 0,01 (0,91) 1,0 (0,6-1,6)	15/16,1 3,6 (0,06) 0,5 (0,3-1,0)	15/15,5 4,2 (0,04) 0,5 (0,3-0,9)
2. IgG ₂ -E2 > 3,5 + IgG ₂ -Pg ≤ 2,5	32/15,7	33/24,1 3,2 (0,07) 1,7 (1,0-2,9)	19/20,4 0,7 (0,40) 1,4 (0,7-2,6)	31/32,0 9,6 (0,002) 2,5 (1,4-4,5)
3. IgG ₂ -E2 ≤ 3,5 + IgG ₂ -Pg > 2,5	67/32,8	22/16,1 11,1 (< 0,001) 0,4 (0,2-0,7)	14/15,1 9,3 (0,002) 0,4 (0,2-0,7)	15/15,5 9,2 (0,002) 0,4 (0,2-0,7)
4. IgG ₂ -E2 > 3,5 + IgG ₂ -Pg > 2,5	50/24,5	45/32,8 2,4 (0,12) 1,5 (0,9-2,4)	45/48,4 15,7 (< 0,001) 2,9 (1,7-4,8)	36/37,1 4,5 (0,03) 1,8 (1,1-3,1)

IgG₂-E2 и IgG₂-Pg у больных РМЖ I и II-IV стадиями с учетом содержания в опухоли Ki-67.

У больных с I стадией РМЖ и содержанием в опухоли Ki-67 > 14 (позиция 1.4) удельный вес случаев с высокими уровнями IgG₂-E2 > 3,5 встречались чаще, чем у больных с содержанием Ki-67 ≤ 14 (позиция 1.1): 69,9% против 56,9%, p = 0,03. У больных со II-IV стадиями РМЖ высокие уровни IgG₂-E2 > 3,5 обнаруживали реже при содержании в опухоли Ki-67 > 30 (позиция 1.3) и Ki-67 > 14 (позиция 1.4): 49,1% и 51,2% против 64,2% при содержании Ki-67 ≤ 14 (позиция 1.1) с p = 0,03 и p = 0,04 соответственно.

Высокие уровни IgG₂-E2 > 3,5 у больных ER⁺/PR⁺ РМЖ II-IV стадиями обнаруживали реже, чем у больных I стадией (позиция 1; 54,8% против 63,9%, p = 0,017). Эти различия были статистически значимыми только при сравнении больных с высоким содержанием в опухоли Ki-67 > 30 (позиция 1.3: 49,1% против 69,1%, p = 0,003) и Ki-67 > 14 (позиция 1.4: 51,2% против 69,9%, p < 0,001).

Аналогичные сравнения больных с I и II-IV стадиями с учетом содержания в сыворотке IgG₂-Pg показали следующее. У больных I стадией РМЖ не выявлено искомым взаимосвязей

IgG₂-Pg с Ki-67 в опухоли. У больных II-IV стадиями РМЖ и высоким содержанием в опухоли Ki-67 > 30 (позиция 1.3) уровни IgG₂-Pg > 2,5 встречались реже, чем у больных с Ki-67 ≤ 14 (позиция 1.1): 47,2% против 62,2%, (p = 0,03) и реже, чем у больных с Ki-67 ≤ 30 (позиция 1.5, 59,0% p = 0,04).

Статистически значимые различия между больными РМЖ I и II-IV стадиями по уровням IgG₂-Pg обнаружены только при низком содержании Ki-67 ≤ 14. У больных II-IV стадиями IgG₂-Pg > 2,5 обнаруживали чаще, чем при I стадии (62,2% против 48,9%, p = 0,049).

Результаты исследования взаимосвязей Ki-67 в опухоли с четырьмя возможными комбинациями низких и высоких уровней IgG₂-E2 и IgG₂-Pg в сыворотке крови у больных ER⁺/PR⁺ РМЖ I и II-IV стадий представлены в таблице 4.

У больных с I стадией РМЖ одновременно низкие индивидуальные уровни исследуемых антител обнаружены в 55,2% при низком содержании в опухоли Ki-67 ≤ 14, и в 22,4% при высоком содержании Ki-67 > 30 (комбинация 1). Остальные сочетания низких и высоких уровней IgG₂-E2 и IgG₂-Pg встречались реже при низком содержании в опухоли Ki-67 ≤ 14 (43,1% и ниже)

ТАБЛИЦА 3. ЧИСЛО (n) И ЧАСТОТА ВСТРЕЧАЕМОСТИ (%) НИЗКИХ (≤) И ВЫСОКИХ (>) УРОВНЕЙ АНТИИДИОТИПИЧЕСКИХ АНТИТЕЛ, СПЕЦИФИЧНЫХ К ЭСТРАДИОЛУ (IgG₂-E2) И ПРОГЕСТЕРОНУ (IgG₂-Pg), В СЫВОРОТКЕ КРОВИ БОЛЬНЫХ РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ (РМЖ) I И II-IV СТАДИЙ С ER⁺/PR⁺ ТИПОМ ОПУХОЛИ И С РАЗНЫМ УРОВНЕМ Ki-67

TABLE 3. NUMBER (n) AND PREVALENCE (%) OF LOW (≤) AND HIGH (>) LEVELS OF ANTIIDOTYPIC ANTIBODIES, SPECIFIC TO ESTRADIOL (IgG₂-E2) AND PROGESTERONE (IgG₂-Pg), IN THE BLOOD SERUM OF STAGE I AND STAGES II-IV BREAST CANCER PATIENTS (BCP) WITH ER⁺/PR⁺ TUMOR TYPE AND DIFFERENT LEVELS OF Ki-67

Группы Groups	IgG ₂ -E2				IgG ₂ -Pg			
	РМЖ I стадия BCP I stage		РМЖ II-IV стадии BCP II-IV stages		РМЖ I стадия BCP I stage		РМЖ II-IV стадии BCP II-IV stages	
	≤ 3,5	> 3,5	≤ 3,5	> 3,5	≤ 2,5	> 2,5	≤ 2,5	> 2,5
	n/%	n/%	n/%	n/%	n/%	n/%	n/%	n/%
1. РМЖ ER⁺/PR⁺ 1. BCP ER ⁺ /PR ⁺	118/36,1	209/63,9	152/45,2	184/54,8*	150/45,9	177/54,1	157/46,7	179/53,3
1.1. Ki-67 ≤ 14	59/43,1	78/56,9	32/35,6	58/64,2	70/51,1	67/48,9	34/37,8	56/62,2
1.2. Ki-67 15–30	29/31,2	64/68,8	37/44,6	46/55,4	34/36,6	59/63,4	37/44,6	46/55,4
1.3. Ki-67 > 30	30/30,9	67/69,1	83/50,9	80/49,1**	46/47,4	51/52,6	86/52,8	77/47,2
1.4. Ki-67 > 14	59/31,1	131/69,9	120/48,8	126/51,2***	80/42,1	110/57,9	123/50,0	123/50,0
1.5. Ki-67 ≤ 30	88/38,3	142/61,7	69/24,9	104/75,1	104/45,2	126/54,8	71/41,0	102/59,0
χ² (p) 1.1-1.2-1.3, df = 2	4,9 (0,08)		5,5 (0,06)		4,8 (0,09)		5,4 (0,07)	
χ² (p) 1.1-1.3, df = 1	3,0 (0,08)		4,9 (0,03)		0,2 (0,67)		4,6 (0,03)	
χ² (p) 1.1-1.4, df = 1	4,5 (0,03)		4,1 (0,04)		2,2 (0,13)		3,5 (0,06)	
χ² (p) 1.3-1.5, df = 1	1,3 (0,26)		3,7 (0,05)		0,06 (0,81)		4,2 (0,04)	

Примечание. Различия между I и II-IV стадиями: * χ² (p) = 5,4 (0,02); ** χ² (p) = 9,1 (0,003); *** χ² (p) = 13,2 (< 0,001).

Note. Differences between I and stages II-IV: * χ² (p) = 5.4 (0.02); ** χ² (p) = 9.1 (0.003); *** χ² (p) = 13.2 (< 0.001).

ТАБЛИЦА 4. ЧИСЛО (n) И ЧАСТОТА ВСТРЕЧАЕМОСТИ (%) КОМБИНАЦИЙ НИЗКИХ ($\leq$) И ВЫСОКИХ ($>$) УРОВНЕЙ АНТИИДИОТИПИЧЕСКИХ АНТИТЕЛ, СПЕЦИФИЧНЫХ К ЭСТРАДИОЛУ ($\text{IgG}_2\text{-E2}$) И ПРОГЕСТЕРОНУ ($\text{IgG}_2\text{-Pg}$), В СЫВОРОТКЕ КРОВИ БОЛЬНЫХ РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ (РМЖ) I И II-IV СТАДИЙ С ER^+/PR^+ ТИПОМ ОПУХОЛИ И С РАЗНЫМ УРОВНЕМ Ki-67

TABLE 4. NUMBER (n) AND PREVALENCE (%) OF COMBINATIONS OF LOW ($\leq$) AND HIGH ($>$) LEVELS OF ANTIIDYOTYPIC ANTIBODIES, SPECIFIC TO ESTRADIOL ($\text{IgG}_2\text{-E2}$) AND PROGESTERONE ($\text{IgG}_2\text{-Pg}$), IN THE BLOOD SERUM OF STAGE I AND STAGES II-IV BREAST CANCER PATIENTS (BCP) WITH ER^+/PR^+ TUMOR TYPE AND DIFFERENT LEVELS OF Ki-67

Комбинации антител Antibodies combinations	РМЖ ER^+/PR^+ I стадия BCP I stage ER^+/PR^+ (n = 327)			РМЖ ER^+/PR^+ II-IV стадия BCP II-IV stages ER^+/PR^+ (n = 336)		
	Ki-67 ≤ 14	Ki-67 15-30	Ki-67 > 30	Ki-67 ≤ 14	Ki-67 15-30	Ki-67 > 30
	n/%	n/%	n/%	n/%	n/%	n/%
1. $\text{IgG}_2\text{-E2} \leq 3,5$ + $\text{IgG}_2\text{-Pg} \leq 2,5$	37/55,2	15/22,4	15/22,4	17/21,0	18/22,2	46/56,8*
2. $\text{IgG}_2\text{-E2} > 3,5$ + $\text{IgG}_2\text{-Pg} \leq 2,5$	33/39,8	19/22,9	31/37,3	17/22,4	19/25,0	40/52,6
3. $\text{IgG}_2\text{-E2} \leq 3,5$ + $\text{IgG}_2\text{-Pg} > 2,5$	22/43,1	14/27,5	15/29,4	15/21,1	19/26,8	37/52,1**
4. $\text{IgG}_2\text{-E2} > 3,5$ + $\text{IgG}_2\text{-Pg} > 2,5$	45/35,7	45/35,7	36/28,6	41/38,0	27/25,0	40/37,0
5. Комбинации 5. Combinations 2+3+4	100/38,5	78/30,0	82/31,5	73/28,6	65/25,5	117/45,9
6. Комбинации 6. Combinations 1+2+3	92/45,8	48/23,9	61/30,3	49/21,5	56/24,6	123/53,9
χ^2 (p) 1-2, df = 2	4,6 (0,10)			0,3 (0,87)		
χ^2 (p) 1-3, df = 2	1,7 (0,43)			0,5 (0,79)		
χ^2 (p) 1-4, df = 2	7,1 (0,03)			8,5 (0,02)		
χ^2 (p) 1-5, df = 2	6,2 (0,046)			3,1 (0,21)		
χ^2 (p) 4-6, df = 2	5,8 (0,06)			11,7 (0,003)		

Примечание. Различия между I и II-IV стадиями: * χ^2 (p) = 22,3 (< 0,001); ** χ^2 (p) = 8,3 (0,02).

Note. Differences between I and stages II-IV: * χ^2 (p) = 22.3 (< 0.001); ** χ^2 (p) = 8.3 (0.02).

и чаще при высоком содержании Ki-67 > 30 (28,6 и выше). Статистически значимые различия (p = 0,03) проявились при сравнении больных I стадией РМЖ с одновременно низкими уровнями исследуемых антител с больными, у которых уровни $\text{IgG}_2\text{-E2}$ и $\text{IgG}_2\text{-Pg}$ были одновременно высокими (комбинация 4). Объединение сочетаний 2+3+4 показало, что в этой выделенной подгруппе (комбинация 5) опухоли с низким содержанием Ki-67 ≤ 14 встречались в 38,5%, а с высоким — 31,5%. Различия с 1-й подгруппой тоже были статистически значимыми (p = 0,046).

У больных со II-IV стадиями РМЖ, напротив, одновременно низкие уровни $\text{IgG}_2\text{-E2}$ и $\text{IgG}_2\text{-Pg}$ (комбинация 1) или каждого из них по-отдельности при наличии высокого уровня $\text{IgG}_2\text{-E2}$ или $\text{IgG}_2\text{-Pg}$ (комбинации 2 и 3) обнаруживали реже (22,4% и ниже) при низком со-

держании в опухоли Ki-67 ≤ 14 и чаще (52,1% и выше) при высоком содержании Ki-67 > 30 , чем при одновременно высоких уровнях исследуемых антител (комбинация 4: 38,0% и 37,0%, соответственно). Различия между подгруппами 1 и 4 были статистически достоверными (p = 0,02). Объединение сочетаний 1+2+3 показало, что в этой выделенной подгруппе (комбинация 6) опухоли с Ki-67 ≤ 14 встречались в 21,5%, а Ki-67 > 30 — в 53,9%. Различия с 4 подгруппой оказались более значимыми (p = 0,003).

Снижение удельного веса больных с низким содержанием в опухоли Ki-67 ≤ 14 и соответствующее повышение — Ki-67 > 30 при II-IV стадиях РМЖ по сравнению с I стадией имело место только при одновременно низких уровнях $\text{IgG}_2\text{-E2}$ и $\text{IgG}_2\text{-Pg}$ (комбинация 1) или одного из них (комбинации 2 и 3). Наиболее выраженные раз-

личия в этом сопоставлении были характерными для больных с одновременно низкими уровнями исследованных антител ($p < 0,001$). При одновременно высоких уровнях IgG₂-E2 и IgG₂-Pg различия между больными I и II-IV стадиями по удельным весам опухолей с низким и высоким содержанием Ki-67 отсутствовали ($p = 0,17$).

Обсуждение

Анализ маркера клеточной пролиферации протеина Ki-67 является обязательным для диагностики молекулярно-биологического подтипа РМЖ и выбора наиболее оптимальной схемы адъювантной химиотерапии [2, 5]. В связи с этим представляет особый интерес изучение эндогенных факторов организма, влияющих на пролиферативную активность опухоли, отображаемую в количестве Ki-67 позитивных злокачественных клеток.

В частности, показано, что уровень сывороточных аутоантител, специфичных к ER, у 48 больных РМЖ превышал таковой у 75 здоровых женщин и их уровень коррелировал с количеством опухолевых клеток, экспрессирующих Ki-67 [10]. Присутствие таких антител в сыворотке не зависело от экспрессии ER, PR и рецептора эпидермального фактора роста, а также со стадией заболевания. Обнаружение анти-ER α -антител у пациентов с ER⁺ и ER⁻ опухолями послужило основанием предполагать, что они появляются на ранних стадиях канцерогенеза, до потери ER опухолевыми клетками. Не было исследовано взаимосвязей уровней анти-PR антител в модуляции пролиферации опухолевых клеток, хотя влияние Pg на E2-индуцированную пролиферацию ER⁺ клеток хорошо известно [11].

В качестве адсорбированного антигена в ELISA Maselli A. и соавт. [10] использовали рекомбинантный ER α . В нашей работе в качестве антигена были использованы моноклональные антитела против E2 и Pg, поскольку выявленные с их помощью антиидиотипические антитела обладают специфичностью к ER и PR, как это было показано в экспериментах ранее [15].

Нами исследованы IgG₂-E2 и IgG₂-Pg в сыворотках крови 204 условно здоровых женщин, 327 больных РМЖ I стадии (в начале заболевания) и 336 больных РМЖ II-IV стадий (в процессе опухолевого роста). Поскольку предполагалось исследовать совместное влияние IgG₂-E2 и IgG₂-Pg на пролиферацию опухолевых клеток, были отобраны только пациенты с ER⁺/PR⁺ РМЖ.

У всех больных с I стадией высокие уровни сывороточных IgG₂-E2 встречались чаще (63,9%), чем у здоровых женщин (40,2%, $p < 0,001$). При этом у больных с высоким содержанием в опухоли Ki-67 положительных клеток (> 14%) вы-

сокие уровни IgG₂-E2 обнаруживали чаще, чем у больных с низким содержанием Ki-67 ≤ 14 (69,9% против 56,9%, $p = 0,03$). Таким образом, подтвердили результаты [10] о стимулирующем пролиферацию опухоли действии IgG₂-E2 на начальном этапе заболевания. Не выявили подобных взаимосвязей при анализе IgG₂-Pg.

При анализе возможных комбинаций высоких и низких уровней исследуемых антител выяснилось следующее. Высокие уровни IgG₂-E2 встречались чаще у больных с I стадией РМЖ, чем у здоровых женщин, независимо от уровней IgG₂-Pg. Вместе с тем при низких уровнях IgG₂-E2 высокие уровни IgG₂-Pg обнаруживали у больных значительно реже, чем у здоровых (12,5% против 32,8%) по сравнению с комбинацией одновременно низких уровней и IgG₂-E2, и IgG₂-Pg (20,5% против 26,9%, соответственно; $p = 0,011$). Таким образом, впервые обнаружили, что IgG₂-E2 стимулируют возникновение РМЖ независимо от уровней IgG₂-Pg, а IgG₂-Pg ингибируют возникновение РМЖ только при низких уровнях IgG₂-E2. Это позволяет сделать предположение о взаимном влиянии IgG₂-E2 и IgG₂-Pg на пролиферацию нормальных клеток молочной железы в процессе их малигнизации.

Подтверждением является то, что только при одновременно низких уровнях исследуемых антител у больных с I стадией РМЖ опухоли с низким содержанием Ki-67 ≤ 14 положительных клеток встречаются значительно чаще (55,0%), чем с высоким Ki-67 > 30 в 22,4%. При наличии высокого уровня хотя бы одного из них (при низком другого) или при одновременно их высоких уровнях соответствующие показатели 38,5% и 31,5% ($p = 0,046$).

Особый интерес представляют результаты исследования сочетанного влияния IgG₂-E2 и IgG₂-Pg на содержание в опухоли Ki-67 положительных клеток у больных со II-IV стадиями РМЖ. Оказалось, что при одновременно высоких уровнях исследуемых антител опухоли с низким и высоким содержанием Ki-67 положительных клеток встречаются с одинаковой частотой: Ki-67 ≤ 14 – в 38,0%, а Ki-67 > 30 – в 37,0%. Если же в сыворотке уровни IgG₂-E2 и IgG₂-Pg были одновременно низкими или низкими были уровни одного из них (при высоких уровнях другого), то опухоли с низким содержанием Ki-67 положительных клеток (≤ 14) встречались значительно реже (21,5%), а с высоким (> 30) чаще (53,9%, $p = 0,003$).

Значительное снижение удельного веса опухолей с низким содержанием Ki-67 положительных клеток с 45,8% до 21,5% и соответствующее повышение удельного веса опухолей с высоким содержанием Ki-67 положительных клеток с 30,3%

до 53,9% у больных с II-IV стадиями РМЖ по сравнению с I стадией (т. е. стимуляция пролиферации) имело место только при одновременно низких уровнях исследуемых антител или одного из них (при высоких уровнях другого). Подобных изменений в случае с одновременно высокими уровнями IgG₂-E2 и IgG₂-Pg не происходило.

Иными словами, стимуляция пролиферации опухолевых клеток у больных с ER⁺/PR⁺ РМЖ I стадии происходила при одновременно высоких уровнях IgG₂-E2 и IgG₂-Pg или хотя бы одного из них. Угнетение пролиферации наблюдалось только при их одновременно низких уровнях. В отличие от этого, у больных со II-IV стадиями РМЖ стимуляция пролиферации ER⁺/PR⁺ опухолей имела место при одновременно низких уровнях IgG₂-E2 и IgG₂-Pg или хотя бы одного из них. Угнетение пролиферации наблюдалось только при их одновременно высоких уровнях.

Таким образом, низкие уровни IgG₂-E2 и/или IgG₂-Pg у больных с I стадией ER⁺/PR⁺ РМЖ можно считать негативным прогностическим признаком возрастания пролиферативной активности опухоли при последующем росте.

Поскольку у больных со II-IV стадиями ER⁺/PR⁺ РМЖ эндогенные аутоантитела IgG₂-E2 в комбинации с IgG₂-Pg, вероятно, действуют как ингибиторы пролиферации, а их недостаток взаимосвязан с высокой пролиферативной ак-

тивностью опухоли, возникает вопрос, можно ли использовать экзогенные антитела против ER и/или PR (в зависимости от комбинаций соответствующих антиидиотипических аутоантител) в качестве ингибиторов пролиферации по аналогии с известными антителами против рецептора эпидермального фактора роста (анти-HER-2 герцептин), применяемыми в комплексе адъювантной терапии РМЖ?

Заключение

На основании полученных результатов иммуноанализ IgG₂-E2 и IgG₂-Pg можно рекомендовать в качестве дополнительного метода определения индивидуального риска возникновения ER⁺/PR⁺ РМЖ у здоровых женщин для его профилактики, а также метода оценки прогноза пролиферативной активности при росте опухоли у больных РМЖ для коррекции лечения с помощью селективных модуляторов ER [13]. Представляется перспективным создание антител против стероидных рецепторов в качестве ингибиторов внегеномного стимулирующего пролиферацию опухоли действия E2 и/или Pg для лечения распространенного РМЖ. Дальнейшие исследования в этом направлении позволят определить роль антиидиотипических аутоантител, специфичных к стероидным гормонам, в патогенезе других гормонозависимых опухолей.

Список литературы / References

1. Поленок Е.Г., Гордеева Л.А., Мун С.А., Костянко М.В., Антонов А.В., Вержбицкая Н.Е., Байрамов П.В., Колпинский Г.И., Вафин И.А., Глушков А.Н. Кооперативное участие идиотипических и антиидиотипических антител в стероид-зависимом химическом канцерогенезе // Российский иммунологический журнал, 2023. Т. 25, № 1. С. 35-48. [Polenok E.G., Gordeeva L.A., Mun S.A., Kostyanko M.V., Antonov A.V., Verzhbitskaya N.E., Bairamov P.V., Kolpinskiy G.I., Vafin I.A., Glushkov A.N. Cooperation of idiotypic and anti-idiotypic antibodies at the steroid-dependent chemical carcinogenesis. *Rossiyskiy immunologicheskij zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2023, Vol. 25, no. 1, pp. 35-48. (In Russ.)] doi: 10.46235/1028-7221-1177-CO.
2. Brown J., Scardo S., Method M., Schlauch D., Misch A., Picard S., Hamilton E., Jones S., Burris H., Spigel D. A real-world retrospective study of the use of Ki-67 testing and treatment patterns in patients with HR⁺, HER2⁺ early breast cancer in the United States. *BMC Cancer*, 2022, Vol. 22, no. 1, 502. doi: 10.1186/s12885-022-09557-6.
3. Dressing G.E., Goldberg J.E., Charles N.J., Schwertfeger K.L., Lange C.A. Membrane progesterone receptor expression in mammalian tissues: a review of regulation and physiological implications. *Steroids*, 2011, Vol. 76, no. 1-2, pp. 11-17.
4. Greiner M., Pfeiffer D., Smith R.D. Principles and practical application of the receiver operating characteristic analysis for diagnostic test. *Prev. Vet. Med.*, 2000, Vol. 45, pp. 23-41.
5. Hacking S.M., Wang Y. Practical issues of Ki-67 evaluation in breast cancer clinical practice. *J. Clin. Transl. Pathol.*, 2022, Vol. 2, no. 2, pp. 53-56.
6. Kampa M., Notas G., Pelekanou V., Troullinaki M., Andrianaki M., Azariadis K., Kampouri E., Lavrentaki K., Castanas E. Early membrane initiated transcriptional effects of estrogens in breast cancer cells: First pharmacological evidence for a novel membrane estrogen receptor element (ER_x). *Steroids*, 2012, Vol. 77, no. 10, pp. 959-967.
7. Kim J.Y., Han W., Moon H.G., Ahn S.K., Kim J., Lee J.W., Kim M.K., Kim T., Noh D.Y. Prognostic effect of preoperative serum estradiol level in postmenopausal breast cancer. *BMC Cancer*, 2013, Vol. 13, 503. doi: 10.1186/1471-2407-13-503.
8. Li Q., Gao H., Yang H., Wei W., Jiang Y. Estradiol promotes the progression of ER⁺ breast cancer through methylation-mediated RSK4 inactivation. *Onco Targets Ther.*, 2019, Vol. 12, pp. 5907-5916.
9. Luconi M., Francavilla F., Porazzi I., Macerola B., Forti G., Baldi E. Human spermatozoa as a model for studying membrane receptors mediating rapid nongenomic effects of progesterone and estrogens. *Steroids*, 2004, Vol. 69, no. 8-9, pp. 553-559.

10. Maselli A., Capoccia S., Pugliese P., Raggi C., Cirulli F., Fabi A., Malorni W., Pierdominici M., Ortona E. Autoantibodies specific to estrogen receptor alpha act as estrogen agonists and their level correlate with breast cancer cell proliferation. *Oncoimmunology*, 2016, Vol. 5, no. 2, pp. e1074375. doi: 10.1080/2162402X.2015.1074375.
11. Mohammed H., Russell I.A., Stark R., Rueda O.M., Hickey T.E., Tarulli G.A., Serandour A.A., Birrell S.N., Bruna A., Saadi A., Menon S., Hadfield J., Pugh M., Raj G.V., Brown G.D., D'Santos C., Robinson J.L., Silva G., Launchbury R., Perou C.M., Stingl J., Caldas C., Tilley W.D., Carroll J.S. Progesterone receptor modulates ERα action in breast cancer. *Nature*, 2015, Vol. 523, no. 7560, pp. 313-317.
12. Norfleet A.M., Clarke C.H., Gametchu B., Watson C.S. Antibodies to the estrogen receptor-α modulate rapid prolactin release from rat pituitary tumor cells through plasma membrane estrogen receptors. *FASEB J.*, 2000, Vol. 14, no. 1, pp. 157-165.
13. Sestak I. Preventative therapies for healthy women at high risk of breast cancer. *Cancer Manag. Res.*, 2014, Vol. 6, pp. 423-430.
14. Siegel R.L., Miller K.D., Fuchs H.E., Jemal A. Cancer statistics, 2022. *CA Cancer J. Clin.*, 2022, Vol. 72, no. 1, pp. 7-33.
15. Sömjen D., Kohen F., Lieberherr M. Nongenomic effects of an anti- idiotypic antibody as an estrogen mimetic in female human and rat osteoblasts. *J. Cell. Biochem.*, 1997, Vol. 65, no. 1, pp. 53-66.

Авторы:

Глушков А.Н. — д.м.н., профессор, главный научный сотрудник лаборатории иммуногенетики Института экологии человека ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр угля и углехимии Сибирского отделения Российской академии наук», г. Кемерово, Россия

Поленок Е.Г. — к.фарм.н., ведущий научный сотрудник лаборатории иммунохимии Института экологии человека ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр угля и углехимии Сибирского отделения Российской академии наук», г. Кемерово, Россия

Мун С.А. — к.м.н., доцент, старший научный сотрудник лаборатории иммуногенетики Института экологии человека ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр угля и углехимии Сибирского отделения Российской академии наук», г. Кемерово, Россия

Гордеева Л.А. — к.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории иммуногенетики Института экологии человека ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр угля и углехимии Сибирского отделения Российской академии наук», г. Кемерово, Россия

Антонов А.В. — заведующий отделением опухолей молочной железы ГБУЗ «Кузбасский клинический онкологический диспансер имени М.С. Раппопорта», г. Кемерово, Россия

Байрамов П.В. — заведующий патологоанатомическим отделением ГБУЗ «Кузбасский клинический онкологический диспансер имени М.С. Раппопорта», г. Кемерово, Россия

Вержбицкая Н.Е. — к.м.н., врач-патологоанатом ГБУЗ «Кузбасский клинический онкологический диспансер имени М.С. Раппопорта», г. Кемерово, Россия

Колпинский Г.И. — д.м.н., профессор кафедры лучевой диагностики, лучевой терапии и онкологии ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный медицинский университет»; главный врач ГАУЗ «Клинический консультативно-диагностический центр имени И.А. Колпинского», г. Кемерово, Россия

Authors:

Glushkov A.N., PhD, MD (Medicine), Professor, Chief Research Associate, Immunogenetics Laboratory, Institute of Human Ecology, Federal Research Center of Coal and Coal Chemistry, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Kemerovo, Russian Federation

Polenok E.G., PhD (Pharmacy), Leading Research Associate, Immunochemistry Laboratory, Institute of Human Ecology, Federal Research Center of Coal and Coal Chemistry, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Kemerovo, Russian Federation

Mun S.A., PhD (Medicine), Senior Research Associate, Immunogenetics Laboratory, Institute of Human Ecology, Federal Research Center of Coal and Coal Chemistry, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Kemerovo, Russian Federation

Gordeeva L.A., PhD (Biology), Leading Research Associate, Immunogenetics Laboratory, Institute of Human Ecology, Federal Research Center of Coal and Coal Chemistry, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Kemerovo, Russian Federation

Antonov A.V., Head, Breast Cancer Department, M. Rappoport Kuzbass Clinical Oncological Dispensary, Kemerovo, Russian Federation

Bairamov P.V., Main Physician, Pathoanatomical Department, M. Rappoport Kuzbass Clinical Oncological Dispensary, Kemerovo, Russian Federation

Verzhbitskaya N.E., PhD (Medicine), Pathologist, Pathoanatomical Department, M. Rappoport Kuzbass Clinical Oncological Dispensary, Kemerovo, Russian Federation

Kolpinsky G.I., PhD, MD (Medicine), Professor, Department of Radiology, Radiotherapy and Oncology, Kemerovo State Medical University; Main Physician, I. Kolpinsky Clinical Consulting and Diagnostic Center, Kemerovo, Russian Federation

Поступила 26.05.2023
Отправлена на доработку 20.06.2023
Принята к печати 04.10.2023

Received 26.05.2023
Revision received 20.06.2023
Accepted 04.10.2023

ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ Т-ЛИМФОЦИТОВ В УСЛОВИЯХ «КЛЕТОЧНОГО СОСЕДСТВА» ПРОЛИФЕРИРУЮЩИХ И АПОПТОТИРУЮЩИХ КЛЕТОК *IN VITRO* У ЗДОРОВЫХ ЛЮДЕЙ И ПАЦИЕНТОВ С РЕВМАТОИДНЫМ АРТРИТОМ

Абрамова Т.Я., Блинова Е.А., Пашкина Е.А., Гришина Л.В.,
Ильина Н.А., Чумасова О.А., Сизиков А.Э., Козлов В.А.

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

Резюме. Ревматоидный артрит (РА) представляет собой хроническое, системное, воспалительное, аутоиммунное заболевание, развитие которого ассоциировано с нарушением механизмов контроля численности клеток, баланса процессов пролиферации и апоптоза. Целью исследования являлся комплексный анализ влияния клеточных и гуморальных факторов «апоптотирующей» культуры Т-лимфоцитов на «пролиферирующую» с учетом данных по параметрам «первичной» и «вторичной» индукции апоптоза, активационных маркеров и маркера пролиферации, содержания живых клеток, роли кортизола, каспазы и цитокинов при культивировании в условиях «клеточного соседства» у здоровых людей и пациентов с РА. Результаты анализа, проведенного с учетом полученных ранее данных, выявили сходные и различающиеся функции созданных в условиях «клеточного соседства» Т-клеточных систем здоровых людей и пациентов с РА. Для обеих исследуемых групп была характерна вторичная индукция апоптоза, относящаяся к неавтономным эффектам, появление значимого количества активированных Т-лимфоцитов, повышение уровней IL-6 и IL-4, низкий уровень IFN γ и каспазы-8, снижение потенциала рецепторного и митохондриального апоптоза, а также отсутствие различий по уровню апоптоза между группами доноров и пациентов. В то же время у здоровых людей в процессе индукции апоптоза снижался высокий изначально уровень TNF α , а повышение IL-6 было умеренным. Не изменялись уровни внутриклеточных молекул p53 и Bcl-2, сохранялось большое количество положительных корреляционных зависимостей между исследуемыми факторами во всех

Адрес для переписки:

Абрамова Татьяна Яковлевна
ФГБНУ «Научно-исследовательский институт
фундаментальной и клинической иммунологии»
630099, Россия, г. Новосибирск, ул. Ядринцевская, 14.
Тел.: 8 (383) 227-01-35.
Факс: 8 (383) 222-70-28.
E-mail: tatjana-abramova@mail.ru

Address for correspondence:

Tatiana Ya. Abramova
Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology
14 Yadrintsevskaya St
Novosibirsk
630099 Russian Federation
Phone: +7 (383) 227-01-35.
Fax: +7 (383) 222-70-28.
E-mail: tatjana-abramova@mail.ru

Образец цитирования:

Т.Я. Абрамова, Е.А. Блинова, Е.А. Пашкина,
Л.В. Гришина, Н.А. Ильина, О.А. Чумасова,
А.Э. Сизиков, В.А. Козлов «Функциональная
активность Т-лимфоцитов в условиях «клеточного
соседства» пролиферирующих и апоптотирующих
клеток *in vitro* у здоровых людей и пациентов
с ревматоидным артритом» // Медицинская
иммунология, 2024. Т. 26, № 6. С. 1279-1290.
doi: 10.15789/1563-0625-IVF-2876

© Абрамова Т.Я. и соавт., 2024
Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

T. Ya. Abramova, E. A. Blinova, E. A. Pashkina, L. V. Grishina,
N. A. Ilina, O. A. Chumasova, A. E. Sizikov, V. A. Kozlov
“In vitro functional activity of T lymphocytes under
the conditions of ‘cell neighborhood’ of proliferating and
apoptotic cells in healthy people and patients with rheumatoid
arthritis”, Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya
Immunologiya, 2024, Vol. 26, no. 6, pp. 1279-1290.
doi: 10.15789/1563-0625-IVF-2876

© Abramova T. Ya. et al., 2024
The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License
DOI: 10.15789/1563-0625-IVF-2876

вариантах смешанных и «апоптотических» культур, что свидетельствовало о сохранении функционального баланса Т-клеток в неблагоприятных условиях у доноров. Пациентов с РА характеризовало повышение числа живых клеток в «апоптотических» культурах, значимый рост количества Ki-67⁺ Т-лимфоцитов, свидетельствующее о пролиферативных процессах в условиях апоптоза, отсутствие ответа TNF α на индукцию апоптоза, отсутствие связей между исследуемыми молекулами в «апоптотических» культурах и синтез кортизола в них, а также наличие связей кортизола с исследуемыми молекулами в апоптотических культурах, что свидетельствовало об изменении межклеточных взаимодействий и нарушении гомеостаза Т-лимфоцитов в условиях «клеточного соседства» у пациентов с РА.

Ключевые слова: Т-лимфоциты, «пролиферирующие» клетки, «апоптотирующие» клетки, автономные эффекты апоптоза, не автономные эффекты апоптоза, «клеточное соседство», локальная продукция кортизола, ревматоидный артрит

IN VITRO FUNCTIONAL ACTIVITY OF T LYMPHOCYTES UNDER THE CONDITIONS OF “CELL NEIGHBORHOOD” OF PROLIFERATING AND APOPTOTIC CELLS IN HEALTHY PEOPLE AND PATIENTS WITH RHEUMATOID ARTHRITIS

Abramova T.Ya., Blinova E.A., Pashkina E.A., Grishina L.V., Ilina N.A., Chumasova O.A., Sizikov A.E., Kozlov V.A.

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

Abstract. Rheumatoid arthritis (RA) is a chronic, systemic, inflammatory, autoimmune disease, the development of which is associated with impaired mechanisms of cell number control, proliferation balance, and apoptosis. The aim of our study was to perform a comprehensive analysis of cellular and humoral effects exerted by “apoptotic” T lymphocyte culture upon “proliferating” cells, taking into account the parameters of “primary” and “secondary” apoptosis induction, activation and proliferation markers, viable cell contents, role of cortisol, caspase and cytokines during cultivation under the “cell neighborhood” conditions in healthy subjects and patients with RA. The results of the analysis, with respect to previous data, revealed both similar and different functions of the T cell systems generated under “cell-neighborhood” conditions in healthy individuals and RA patients. Both groups under study were characterized by secondary induction of apoptosis, which refers to non-autonomous effects, along with appearance of activated T lymphocytes at significant amounts, increase of IL-6 and IL-4 levels, as well as low levels of IFN γ and caspase 8, decrease potential of receptor and mitochondrial apoptosis. No differences in apoptosis level were found between donor and patient groups. At the same time, the initially high level of TNF α in healthy subjects decreased during the induction of apoptosis, along with moderate increase of IL-6. The levels of intracellular p53 and Bcl-2 molecules did not change, and many positive correlations remained between the studied factors in all variants of mixed and “apoptotic” cultures, thus suggesting maintenance of functional T cell balance under the unfavorable conditions in donors. The RA patients were characterized by increased number of live cells in “apoptotic” cultures, a significant increase in the number of Ki-67⁺ T lymphocytes, being indicative for proliferative processes under conditions of apoptosis, like as absence of TNF α response to apoptosis induction. Lack of relations between the studied molecules in “apoptotic” cultures and local cortisol synthesis, as well as presence of correlations between cortisol and the studied molecules in apoptotic cultures, presumed some changes of intercellular interactions and disturbance of homeostasis among T lymphocytes under the conditions of “cellular neighborhood” were also observed in RA patients.

Keywords: T cells, apoptosis, autonomous effects, non-autonomous effects, cell neighborhood, cortisol, local production, rheumatoid arthritis

Введение

Ревматоидный артрит (РА) — хроническое системное воспалительное, аутоиммунное заболевание, вызывающее прогрессирующее поражение суставов, которое может привести к пожизненной инвалидности, а также к вторичному амилоидозу, несущему риск недостаточности органов и смерти [9].

Развитие ревматоидного артрита (РА) ассоциировано с нарушением механизмов контроля численности клеток, баланса процессов пролиферации и апоптоза как наиболее частого и физиологического варианта гибели клеток. Традиционно апоптоз рассматривался как клеточно-автономное явление. Однако генетические исследования *in vivo* показали, что активное взаимодействие между апоптотическими и живыми клетками способствует процессам ремоделирования, регенерации и морфогенеза тканей, а также, влияет на поглощение, миграцию, гибель и пролиферацию клеток, входящих в микроокружение [8]. Такие взаимодействия могут быть двунаправленными, и таким образом апоптоз проявляет неавтономные свойства в клеточном сообществе. Установлена роль внутриклеточных деградационных каспаз в дифференцировке, подвижности, слиянии клеток и запуске пролиферации. Такая пролиферация называется индуцированной апоптозом и является ценным механизмом компенсации потери клеток [12]. Тем не менее механизмы и молекулы, оказывающие неавтономные эффекты апоптоза в условиях межклеточного взаимодействия, еще не достаточно расшифрованы.

Существует классическое понимание роли Т- и В-клеток и их реципрокных взаимодействий с провоспалительными цитокинами в патогенезе РА. Th1 индуцируют IFN γ , TNF α и IL-2, которые являются провоспалительными цитокинами, приводящими к разрушению хряща и эрозии костей. Клетки Th2 секретируют IL-4, IL-5 и IL-13, оказывающих противовоспалительное и антиостеокластогенное действие [10]. В патогенезе РА ревматоидный фактор (RF) и антитела к циклическому цитруллинированному пептиду (ACPA), образуя иммунные комплексы с цитруллинированными белками, запускают высвобождение воспалительных цитокинов, таких как TNF α и IL-6 [9]. Недавние исследования показали, что другие цитокины, такие как IL-7, IL-17, IL-21, IL-23, GM-CSF, IL-1 β , IL-18, IL-33 и IL-2 играют роль в данном заболевании, но участие TNF α и IL-6 занимает центральное место в патогенезе РА [9]. Помимо моноцитарных макрофа-

гов, исследования транскриптомики отдельных клеток и масс-цитометрии показали, что В- и Т-лимфоциты также являются одними из основных источников TNF α [6]. Передача сигналов TNF разнонаправленно участвует в патогенезе РА — сигнал через TNFR1 способствует патогенезу артрита, передача сигналов через TNFR2 выполняет защитные функции, в частности, TNF α влияет на дифференцировку Treg-клеток, которые необходимы для поддержания иммунного гомеостаза и предотвращения аутоиммунитета [9]. IL-6 участвует в широком спектре физиологических и патологических процессов, зависящих от одного из трех вариантов взаимодействия рецептор — лиганд, характерных для активации сигнального каскада этим цитокином. Хотя существует общий консенсус в отношении воспалительной роли IL-6 в патогенезе РА, есть исследования, указывающие на то, что его роль неясна: выяснилось, что передача сигналов IL-1 снижает передачу сигналов IL-6 при РА, вызывая общее ухудшение состояния больных. [11]. Известна роль IFN γ в патогенезе РА, включая синовиальное воспаление, аутоиммунитет против цитруллинированных белков, а также периартикулярную и системную потерю костной массы. Кроме того, IFN γ стимулирует экспрессию МНС класса II на не иммунных клетках, усиливая взаимодействие с цитруллинированным виментином при индукции аутофагии [9]. Секвенирование гена AIRE в синовиальных фибробластах свидетельствовало о том, что 96% генов, регулируемых AIRE, IFN-чувствительны [7]. Известно, что IL-4 и IL-13 могут благотворно влиять на течение заболевания, подавляя воспалительные процессы, лежащие в основе РА. Они динамически искажают иммунный ответ в отношении заболеваний, связанных с цитокиновым путем IL-23/IL-17. Ось IL-4/IL-13 также играет роль в гомеостатическом восстановлении тканей [5]. Глюкокортикоиды (ГКС) играют критическую роль в регуляции иммунной системы, проявляя свое действие через глюкокортикоидный рецептор (GR). Одной из основных функций ГКС является предотвращение летального исхода в результате чрезмерного воспаления. Помимо продукции надпочечниками, ГКС также могут вырабатываться в ряде вне надпочечниковых тканей, включая иммунную систему, кожу, мозг и кишечник. Локальный синтез глюкокортикоидов происходит в митохондриях из холестерина с участием митохондриальных ферментов [14]. Кроме иммуноингибирующих эффектов на продукцию IFN γ , подавления Th1 Т-клеток, CD8⁺ лимфоцитов и NK-клеток, ГКС способны модифицировать воспалитель-

ный тип иммунного ответа, обусловленный Th1 на гуморальный Th2-ответ. Многие противовоспалительные действия ГКС происходят через негеномные механизмы. В частности, в партикулярной зоне лигандсвязанный GR может препятствовать как AP-1, так и NF-κB провоспалительной сигнализации. Комбинация продукции надпочечниками и лимфоидного ГКС направлена на адаптивную регуляцию развития и отбор лимфоцитов, оптимизацию выживаемости в различных условиях окружающей среды [13, 14]. Про- и противовоспалительные цитокины, ГКС и другие активные участники патогенеза РА могут являться факторами не автономного влияния апоптоза. Целью данной работы являлся комплексный анализ вклада исследуемых молекул в автономные и не автономные эффекты апоптоза.

Материалы и методы

Объектом исследования являлась периферическая кровь 11 условно здоровых женщин, не имеющих аутоиммунных, острых и обострения хронических заболеваний, средний возраст группы составил $47,5 \pm 3,4$ года, а также периферическая кровь 17 женщин больных РА (средний возраст $50,4 \pm 2,8$ года), находившихся на лечении в клинике ФГБНУ НИИФКИ, г. Новосибирска (табл. 1). У всех пациентов было получено добровольное информированное согласие на проведение необходимых манипуляций.

Выделенная на градиенте плотности (фиколл-верографин, 1,078) (BioClot GmbH, Германия) лимфоцитарная фракция клеток была распределена на 2 варианта культуры (приложение 1). Первый вариант («нормально пролиферирующая CFSE⁺ культура» (НП)) — 7 лунок по $5,0 \times 10^5$ кл/0,5 мл полной культуральной среды (ПКС), окрашенных флуоресцентным красителем CFSE (Molecular probes, США), (CFSE⁺). В составе ПКС — среда RPMI-1640 (ООО «БиолоТ», Санкт-Петербург, Россия), тиенам, (ЗАО «ОРТАТ», Россия), L-глутамин (Gerbu, Biotechnik, GmbH, Германия), буферный раствор Hepes (GERBU, Biotechnik, GmbH), фетальная телячья сыворотка (FCS), (Hy Clone, США). Вторым вариантом — «апоптотическая культура» (АК) — 3 лунки (не стимулированные клетки, aCD3 (1 мкг/мл, ООО МНЦ «МедБиоСпектр», Москва, Россия), и дексаметазон-стимулированные (1×10^{-4} М) клетки по $2,0 \times 10^6$ кл/150,0 мкл обедненной среды (ОКС) — 1% FCS, (CFSE⁻). На 4-е сутки инкубации (96 ч) в термостате (37 °C, 5% CO₂) апоптотическая культура (клетки и супернатант отдельно) была перенесена к лимфоцитам, пролиферирующим в условиях ПКС.

Далее проводилось сокультивирование проб, получивших условные названия (приложение 2): 1. “К” — контрольное культивирование лимфоцитов в ПКС; 2. “КА” — к НП-лимфоцитам была добавлена клеточная часть не стимулированных клеток АК; 3. “KAsup” — сокультивирование НП в ПКС и перенесенного к ней супернатанта от не стимулированной АК; 4. “CD3” — НП культура и клетки АК, стимулированные aCD3; 5. “CD3sup” — НП-лимфоциты и супернатант от АК, стимулированной aCD3; 6. “D” — сокультивирование НП-лимфоцитов в ПКС и АК, обработанных дексаметазоном (1×10^{-4} М); 7. “Dsup” — НП-лимфоциты и супернатант от АК, обработанных дексаметазоном. Контроль апоптотических проб в динамике инкубирования проводился на 3-4-и сутки (72-96 ч) и 7-е сутки (168 ч) в пробах “КА”, “CD3” и “D”. На 7-е сутки каждая проба — супернатант и клетки отдельно, замораживалась, и хранились в холодильнике до использования при t° -80 °C. Определение содержания кортизола (нмоль/л) в супернатантах клеток проводилось с помощью набора для твердофазного ИФА АО «Вектор-Бест» (ИФА-БЕСТ, Россия), номер серии 152, паспорт № 4208-22 согласно инструкции по применению.

Статистическая обработка данных проводилась с применением методов непараметрической статистики (Statistica 6.0). В анализе был использован ранговый анализ вариаций по Краскелу—Уоллису, U-критерий Манна—Уитни и ранговая корреляция по Спирмену. Результаты представлены в виде медианы и интерквартильного размаха, возраст представлен в виде $M \pm m$. Различия между группами считались статистически значимыми при достигнутом уровне $p \leq 0,05$.

Результаты и обсуждение

Настоящее исследование является очередным этапом нашей работы, направленной на изучение автономных и не автономных эффектов апоптоза Т-лимфоцитов в условиях «клеточного соседства» *in vitro* у пациентов с РА и здоровых людей. Основной задачей данного этапа являлся комплексный анализ влияния клеточных и гуморальных факторов «апоптотизирующей» культуры Т-лимфоцитов на «пролиферирующую» культуру с учетом данных по параметрам «первичной» и «вторичной» индукции апоптоза, активационных маркеров и маркера пролиферации, динамике содержания живых клеток, роли кортизола, каспазы и цитокинов в процессе совместного культивирования в условиях «клеточного соседства» у здоровых людей и пациентов с РА.

ТАБЛИЦА 1. КЛИНИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ПАЦИЕНТОВ* С РЕВМАТОИДНЫМ АРТРИТОМ (РА)
TABLE 1. CLINICAL CHARACTERISTICS OF PATIENTS* WITH RHEUMATOID ARTHRITIS (RA)

№ No.	Возраст Age	Диагноз Diagnosis	Длительность Duration of the disease	Лечение Treatment
1	64	РА, серонегативный, ранняя стадия, неэрозивный, Rg I ст., активность высокая (DAS 28 6.44), с системными проявлениями (потеря массы тела), АЦЦП (-), aMCV (-), ФК II RA, seronegative, early stage, not erosive, Rg I stage, high activity, DAS28 6.44, with systemic manifestations (body weight loss), aCCP (-), aMCV (-), functional class (FC) II	> 1 года > 1 year	Лефлуноמיד 20 мг в сутки Преднизолон 5 мг 4 таб. в сутки Leflunomide 20 mg per day Prednisolone 5 mg 4 tab. per day
2	50	РА, серопозитивный, поздняя стадия, эрозивный Rg III активность средняя (DAS28 4.38), с системными проявлениями (полинейропатия). АЦЦП (+), ФК2 RA, seropositive, late stage, erosive, Rg III stage, moderate activity, DAS28 4.38, with systemic manifestations (polyneuropathy). aCCP (+). FC II	> 16 лет > 16 years	Азатиоприн 50 мг 2 р/д Ритуксимаб 500 мг Azathioprin 50 mg per day Rituximab 500 mg
3	47	РА, серопозитивный, развернутая стадия, рентгенологическая стадия II, неэрозивный, ремиссия (DAS28 СОЭ 1.05), АЦЦП (+), ФК II RA, seropositive, extended stage, not erosive, Rg II stage, remission, DAS28 1.05). aCCP (+). FC II	> 6 лет > 6 years	Лефлуноמיד 20 мг в сутки Цертолизумаба пэгол 400 мг 1 раз в месяц Leflunomide 20 mg per day Certolizumab pegol 400 mg per month
4	43	РА, серопозитивный, развернутая стадия, неэрозивный, Rg II ст., ремиссия (DAS28 2.5). АЦЦП (+). ФК II RA, seropositive, extended stage, not erosive, Rg II stage, remission, DAS28 2.5. aCCP (+). FC II	> 11 лет > 11 years	Гидроксихлорохин 200 мг 1 р/д Метотрексат 10 мг/нед Олокизумаб 64 мг 1 раз в 4 недели Hydroxychloroquine 200 mg per day Methotrexate 10 mg/week Olokizumab 64 mg per month
5	58	РА, серопозитивный, поздняя стадия, эрозивный, Rg IV ст., активность средняя (DAS28 = 3.3). АЦЦП (+). ФК 2 RA, seropositive, late stage, erosive, Rg IV stage, moderate activity, DAS28 3.3. aCCP (+). FC II	> 24 лет > 24 years	Метотрексат 10 мг/нед Олокизумаб 64 мг 1 раз в 4 недели Methotrexate 10 mg/week Olokizumab 64 mg per month
6	57	РА, серопозитивный, поздняя стадия, активность высокая (DAS28 = 5.59), с системными проявлениями (полинейропатия), эрозивный Rg III-IV ст., АЦЦП (-), ФК2 RA, seropositive, late stage, erosive, Rg III stage, high activity DAS28 5.59, with systemic manifestations (polyneuropathy). aCCP (-). FC II	> 8 лет > 8 years	Лефлуноמיד 20 мг в сутки Преднизолон 5 мг 3 таб. в сутки Leflunomide 20 mg per day Prednisolone 5 mg 3 tab. per day
7	42	РА, серопозитивный, развернутая стадия, неэрозивный, Rg II ст., активность высокая, DAS28 5.2. АЦЦП (+). ФК II RA, seropositive, extended stage, not erosive, Rg II stage, high activity, DAS28 5.2. aCCP (+). FC II	> 9 лет > 9 years	Лефлуноמיד 20 мг в сутки Преднизолон 5 мг 2 таб. в сутки Leflunomide 20 mg per day Prednisolone 5 mg 2 tab. per day
8	56	РА, серопозитивный, поздняя стадия, эрозивный, Rg IV ст., активность высокая, DAS28 5.4. АЦЦП (+). ФК II RA, seropositive, late stage, erosive, Rg IV stage, high activity, DAS28 5.4. aCCP (+). FC II	> 22 лет > 22 years	Метотрексат 15 мг/нед. Methotrexate 15 mg/week

Примечание. * – пациенты, обследованные на уровень кортизола.
Note. *, patients tested for cortisol levels.

Поставленная аналитическая задача обосновывала необходимость краткого представления результатов работы, проведенной и опубликованной ранее. На начальном этапе изучались особенности апоптоза Т-лимфоцитов *in vitro* в условиях «клеточного соседства» у здоровых людей и пациентов с РА. Нами был разработан протокол раздельной инкубации Т-лимфоцитов в полной культуральной среде (ПКС) CFSE⁺ «пролиферирующая» и аутологичных клеток (CFSE⁻) «апоптотирующая» культуры, находящихся в условиях скученности и обеднения культуральной среды (ОКС), что являлось, по нашему мнению, наиболее физиологичным вариантом индукции апоптоза, приближенным к условиям, происходящим в организме. На 4-е сутки инкубации клетки и кондиционная среда «апоптотирующей» культуры раздельно переносились к клеткам, пролиферирующим в благоприятных условиях ПКС для создания условий «клеточного соседства», и инкубация продолжалась до 168 часов. Применение данного подхода выявило повышение уровня апоптоза в обеих группах. Позволило дифференцированно, в условиях «клеточного соседства», оценить в «первично» (CFSE⁻) и «вторично» (CFSE⁺) индуцированных в апоптоз культурах Т-лимфоцитов параметры раннего, позднего апоптоза и некроза не стимулированных, а также CD3 и дексаметазон (1×10^{-4} М) стимулированных лимфоцитов у здоровых людей и пациентов с РА.

При анализе полученных результатов не было установлено различий между здоровыми людьми и пациентами с РА по исследуемым параметрам, как в «первично» индуцированной в апоптоз культуре, так и во «вторично» индуцированной, ни исходно, ни в динамике культивирования.

Ранее в литературе [8, 9] были опубликованы данные о неавтономных эффектах апоптоза в процессе взаимодействия между апоптотическими и живыми клетками. В наших экспериментах, помимо «вторичной» индукции апоптоза в CFSE⁺ культуре, было определено значимое повышение содержания живых (Ann⁺/7AAD⁻) Т-лимфоцитов в (CFSE⁻) «первично» индуцированных, нестимулированных (КА) и стимулированных дексаметазоном ($D1 \times 10^{-4}$ М) пробах больных РА относительно аналогичных культур здоровых доноров [3].

С целью уточнения роли пролиферации в увеличении числа клеток в процессе инкубации CFSE⁻ и CFSE⁺ культур в условиях «клеточного соседства», были проведены эксперименты, направленные на выявление уровня экспрессии ранних и поздних маркеров активации, а также маркера пролиферации (Ki-67⁺) у больных РА и здоровых людей. В результате были определены

закономерные изменения экспрессии ранних и поздних маркеров активации в обеих наблюдаемых группах, свидетельствующие об активации лимфоцитов. Выявлены более высокие параметры активации CD69⁺ и CD25⁺ лимфоцитов, но сниженные параметры экспрессии маркера пролиферации Ki-67⁺ в группе доноров, при этом у пациентов с РА было установлено умеренное повышение экспрессии активационных маркеров, но значимое увеличение числа клеток, экспрессирующих Ki-67. Повышение числа экспрессирующих Ki-67 лимфоцитов было характерно как для CD4⁺, так и для CD8⁺Т-лимфоцитов пробы “Dsup”. Таким образом, активация Т-лимфоцитов у пациентов с РА пролонгировала пролиферативные процессы, поскольку молекула Ki-67 является универсальным маркером пролиферации, присутствуя в клетке только во время деления и разрушаясь в течение 1,5-2 часов после окончания митоза [1].

Различный исход индукции апоптоза в культурах, находящихся в равных условиях «клеточного соседства» у здоровых людей и пациентов с РА выявил необходимость изучения основных эффекторных молекул апоптоза, их участия в автономных и не автономных эффектах. В результате проведенных исследований, был установлен низкий потенциал рецепторного пути активации апоптоза за счет подавления продукции TNF α в культурах здоровых людей. При этом уровень TNF α в супернатантах пациентов с РА был относительно низок изначально и значимо не менялся в динамике наблюдения и при различных вариантах инкубации. Обе исследуемые группы характеризовались низким уровнем инициирующей каспазы-8. Было также установлено значимое подавление эффекторных молекул митохондриального пути активации апоптоза — антиапоптотического фактора Bcl-2 и транскрипционного фактора p53 в культурах апоптотических клеток, а также смешанных в условиях «клеточного соседства» «пролиферирующих» и «апоптотических» клеток у пациентов с РА и отсутствие динамики по содержанию указанных белков у доноров. [2].

Тот факт, что не только перенос апоптотирующих клеток, но и кондиционных сред данных клеток сопровождался повышением экспрессии маркеров активации, как у пациентов с РА, так и у здоровых людей, свидетельствовал о том, что эффекторные молекулы, провоцирующие эти процессы, могут быть растворимыми. В связи с этим исследовались возможные зависимости в продукции провоспалительных цитокинов TNF α (пг/мл) и IL-6 (пг/мл) в супернатантах

исследуемых проб, а также цитокинов, продуцируемых активированными Т-лимфоцитами — $IFN\gamma$ (пг/мл) и $IL-4$ (пг/мл). В системе анализа ANOVA Краскела—Уоллиса были установлены значимые различия в ранговых вариациях $TNF\alpha$ между пробами “К”, $p = 0,017$ и “КА”, $p = 0,011$ и пробами “КА72-96h”, “КА168h”, а также между пробами “D”, и “D72-96h”, “D168h”, $p = 0,006$ у доноров. При уточнении межгрупповых различий в анализе по М-В доноры изначально имели более высокий уровень цитокина в пробах “К”, “КА” и “D” относительно соответствующих проб больных, но в процессе инкубации у здоровых людей было выявлено значимое снижение содержания $TNF\alpha$ в пробах “КА72-96h”, “КА168h”, “D72-96h”, “D72-96h”, «апоптотических» клеток, относительно контрольных проб. Динамики содержания $TNF\alpha$ в кондиционных средах больных РА в процессе инкубации установлено не было [2]. Группы доноров и пациентов значимо не различались по уровню другого провоспалительного цитокина — $IL-6$. Внутри обеих групп повышался уровень указанного цитокина в апоптотических пробах относительно контрольных проб “К”, “КА” и смешанных проб “КАsup”, “Dsup”, “CD3sup”, содержащих супернатанты от апоптотирующих культур. Различия между исследуемыми группами заключались в следующем — если у доноров они были определены только между пробами “К”, $p = 0,0015$ и “КА”, $p = 0,0015$ относительно проб “КА72-96h” и “КА168h”, а также “CD3sup” относительно “CD372-96h”, “CD3168h”, $p = 0,009$, то в группе пациентов с РА повышение $IL-6$ было ассоциировано со всеми пробами, кроме смешанной пробы “CD3”, содержащей пролиферирующие и апоптотические клетки. Проведение корреляционного анализа выявило наличие достоверных связей между содержанием $TNF\alpha$ и $IL-6$ в одной пробе. Так, у доноров были установлены прямые зависимости между уровнями $TNF\alpha$ и $IL-6$ в пробах “К”, $r = 0,79$, $p = 0,036$, “D”, $r = 0,86$, $p = 0,014$, а также в пробах “КА72-96h”, $r = 0,82$, $p = 0,023$ и “CD372-96h”, $r = 0,85$, $p = 0,016$, в то время как у больных РА наличие прямых связей было определено только в пробах, содержащих либо «пролиферирующие», либо «пролиферирующие» наряду с «апоптотическими» клетками, в пробах “К”, $r = 0,89$, $p = 0,006$, “D”, $r = 0,86$, $p = 0,014$ и “Dsup”, $r = 0,94$, $p = 0,005$, а в «апоптотической» культуре была выявлена обратная зависимость между содержанием цитокинов в пробах “К” и “КА72-96h”, $r = -0,9$, $p = 0,037$, что свидетельствовало об инверсии связи между цитокинами, проду-

цируемыми клетками, находящимися в стрессовых условиях у пациентов с РА. Таким образом, доноров характеризовало снижение уровня $TNF\alpha$, умеренное повышение $IL-6$ и сохранение прямых корреляционных связей между содержанием цитокинов в «апоптотических» клетках. Для пациентов с РА было характерно отсутствие ответа $TNF\alpha$ на активацию апоптоза, активная продукция $IL-6$ и нарушение прямых зависимостей между провоспалительными цитокинами в «апоптотирующих» клетках.

В супернатантах исследуемых проб обеих групп значимо повысилось содержание $IL-4$ (пг/мл). Сравнительный анализ трех независимых групп показал наличие достоверных изменений во всех анализируемых вариантах, кроме сравнения с “КАsup” у здоровых людей, в то время как у пациентов с РА достоверные различия были установлены только в стимулированных пробах: “CD3”, $p = 0,029$, и “CD3sup”, $p = 0,03$ относительно проб “CD372-96h” “CD3168h”; “D”, $p = 0,021$, и “Dsup”, $p = 0,020$, относительно “D72-96h” “D168h”. В последние годы происходит пересмотр классической роли провоспалительных цитокинов. В частности, возможным стимулом к активации Th2, являющихся продуцентами $IL-4$, могло послужить повышение продукции $IL-6$, который обладает способностью оказывать противовоспалительный эффект, так, при раннем РА приоритет в передаче сигналов $IL-6$ сопровождался подавлением Th1- и Th17-хелперных клеток и расширением влияния Т-хелперов 2-го типа [5]. Данная возможность могла быть обусловлена низкими параметрами $IFN\gamma$ (пг/мл) в обеих группах, являющегося продуктом активности Th1. Повышение уровня $IFN\gamma$ проявилось в обеих группах только в ответ на стимуляцию CD3 антителами. Не было определено корреляционных зависимостей между продукцией $IL-4$, $IFN\gamma$ и другими исследуемыми цитокинами.

Из всех возможных функциональных связей, касающихся внутриклеточных молекул, обеспечивающих апоптоз — p53 (ед/мл), Bcl-2 (нг/мл) и каспазой 8 (нг/мл), на фоне снижения уровней p53 и Bcl-2, у пациентов с РА была установлена прямая корреляционная связь между содержанием p53 и Bcl-2 в двух смешанных пробах “КАsup”, $r = 0,9$, $p = 0,037$ и “CD3sup”, $r = 0,97$, $p = 0,005$. Известно, что на фоне усиления продукции $IL-6$, инактивация p53 в Т-клетках может способствовать дифференцировке их в Th17, кроме того, инактивация p53 ставит под угрозу дифференцировку Treg, что смещает баланс между толерантностью и воспалением в

сторону воспаления [4]. В отличие от больных РА, в группе доноров не было установлено динамики содержания p53 и Bcl-2 в процессе инкубации, при этом группа характеризовалась большим количеством прямых корреляционных связей между p53 и Bcl-2, каспазой-8 и p53, каспазой-8 и Bcl-2. При анализе связи между p53 и Bcl-2 обращало на себя внимание преимущественная зависимость между контролями, содержащими p53 и стимулированными CD3 и дексаметазоном пробами, содержащими Bcl-2. При этом связь между p53 и Bcl-2 в пробе “CD3168h”, $r = 0,89$, $p = 0,040$, свидетельствовала о сохранении данной зависимости в стимулированных апоптотических клетках. Полученные результаты, свидетельствующие о сохранении зависимости между активностью апоптотических и антиапоптотических молекул в условиях активации Т-лимфоцитов и индукции апоптоза, подтвердили наше предположение о сохранении баланса процессов пролиферации и апоптоза в культурах Т-клеток здоровых людей.

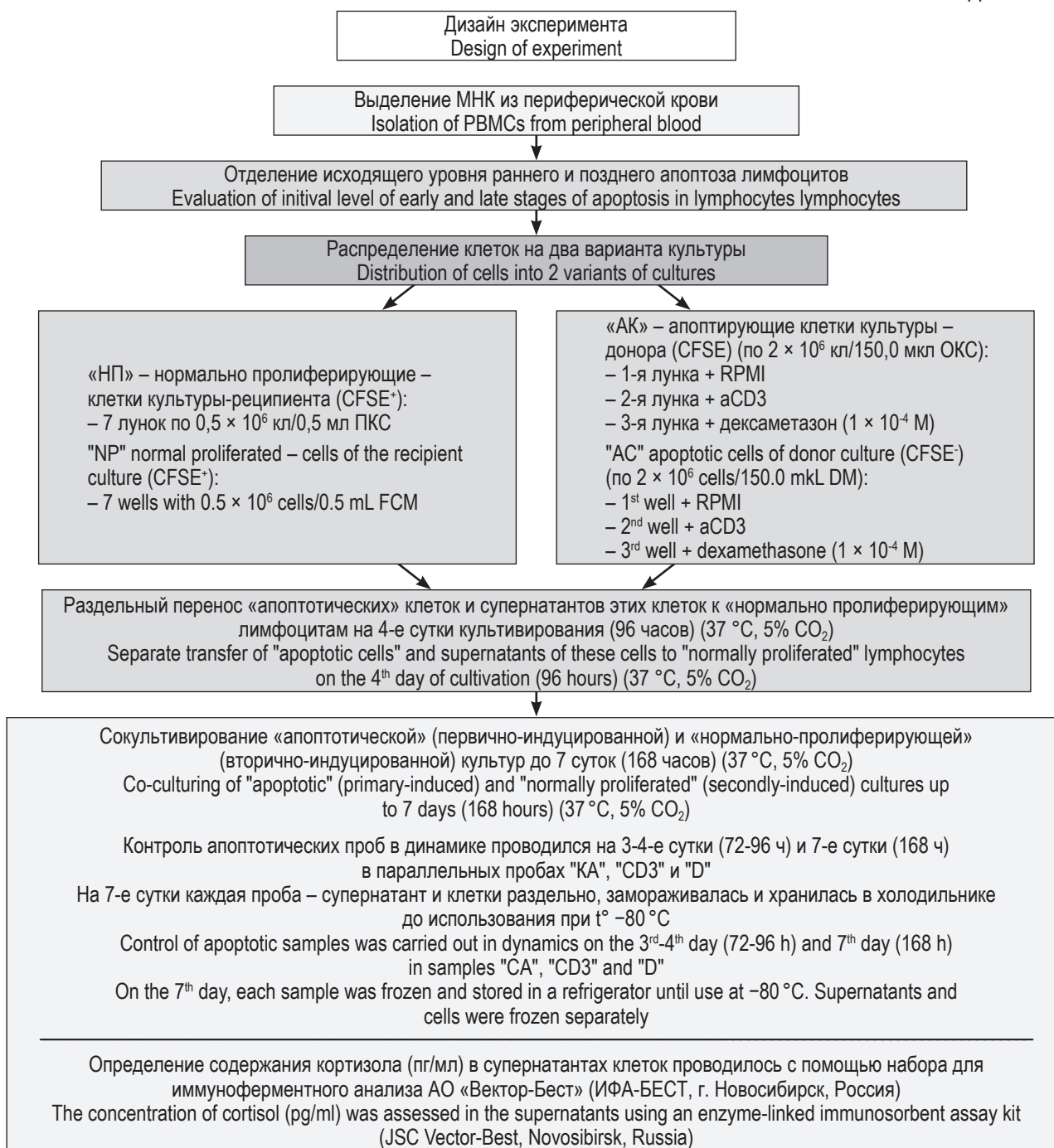
Известно, что метаболизм дексаметазона (D), синтетического аналога кортизола, отличается от метаболизма кортизола, в частности фермент 11 β -HSD2 не только инактивирует эндогенные ГКС, но и изменяет направление действия D в пользу активации продукции стероидов [13, 14]. Известно, что эндогенные ГКС как стимулируют, так и подавляют Т-клеточный иммунитет, в частности повышают активность Th2 и подавляют ответы Th1 [15]. Учитывая установленную ранее повышенную чувствительность к глюкокортикоидам у пациентов с РА, мы определяли содержание кортизола (нмоль/мл) в кондиционных средах исследуемых проб пациентов с РА и здоровых людей. Было выявлено значимое повышение уровня кортизола в пробах апоптотирующих клеток “D72-96h” и “D168h” относительно смешанной пробы “Dsup” 0,00 (0,00 $\div$ 97,74) у пациентов с РА: D (72-96 ч), 935,02 (497,06 $\div$ 1410,75), $p = 0,0019$; и D (168 ч), 1067,27 (358,74 $\div$ 2187,15), $p = 0,028$. В большинстве проб здоровых людей кортизол не был обнаружен, только в апоптотических пробах – D (72-96 ч) и D (169 ч) имелись единичные положительные результаты, которые не привели к достоверным различиям, ни внутри группы, ни в сравнении с группой пациентов, а также к значимым корреляционным связям исследуемых молекул с кортизолом. В то же время у пациентов с РА были определены связи, имеющие функциональное значение. В частности, положительная зависимость между уровнем кортизола в пробе D (72-96 ч) и содержанием IL-6 и пробе “CD3168h”, $r = 0,94$, $p = 0,0048$, а также отрицательная за-

висимость между уровнем кортизола и TNF α , $r = -0,9$, $p = 0,037$, в пробе “D168h”. Кроме того, уровень кортизола в пробе D (72-96 ч) имел прямые связи с параметрами p53 в пробах “KAsup” $r = 0,9$, $p = 0,037$ и “CD3sup” $r = 0,9$, $p = 0,04$, и также в пробе “CD3sup” прямую связь с Bcl-2, $r = 0,97$, $p = 0,0048$. Учитывая высокие уровни продуцируемого кортизола и наличие корреляционных связей с патогенетически значимыми молекулами, можно предположить, что локально продуцируемый кортизол у пациентов с РА выполняет модулирующую роль в поддержании баланса пролиферации и апоптоза Т-лимфоцитов при длительном культивировании в условиях скученности и обеднения среды.

Заключение

Таким образом, тесное взаимодействие между «апоптотирующими» и «пролиферирующими» Т-лимфоцитами при инкубации в условиях «клеточного соседства» позволило определить сходные и различающиеся функции созданных клеточных систем у здоровых людей и пациентов с РА. Для обеих исследуемых групп была характерна вторичная индукция апоптоза, относящаяся к его неавтономным эффектам, появление значимого количества активированных Т-лимфоцитов, повышение уровней IL-6 и IL-4, низкий уровень IFN γ и снижение потенциала рецепторного и митохондриального апоптоза, а также отсутствие различий по уровню апоптоза между группами.

В то же время у здоровых людей снижался высокий изначально уровень TNF α , а IL-6 повышался умеренно, не изменялись уровни p53 и Bcl-2, и сохранялось большое количество положительных корреляционных зависимостей между исследуемыми факторами во всех вариантах смешанных и «апоптотических» культур, что свидетельствовало о сохранении функционального баланса клеток в неблагоприятных условиях у доноров. Пациентов с РА характеризовало повышение числа живых клеток в «апоптотических» культурах, уровня Ki-67⁺Т-лимфоцитов, свидетельствующее о пролиферативных процессах в условиях апоптоза, отсутствие ответа TNF α на индукцию апоптоза, отсутствие связей между исследуемыми молекулами в «апоптотических» культурах и синтез кортизола в них, а также наличие функциональных связей кортизола с исследуемыми молекулами в апоптотических культурах, что свидетельствовало об изменении межклеточных взаимодействий и нарушении гомеостаза Т-лимфоцитов в условиях «клеточного соседства» у пациентов с РА.



Примечание. НП – нормально пролиферирующая культура клеток (CFSE⁺); АК – апоптотическая культура клеток (CFSE⁻); ПКС – полная культуральная среда; ОКС – обедненная культуральная среда; (CFSE⁻) – клетки культуры-донора; (CFSE⁺) – клетки культуры-реципиента; КА – контроль инкубации в условиях «клеточного соседства» пролиферирующих и апоптотических клеток; CD3 – инкубация в условиях «клеточного соседства» пролиферирующих и стимулированных aCD3 апоптотических клеток; D – инкубация в условиях «клеточного соседства» пролиферирующих и стимулированных дексаметазоном (1 × 10⁻⁴ M) апоптотических клеток.

Note. NP, normally proliferated cell culture (CFSE⁺); AC, apoptotic cell culture (CFSE⁻); FCM, full culture medium; DM, depleted culture medium; (CFSE⁻), cells of the donor-culture; (CFSE⁺), cells of the recipient-culture; CA, control of incubation in the conditions of "cellular neighborhood" of proliferating and apoptotic cell; CD3, incubation in the conditions of "cell neighborhood" of proliferating and stimulated by aCD3 apoptotic cell; D, incubation in the conditions of "cell neighborhood" of proliferating and stimulated by dexamethasone (1 × 10⁻⁴ M) apoptotic cells.

Номинальные названия совместно культивируемых проб клеток, пролиферирующих в полной культуральной среде (НП), и аутологичных апоптотических клеток (АК)

Nominal names of co-cultured samples of cells, proliferated in a full culture medium (NP), and autologous apoptotic cells (AC)

«Контроль» (К) "Control"	– 0,5 млн клеток в 0,5 мл полной культуральной среды (ПКС) – 0.5×10^6 cells in full culture medium (FCM)
«Контроль апоптоза» (КА) "Control of apoptosis"	0,5 млн клеток в ПКС + 2 млн клеток апоптотической культуры 0.5×10^6 cells in FCM + 2×10^6 cells from apoptotic culture
«Контроль апоптоза супернатант» (KAsup) "Control of apoptosis supernatant"	0,5 млн клеток в ПКС + супернатант от клеток апоптотической культуры 0.5×10^6 cells in FCM + supernatant from apoptotic culture
"CD3"	0,5 млн клеток в ПКС + 2 млн клеток стимулированной aCD3 апоптотической культуры 0.5×10^6 cells in FCM + 2×10^6 cells from apoptotic aCD3-stimulated culture
«CD3 супернатант» "CD3 sup"	0,5 млн клеток в ПКС + супернатант от стимулированной aCD3 апоптотической культуры 0.5×10^6 cells in FCM + supernatant from apoptotic aCD3-stimulated culture
"D" Dexa	0,5 млн клеток в ПКС + 2 млн клеток стимулированной Dexa апоптотической культуры 0.5×10^6 cells in FCM + 2×10^6 cells from apoptotic Dexa-stimulated culture
«Dexa супернатант» "Dsup"	0,5 млн клеток в ПКС + супернатант от стимулированной Dexa апоптотической культуры 0.5×10^6 cells in FCM + supernatant from apoptotic Dexa-stimulated culture

Примечание. Объемы переносимых клеток и супернатантов были доведены ПКС до равных объемов – 0,5 мл.
D – дексаметазон.

Note. The volumes of transferred cells and supernatants were equalized by FCM to 0.5 mL. Dexa, dexamethasone.

Список литературы / References

1. Абрамова Т.Я., Блинова Е.А., Гришина Л.В., Чумасова О.А., Сулутьян А.Э., Сизиков А.Э., Козлов В.А. Исследование неавтономных эффектов апоптоза в процессе инициации апоптотической гибели клеток *in vitro* у здоровых людей и пациентов с ревматоидным артритом // Медицинская иммунология, 2020. Т. 22, № 5. С. 847-866. [Abramova T.Ya., Blinova E.A., Grishina L.V., Chumasova O.A., Sulut'yan A.E., Sizikov A.E., Kozlov V.A. Studies of non-autonomous effects of apoptosis in the course of *in vitro* apoptotic cell death initiation in healthy persons and patients with rheumatoid arthritis. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2020, Vol. 22, no. 5, pp. 847-866. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-SON-1991.
2. Абрамова Т.Я., Блинова Е.А., Пашкина Е.А., Гришина Л.В., Ильина Н.А., Чумасова О.А., Сизиков А.Э., Козлов В.А. Исследование эффекторных молекул автономного и неавтономного влияния апоптоза Т-лимфоцитов в условиях «клеточного соседства» в культуре у здоровых людей и пациентов с РА // Медицинская иммунология, 2022. Т. 24, № 6. С. 1119-1138. [Abramova T.Ya., Blinova E.A., Pashkina E.A., Grishina L.V., Ilina N.A., Chumasova O.A., Sizikov A.E., Kozlov V.A. Studies of effector molecules exerting autonomous and nonautonomous influence of T lymphocyte apoptosis under the conditions of *in vitro* "cell neighborhood" in healthy people and patients with rheumatoid arthritis. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2022, Vol. 24, no. 6, pp. 1119-1138. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-SOE-2527.
3. Абрамова Т.Я., Цура В.А., Блинова Е.А., Моренкова А.Ю., Чумасова О.А., Сулутьян А.Э., Сизиков А.Э., Козлов В.А. Индукция апоптоза лимфоцитов здоровых людей и пациентов с ревматоидным артритом в условиях «клеточного соседства» *in vitro* // Бюллетень сибирской медицины, 2019. Т. 18, № 1. С. 155-163. [Abramova T.Ya., Tsura V.A., Blinova E.A., Morenkova A.Yu., Chumasova O.A., Sulutian A.E., Sizikov A.E., Kozlov V.A. Induction of lymphocyte apoptosis in healthy individuals and patients with rheumatoid arthritis under "cellular neighborhood" *in vitro*. *Byulleten sibirskoy meditsiny = Bulletin of Siberian Medicine*, 2019, Vol. 18, no. 1, pp. 155-163. (In Russ.)]
4. Cui Y., Guo G. Immunomodulatory Function of the Tumor Suppressor p53 in Host Immune Response and the Tumor Microenvironment. *Int. J. Mol. Sci.*, 2016, Vol. 17, no. 11, 1942. doi: 10.3390/ijms17111942.
5. Iwaszko M., Biały S., Bogunia-Kubik K. Significance of Interleukin (IL)-4 and IL-13 in Inflammatory Arthritis. *Cells*, 2021, Vol. 10, no. 11, 3000. doi: 10.3390/cells10113000.
6. Kalliolias, G.D., Ivashkiv L.B. TNF biology, pathogenic mechanisms and emerging therapeutic strategies. *Nat. Rev. Rheumatol.*, 2016, Vol. 12, no. 1, pp. 49-62.
7. Kato M. New insights into IFN- γ in rheumatoid arthritis: role in the era of JAK inhibitors. *Immunol. Med.*, 2020, Vol. 43, no. 2, pp. 72-78.
8. Kawamoto Y., Nakajima Y.I., Kuranaga E. Apoptosis in cellular society: communication between apoptotic cells and their neighbors. *Int. J. Mol. Sci.*, 2016, Vol. 17, no. 12, 2144. doi: 10.3390/ijms17122144.
9. Kondo N., Kuroda T., Kobayashi D. Cytokine networks in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Int. J. Mol. Sci.*, 2021, Vol. 22, no. 20, 10922. doi: 10.3390/ijms222010922.
10. Luo P., Wang P., Xu J., Hou W., Xu P., Xu K., Liu L. Immunomodulatory role of T helper cells in rheumatoid arthritis: a comprehensive research review. *Bone Joint Res.*, 2022, Vol. 11, no. 7, pp. 426-438.
11. Pandolfi F., Franza L., Carusi V., Altamura S., Andriollo G., Nucera E. Interleukin-6 in rheumatoid arthritis. *Int. J. Mol. Sci.*, 2020, Vol. 21, no. 15, 5238. doi: 10.3390/ijms21155238.
12. Pérez-Garijo A. When dying is not the end: Apoptotic caspases as drivers of proliferation. *Semin. Cell Dev. Biol.*, 2018, Vol. 82, pp. 86-95.
13. Shimba A., Ikuta K. Control of immunity by glucocorticoids in health and disease. *Semin. Immunopathol.*, 2020, Vol. 42, no. 6, pp. 669-680.
14. Slominski R.M., Tuckey R.C., Manna P.R., Jetten A.M., Postlethwaite A., Raman C., Slominski A.T. Extra-adrenal glucocorticoid biosynthesis: implications for autoimmune and inflammatory disorders. *Genes Immun.*, 2020, Vol. 21, no. 3, pp. 150-168.
15. Taves M.D., Ashwell J.D. Glucocorticoids in T cell development, differentiation and function. *Nat. Rev. Immunol.*, 2021, Vol. 21, no. 4, pp. 233-243.

Авторы:

Абрамова Т.Я. — д.м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории клинической иммунопатологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

Блинова Е.А. — к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории клинической иммунопатологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

Authors:

Abramova T.Ya., PhD, MD (Medicine), Leading Research Associate, Laboratory of Clinical Immunopathology, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

Blinova E.A., PhD (Biology), Senior Research Associate, Laboratory of Clinical Immunopathology, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

Пашкина Е.А. — к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории клинической иммунопатологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

Гришина Л.В. — к.б.н., научный сотрудник лаборатории клинической иммунопатологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

Ильина Н.А. — врач-ревматолог клиники иммунопатологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

Чумасова О.А. — к.м.н., врач-ревматолог клиники иммунопатологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

Сизиков А.Э. — к.м.н., заведующий отделением ревматологии — врач-ревматолог клиники иммунопатологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

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

Pashkina E.A., PhD (Biology), Senior Research Associate, Laboratory of Clinical Immunopathology, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

Grishina L.V., PhD (Biology), Research Associate, Laboratory of Clinical Immunopathology, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

Ilna N.A., Rheumatologist, Clinic of Immunopathology, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

Chumasova O.A., PhD (Medicine), Rheumatologist, Clinic of Immunopathology, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

Sizikov A.E., PhD (Medicine), Head, Rheumatology Department, Clinic of Immunopathology, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

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

Поступила 01.06.2023
Принята к печати 04.10.2023

Received 01.06.2023
Accepted 04.10.2023

ДИНАМИКА ГУМОРАЛЬНОГО ИММУНИТЕТА ПРИ ЕСТЕСТВЕННОМ ИНФИЦИРОВАНИИ SARS-CoV-2 И/ИЛИ ПОСЛЕ ВАКЦИНАЦИИ ВАКЦИНОЙ «СПУТНИК V»

Иванов А.В.^{1,2,3}, Уварова М.А.¹, Фролов К.Б.³, Семенова Е.В.⁴

¹ Северо-Западный центр доказательной медицины, Санкт-Петербург, Россия

² Клиника высоких медицинских технологий имени Н.И. Пирогова ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет», Санкт-Петербург, Россия

³ ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

⁴ ФГБУ «Петербургский институт ядерной физики имени Б.П. Константинова» НИЦ «Курчатовский институт», г. Гатчина, Ленинградская обл., Россия

Резюме. Всесторонний анализ адаптивного иммунного ответа на SARS-CoV-2 имеет решающее значение для эпидемиологического мониторинга, отслеживания этапов формирования популяционного иммунитета и стратегий вакцинации. Понимание различий между иммунитетом, индуцированным конкретной вакциной, и иммунитетом, сформировавшимся в результате перенесенного COVID-19, — более частная задача в рамках этой проблемы. Кроме того, несомненный интерес представляет оценка влияния повторяющейся антигенной стимуляции на иммунологическую защиту от SARS-CoV-2.

Целью данной работы является сравнительный анализ развития гуморального иммунитета (анти-SARS-CoV-2 иммуноглобулины А и G) после естественной инфекции SARS-CoV-2 и/или после вакцинации антиковидной отечественной вакциной «Спутник V».

В исследовании приняли участие 36 добровольцев, из которых 21 человек перенес COVID-19, а затем, спустя ~8-10 месяцев, был вакцинирован (группа 1). У 15 первично вакцинированных человек предшествующее инфицирование SARS-CoV-2 было исключено с помощью периодически проводимых ПЦР- и серологических тестов (группа 2).

Интенсивность гуморального иммунного ответа при первичном естественном заражении корона-вирусной инфекцией и в результате индукции адаптивного иммунитета против SARS-CoV-2 посредством вакцинации вакциной «Спутник V» совпадает в обеих группах. Однако усредненные максимальные значения анти-SARS-CoV-2 IgA и IgG и скорость развития гуморального иммунного ответа после вакцинации значительно отличаются у ранее болевших COVID-19 и ранее не инфицированных SARS-CoV-2 людей. Мы получили статистически значимые различия между двумя группами участ-

Адрес для переписки:

Иванов Андрей Владимирович
Северо-Западный центр доказательной медицины
196247, Россия, Санкт-Петербург,
Пулковское шоссе, 28а.
Тел.: 8 (931) 360-58-52.
Факс: 8 (812) 625-25-25.
E-mail: gostyatin@gmail.com

Address for correspondence:

Andrei V. Ivanov
North-West Centre for Evidence-Based Medicine
28a Pulkovskoe Highway
St. Petersburg
196247 Russian Federation
Phone: +7 (931) 360-58-52.
Fax: +7 (812) 625-25-25.
E-mail: gostyatin@gmail.com

Образец цитирования:

А.В. Иванов, М.А. Уварова, К.Б. Фролов, Е.В. Семенова
«Динамика гуморального иммунитета при
естественном инфицировании SARS-CoV-2 и/или после
вакцинации вакциной «Спутник V»» // Медицинская
иммунология, 2024. Т. 26, № 6. С. 1291-1300.
doi: 10.15789/1563-0625-DOH-2919

© Иванов А.В. и соавт., 2024

Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

A.V. Ivanov, M.A. Uvarova, K.B. Frolov, E.V. Semenova
“Dynamics of humoral immunity during natural SARS-
CoV-2 infection and/or after vaccination with the ‘Sputnik
V’ vaccine”, Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya
Immunologiya, 2024, Vol. 26, no. 6, pp. 1291-1300.
doi: 10.15789/1563-0625-DOH-2919

© Ivanov A.V. et al., 2024

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

DOI: 10.15789/1563-0625-DOH-2919

ников по t-критерию Стьюдента при сравнении усредненных максимальных уровней IgA после вакцинации ($p < 0,05$). Для IgG эти различия несколько меньше.

В первой группе усредненные максимальные значения уровней специфических IgA и IgG после естественного инфицирования SARS-CoV-2 и после последующей вакцинации различаются более чем в 2 раза. Временной интервал, за который уровень антител в крови достигал максимальных значений после вакцинации у ранее перенесших COVID-19 людей, оказался существенно меньшим, чем у ранее не сталкивавшихся с инфекцией SARS-CoV-2 людей. А по времени развития антительного ответа IgG после вакцинации и в случае диагностированного COVID-19 в первой группе мы получили статистически значимое различие по t-критерию Стьюдента ($p < 0,05$).

Таким образом, у людей с предшествующей естественной инфекцией развивается более быстрый, сильный и устойчивый ответ на вакцину «Спутник V», чем у не инфицированных ранее лиц.

Ключевые слова: анти-SARS-CoV-2 антитела, вакцинация, вакцина «Спутник V», гуморальный иммунитет, коронавирус SARS-CoV-2, COVID-19

DYNAMICS OF HUMORAL IMMUNITY DURING NATURAL SARS-CoV-2 INFECTION AND/OR AFTER VACCINATION WITH THE “SPUTNIK V” VACCINE

Ivanov A.V.^{a, b, c}, Uvarova M.A.^a, Frolov K.B.^c, Semenova E.V.^d

^a North-West Centre for Evidence-Based Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

^b N. Pirogov Clinic of Advanced Medical Technologies, St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russian Federation

^c St. Petersburg State Pediatric Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

^d B. Konstantinov Institute of Nuclear Physics, NRC Kurchatov Institute, Gatchina, Leningrad Region, Russian Federation

Abstract. Comprehensive analysis of adaptive immune response to SARS-CoV-2 is critical for epidemiological monitoring, as well as for tracking immune response stages and vaccination strategies. Understanding the differences between immunity formed after COVID-19 infection and vaccine-induced immunity is a specific task within this problem. Moreover, the obvious task is to assess the effect of repeated antigenic stimulation on immunological defense against SARS-CoV-2. The aim of present study was a comparative analysis of humoral immunity (anti-SARS-CoV-2 IgA and IgG) developing after natural infection with SARS-CoV-2 and/or after vaccination with anti-COVID vaccine “Sputnik V”. The study involved 36 volunteers. 21 of them had COVID-19 and were vaccinated 8-10 months later (group 1). In 15 primarily vaccinated persons, previous SARS-CoV-2 infection was excluded by means of regular PCR screening and serological testing (group 2). Results: Intensity of humoral immune response to the primary natural SARS-CoV-2 infection and similar indexes of antiviral adaptive immunity after vaccination with “Sputnik V” vaccine were similar in both groups. However, both maximal values of anti-SARS-CoV-2 IgA and IgG and the rates of post-vaccination humoral immune response differed significantly between the persons who have previously had COVID-19 and those who have not previously been infected with SARS-CoV-2. We've got statistically significant differences between two groups of participants using Student's t test comparing the average maximum IgA levels after vaccination ($p < 0.05$). For IgG levels, these differences are less pronounced. In the first group, the average maximal values of specific IgA and IgG levels after natural infection with SARS-CoV-2 and after subsequent vaccination differed by more than 2 times. The time intervals for reaching maximal antibody levels after vaccination proved to be significantly shorter in the subjects who had a story of COVID-19, than in persons who did not report a clinical COVID-19 infection. Concerning the terms of arising IgG antibody response after vaccination versus cases of COVID-19 in the first group, we obtained a statistically significant difference by the Student's t-test ($p < 0.05$). Hence, the persons with a previous natural COVID-19 infection develop a faster, stronger and more durable response to the “Sputnik V” vaccine than the subjects who had no such infection in their history.

Keywords: SARS-CoV-2, infection, vaccine, Sputnik V, humoral immunity

Введение

Одно из стратегических направлений в борьбе с вирусной пандемией — разработка и внедрение специфических вакцин. Эффективные вакцины против COVID-19 на различных платформах, индуцирующие образование анти-SARS-CoV-2 антител и демонстрирующие почти полную защиту от тяжелых форм заболевания и госпитализации, были созданы в рекордно короткие сроки во многих странах [3]. При этом как для оптимизации программ вакцинации против COVID-19, так и для общественного здравоохранения в целом важно понимание различий между иммунитетом, индуцированным конкретной вакциной, и иммунитетом, сформировавшимся в результате перенесенного COVID-19.

Сохранение более года защитного гуморального иммунитета, вызванного коронавирусами предыдущих поколений и другими острыми вирусными инфекциями, считается нормой. Адаптивный иммунитет к SARS-CoV-2, за некоторыми исключениями, будет развиваться и затухать аналогичным образом [2]. После инфицирования SARS-CoV-2, как правило, формируется устойчивый пул специфических антител, и риск повторного заражения существенно снижается [3, 10].

Появляющиеся в последнее время публикации позволяют предположить, что антитела, индуцированные антиковидными вакцинами, в значительной степени напоминают антитела, индуцированные естественной инфекцией [3]. При этом у людей с предшествующей естественной инфекцией SARS-CoV-2 развивается более быстрый и устойчивый ответ на мРНК-вакцины против COVID-19, чем у неинфицированных ранее лиц [3, 4, 6, 13, 16]. Показано, что после перенесенного даже в легкой форме COVID-19 достаточно введения только первой дозы двухкомпонентных мРНК-вакцин для достижения мощного иммунного ответа [3, 6, 16]. При этом людям, ранее не инфицированным SARS-CoV-2, требуются как первичные, так и бустерные инъекции для получения высоких титров антител [16].

Наше исследование посвящено долгосрочному мониторингу развития и затухания гуморального звена адаптивного иммунитета после вакцинации отечественной антиковидной вакциной на основе аденовирусного вектора «Спутник V» у людей, не инфицированных ранее SARS-CoV-2, и у людей, перенесших COVID-19 за несколько месяцев до вакцинации, и сравнительному анализу этих показателей.

Материалы и методы

Участники проекта

В исследовании приняли участие 36 добровольцев из числа 180 участников масштабного проекта по изучению особенностей гуморального иммунного ответа на инфекцию SARS-CoV-2, продолжавшемся почти 2 года (с мая 2020 по апрель 2022) в клинике высоких медицинских технологий имени Н.И. Пирогова Санкт-Петербургского государственного университета (Санкт-Петербург) [1, 7, 8]. Из них 21 человек до вакцинации перенес COVID-19, а у 15 человек предшествующее инфицирование SARS-CoV-2 было исключено с помощью периодически проводимых ПЦР- и серологических тестов. Средний период времени между положительным ПЦР-тестом, подтверждающим инфекцию SARS-CoV-2, и введением первой дозы вакцины составил $8,33 \pm 2,46$ месяца. Один человек (женщина 28 лет) с диагностированным COVID-19 впоследствии прошла вакцинацию дважды (через 11 месяцев после постановки диагноза и через 6 месяцев после получения первого компонента первой вакцинации).

Все участники вакцинировались вакциной «Спутник V» (АО «Биокад», Санкт-Петербург). «Спутник V» (регистрационное наименование — Gam-COVID-Vac; регистрационное свидетельство № ЛП-006395 от 11.08.2020, выданное Министерством Здравоохранения РФ) — комбинированная векторная вакцина для профилактики коронавирусной инфекции SARS-CoV-2 [9], разработанная Национальным исследовательским центром эпидемиологии и микробиологии имени Н.Ф. Гамалеи (Москва) на основе аденовирусного вектора со встроенным в него фрагментом генетического материала SARS-CoV-2, несущим информацию о структуре S-белка шипа вируса. Препарат состоит из двух компонентов (технология «гетерологический прайм-буст», в состав которых входят рекомбинантные аденовирусные векторы на основе двух различающихся сборок аденовируса человека. Второй компонент вакцины «Спутник V» вводится на 21-й день после введения первой дозы.

Вакцинацию проводили в августе-сентябре 2021 г. Уровни анти-SARS-CoV-2 иммуноглобулинов А и G в первые дни после вакцинации определяли с интервалом 3-4 дня (не менее 3 измерений), затем с интервалом 10-12 дней (не менее 2 измерений), в дальнейшем — через каждые 14-20 дней с помощью иммуноферментного анализа (ИФА) или иммунохемилюминесцентного анализа (ИХЛ).

Вакцина хорошо переносилась всеми участниками исследования, без существенной разницы в частоте связанных с вакцинацией побочных эффектов.

Заявление о соблюдении этических норм и стандартов работы с человеческим биоматериалом

Авторы заявляют, что использование человеческого биологического материала (кровь и смывы со слизистых оболочек носа и горла) было одобрено Комитетом по биомедицинской этике клиники высоких медицинских технологий имени Н.И. Пирогова Санкт-Петербургского государственного университета 16.07.2020 № 07/20. Все измерения проводились в соответствии с этическими принципами Хельсинкской декларации 1975 года. Все участники исследования заполнили и подписали информированное согласие на участие в этом исследовательском проекте и на публикацию результатов. Все данные обезличены.

Генетический анализ

Анализ наличия РНК вируса SARS-CoV-2 проводился из смывов со слизистых оболочек носа и зева методом ПЦР в реальном времени. Использовалась полностью автоматическая платформа Cobas 6800 и реагенты производства Roche (Швейцария). Все реакции проводились в соответствии с инструкцией изготовителя.

Иммуноферментный анализ

Иммуноферментный анализ (enzyme-linked immunosorbent assay; ELISA) с использованием рекомбинантного S1 домена гликопротеина шипа SARS-CoV-2 в качестве антигена для количественного определения анти-SARS-CoV-2 IgA и IgG проводился с помощью наборов реагентов Euroimmun (Германия). Венозная кровь забиралась натощак с использованием вакуумных пробирок с активатором свертывания и гелем Lind-Vac (Эстония). Применялись автоматический микропланшетный вошер HydroFlex, ридер Infinite F50 и программное обеспечение Magelan (Tecan, Швейцария).

Евроиммун рекомендует интерпретировать результаты следующим образом: ratio менее 0,8 — отрицательно как для IgA, так и для IgG. Ratio рассчитывается по следующей формуле: экстинкция контрольной пробы или образца пациента/экстинкция калибратора.

Иммунохемилюминесцентный анализ

Иммунохемилюминесцентные исследования для количественного определения анти-SARS-CoV-2 IgG проводился с помощью наборов реагентов SARS-CoV-2 IgG II Quant Abbott (Ирландия). Для оценки уровня специфических антител применялся иммунохимический автоматический

анализатор Architect i2000SR (Abbott, США) с собственным программным обеспечением. Результаты измерений представлены в виде условных единиц Arbitrary Unit на мл (AU/mL). Для пересчета в ratio применялась формула Иванова—Крышени для унификации данных Euroimmun и Abbott [7].

Статистический анализ

Статистическая обработка результатов исследования проводилась с использованием стандартных статистических функций электронных таблиц Microsoft Excel 2007 (статистический пакет Microsoft Office 97 для Windows, Редмонд, США) и онлайн-калькулятора для расчета статистических критериев «Медицинская статистика» (<https://medstatistic.ru/calculators.html>). Сравнение между группами проводилось с использованием t-критерия Стьюдента. Значения $p < 0,05$ считались статистически значимыми.

Результаты

В нашем исследовании, посвященном сравнительному анализу развития гуморального иммунитета после COVID-19 и/или после вакцинации вакциной «Спутник V», приняли участие 2 группы добровольцев. В первую группу вошел 21 человек, вакцинированные спустя 8-10 месяцев после диагностированного COVID-19. У участников исследования из 1-ой группы подтверждено наличие устойчивого гуморального иммунного ответа после перенесенного заболевания.

Вторую группу составили 15 людей, с отрицательным гуморальным иммунным ответом на новый коронавирус SARS-CoV-2 и с отрицательными результатами ПЦР-тестов за предшествующий вакцинации период наблюдения с апреля 2020 года по август-сентябрь 2021 года.

По гендерному составу и возрастным характеристикам эти 2 группы очень близки. В состав 1-ой группы (вакцинированные после болезни) вошли 12 мужчин и 9 женщин, средний возраст для мужчин $35,75 \pm 5,5$ года, для женщин $34 \pm 9,89$ года; 2-ой группы (здоровые люди) — 8 мужчин и 7 женщин, средний возраст для мужчин 32 ± 6 лет, для женщин $33,43 \pm 5,03$ года.

На рисунке 1 приведены характерные примеры развития и затухания гуморального иммунного ответа после вакцинирования «Спутник V» для представителей обеих групп.

В таблице 1 представлены сравнительные данные максимальных уровней анти-SARS-CoV-2 иммуноглобулинов классов IgA и IgG и усредненные времена достижения этих максимумов, полученные в случаях естественного инфициро-

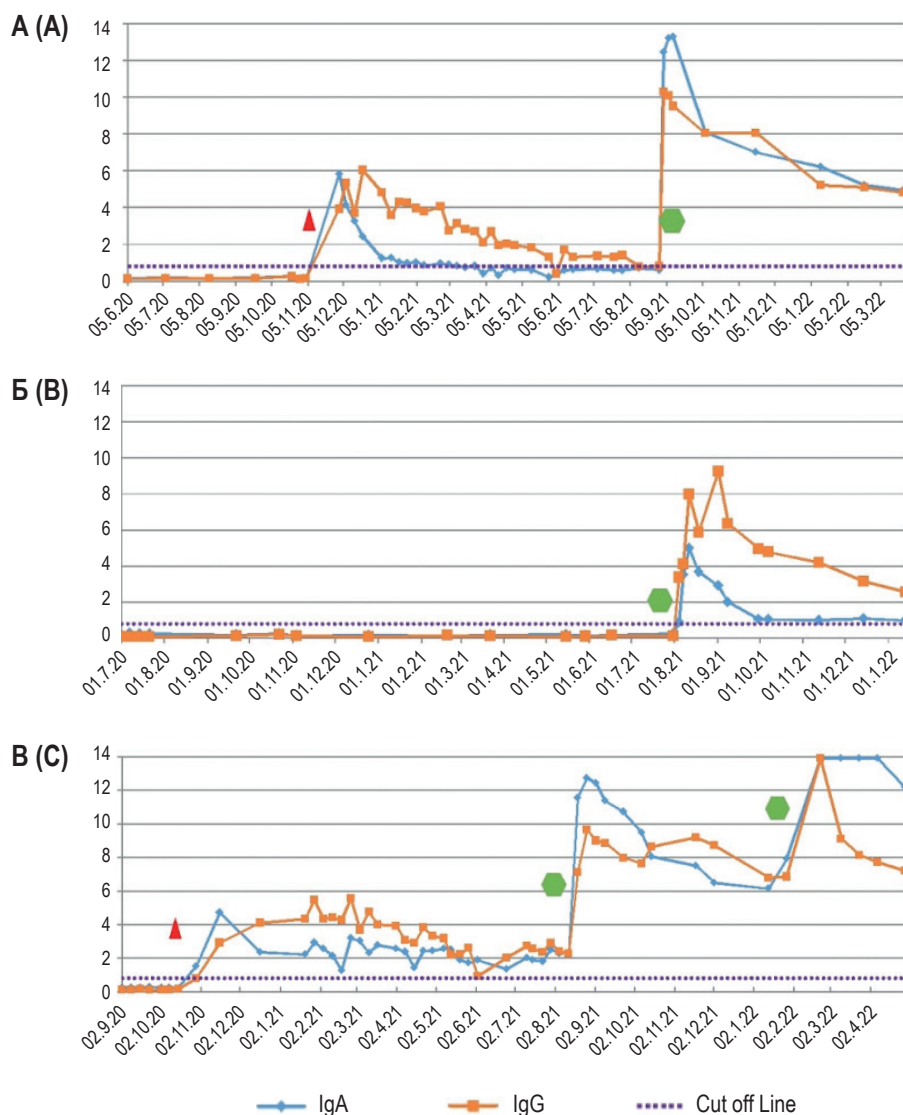


Рисунок 1. Примеры развития и затухания гуморального иммунного ответа на инфекцию SARS-CoV-2 после вакцинирования «Спутником V»

Примечание. А – характерный пример динамики уровней специфических IgA и IgG у участника проекта, перенесшего COVID-19 и вакцинированного спустя 10 месяцев после первичного подтверждения инфекции SARS-CoV-2 с помощью ПЦР-теста. Б – пример динамики уровней анти-SARS-CoV-2 IgA и IgG у участника проекта, не инфицированного новым коронавирусом до вакцинации. В – пример динамики уровней анти-SARS-CoV-2 IgA и IgG у участника проекта, перенесшего COVID-19 и вакцинированного дважды. Первый раз спустя 10 месяцев после первичного подтверждения инфекции SARS-CoV-2 с помощью ПЦР-теста и второй раз спустя 6 месяцев после первой вакцинации. После второй вакцинации уровень IgA превышает верхний предел тест-системы. По оси абсцисс – даты проведения анализов; по оси ординат – ratio иммуноглобулинов. Синие значки – IgA, красные значки – IgG. Красный треугольник – дата подтверждения заболевания COVID-19 с помощью ПЦР-теста. Зеленый гексагон – дата введения первой дозы вакцины «Спутник V». Пунктирная линия – линия отсечки нормальных показателей уровней специфических иммуноглобулинов.

Figure 1. Development and extinction examples of humoral immune response to SARS-CoV-2 infection after vaccination with "Sputnik V"

Note. A is a typical example of specific IgA and IgG levels dynamics in a project participant who had COVID-19 and was vaccinated 10 months after the initial confirmation of SARS-CoV-2 infection using a PCR test. B is an example of anti-SARS-CoV-2 IgA and IgG levels dynamics in a project participant who was not infected with the new coronavirus before vaccination. C is an example of anti-SARS-CoV-2 IgA and IgG levels dynamics in a project participant who had COVID-19 and was vaccinated twice. The first time it was 10 months after the initial confirmation of SARS-CoV-2 infection using a PCR test and the second time it was 6 months after the first vaccination. After the second vaccination the IgA level exceeds the test system upper limit. The abscissa shows the dates of tests; the ordinate is Ig ratio. Blue icons are IgA, red icons are IgG. The red triangle is the date of COVID-19 disease confirmation using a PCR test. The green hexagon is the date of "Sputnik V" vaccine first dose administration. The dotted line is the cut-off line for normal levels of specific Ig.

ТАБЛИЦА 1. МАКСИМАЛЬНЫЕ УРОВНИ АНТИ-SARS-CoV-2 IgA и IgG и УСРЕДНЕННЫЕ ВРЕМЕНА ДОСТИЖЕНИЯ ЭТИХ МАКСИМУМОВ В СЛУЧАЯХ ЕСТЕСТВЕННОГО ИНФИЦИРОВАНИЯ КОРОНАВИРУСОМ (ПЕРЕНЕСЕННЫЙ COVID-19) И/ИЛИ ВАКЦИНАЦИИ ВАКЦИНОЙ «СПУТНИК V»

TABLE 1. ANTI-SARS-CoV-2 IgA AND IgG MAXIMUM LEVELS AND AVERAGE TIMES TO REACH THESE MAXIMUM LEVELS OBTAINED IN CASES OF NATURAL INFECTION WITH CORONAVIRUS (COVID-19) AND/OR "SPUTNIC V" VACCINATION

	Заболевание COVID-19 COVID-19 illness cases				Вакцинация «Спутник V» "Sputnic V" vaccination				Отношение максимальных уровней антител Ratio of maximum antibody levels	
	IgA		IgG		IgA		IgG		IgA	IgG
	ratio	Время, дни Time, days	ratio	Время, дни Time, days	ratio	Время, дни Time, days	ratio	Время, дни Time, days		
Переболевшие COVID-19 пациенты COVID-19 recovered patients n = 21	7,08 ± 3,19	17,4 ± 2,5	5,30 ± 2,19	41,80 ± 12,88 a	13,45 ± 1,35 b	12,10 ± 3,68	9,43 ± 2,71	11,90 ± 3,91 a1	2,33 ± 1,21	2,05 ± 0,76
Вакцинированные здоровые люди Vaccinated healthy people n = 15					6,42 ± 1,78 b1	8,00 ± 0,82	7,53 ± 1,32	15,75 ± 5,38		

Примечание. a, a1; b, b1 $p < 0,05$ по критерию Стьюдента.

Note. a, a1; b, b1 $p < 0.05$ by Student's t-test.

вания коронавирусом (перенесенный COVID-19) и/или вакцинации.

Точка начала мониторинга уровней анти-SARS-CoV-2 иммуноглобулинов в случае болезни — дата первого положительного ПЦР-теста, в случае вакцинации — дата введения первого компонента вакцины. Анализировалось 3 варианта развития гуморального иммунного ответа: заболевание, вакцинация людей, ранее переболевших COVID-19, и вакцинация людей, ранее не болевших COVID-19.

Как видно из представленных данных, усредненные максимальные значения анти-SARS-CoV-2 IgA и IgG и скорость развития гуморального иммунного ответа после вакцинации значительно отличаются у ранее болевших COVID-19 и ранее не инфицированных SARS-CoV-2 людей.

Для IgA максимальный зафиксированный уровень ratio для вакцинированных участников проекта после перенесенного COVID-19 более чем в 2 раза (13,45 против 6,42) превышает этот показатель для вакцинированных доноров, ранее не болевших COVID-19. Мы получили статистически значимые различия между двумя группами

по t-критерию Стьюдента при сравнении усредненных максимальных уровней IgA после вакцинации ($p = 0,003489$; $p < 0,05$). Для IgG эти различия несколько меньше (9,43 против 7,53).

Усредненные максимальные значения уровней специфических IgA и IgG после естественного инфицирования SARS-CoV-2 и после вакцинации в группе ранее не болевших COVID-19 доноров различаются незначительно (7,08 против 6,42 для IgA и 5,3 против 7,53 для IgG). Т.е. интенсивность гуморального иммунного ответа при первичном естественном заражении коронавирусом и в результате индукции адаптивного иммунитета против SARS-CoV-2 посредством вакцинации вакциной «Спутник V» совпадает в обеих группах.

В первой группе усредненные максимальные значения уровней специфических IgA и IgG после естественного инфицирования SARS-CoV-2 и после последующей вакцинации различаются более чем в 2 раза. По-видимому, это свидетельствует о значительном усилении антителого ответа после вторичного контакта с SARS-CoV-2.

Среднее время, за которое уровень антител в крови достигал максимальных значений по-

сле вакцинации у ранее перенесших COVID-19 людей, оказалось менее продолжительным, чем у ранее не сталкивавшихся с инфекцией SARS-CoV-2 людей (12,1 против 8 дней для IgA и 11,9 против 15,75 дня для IgG). При этом в обеих группах максимальное значение анти-SARS-CoV-2 иммуноглобулинов А и G после вакцинации первым компонентом достигается до введения второй дозы вакцины.

Еще большая разница по этому показателю (усредненное время, за которое достигнут максимальный уровень специфических иммуноглобулинов) наблюдается при сравнении данных в первой группе в случае первичного заболевания COVID-19 и вакцинации после перенесенного заболевания. Обращает на себя внимание разница в скорости нарастания антительного ответа IgG. После вакцинации ранее перенесших COVID-19 людей максимальное значение уровня IgG достигается за 11,9 дня против 41,8 дня при естественном инфицировании SARS-CoV-2. Это статистически значимое различие по t-критерию Стьюдента ($p = 0,032204$; $p < 0,05$).

Несомненный интерес представляют результаты мониторинга уровней специфических иммуноглобулинов единственного участника проекта, который после перенесенного COVID-19 прошел вакцинацию дважды (через 11 месяцев после постановки диагноза и через 6 месяцев после получения первого компонента первой вакцинации). Это женщина 28 лет, которая была отнесена нами к группе с характерной для вирусных инфекций динамикой гуморального иммунного ответа. Период времени до достижения максимальных уровней антител:

- при COVID-19 – для IgA – 26 дней, для IgG – 34 дня;
- при первой вакцинации – для IgA и IgG – 9 дней;
- при второй вакцинации – для IgA и IgG – 4 дня.

Т. е. с каждым новым случаем столкновения с генетическим материалом коронавируса иммунная реакция организма становится все более стремительной, что подтверждает сохранение иммунологической памяти SARS-CoV-2 [4]. Соотношение максимальных уровней антител при COVID-19 и после первой вакцинации – для IgA = 2,69, для IgG = 1,76; при COVID-19 и после второй вакцинации – для IgA = 2,95, для IgG = 2,59; после первой и второй вакцинации – для IgA = 1,09, для IgG = 1,47. Видно, что при повторных контактах с SARS-CoV-2 происходит постепенное усиление гуморального ответа, в дальнейшем, по-видимому, выходящее на плато

по максимальным значениям антительного ответа. Кроме того, если при естественной инфекции по прошествии 6 месяцев после постановки диагноза COVID-19 мы фиксировали существенное снижение уровней анти-SARS-CoV-2 IgA и IgG, то после первой вакцинации эти показатели все еще оставались на высоком уровне.

Обсуждение

Сегодня нет ясного понимания различий между иммунитетом, индуцированным вакциной, и иммунитетом в результате естественного инфицирования SARS-CoV-2, отсутствует консолидированное мнение относительно продолжительности действия эффекта вакцинации для не сталкивавшихся ранее с инфекцией новым коронавирусом людей и людей, перенесших COVID-19.

Основываясь на результатах нашего исследования, можно сделать вывод, что вакцинация вакциной «Спутник V» после перенесенного COVID-19 вызывает более сильный и, по-видимому, более длительный антительный ответ по сравнению с иммунной реакцией на вакцинацию у ранее не болевших COVID-19 людей. При этом гуморальный иммунный ответ нарастает значительно быстрее после вакцинации в обеих группах (у не инфицированных коронавирусом SARS-CoV-2 до вакцинации участников проекта и у участников проекта, перенесших COVID-19 до вакцинации) по сравнению со скоростью развития в результате естественного инфицирования, и максимальные значения уровней анти-SARS-CoV-2 иммуноглобулинов А и G достигаются еще до введения второй дозы вакцины. Т. е. с каждым новым случаем столкновения с генетическим материалом коронавируса иммунная реакция организма становится все более стремительной.

Следует отметить, что интенсивность гуморального иммунного ответа при первичном естественном заражении коронавирусной инфекцией и в результате индукции адаптивного иммунитета против SARS-CoV-2 посредством вакцинации вакциной «Спутник V» совпадает в обеих группах. При этом усредненные максимальные значения и скорость развития гуморального иммунного ответа после вакцинации значительно отличаются у ранее болевших COVID-19 и ранее не инфицированных SARS-CoV-2 людей. Значения максимальных уровней как IgA, так и IgG после вакцинации в первой группе более чем в 2 раза превышали эти показатели вследствие естественного инфицирования (табл. 1). Кроме того, если при естественной инфекции по прошествии

6 месяцев после постановки диагноза COVID-19 мы фиксировали существенное снижение уровней анти-SARS-CoV-2 IgA и IgG, то после первой вакцинации эти показатели все еще оставались на высоком уровне. В случае повторного вакцинирования после перенесенного COVID-19 максимальные значения уровней специфических иммуноглобулинов еще увеличивались относительно уровней после первой вакцинации, но уже не так существенно (рис. 1B).

Быстрый и устойчивый ответ специфических антител на вакцинацию подтверждает сохранение иммунологической памяти SARS-CoV-2 [4].

Недавние исследования мРНК-вакцин Pfizer/BioNTech и Moderna против COVID-19 также показали более высокие титры антител у вакцинированных с предшествующей инфекцией, чем у не сталкивавшихся до вакцинации с SARS-CoV-2 людей [6, 11, 12, 14]. Однако существуют и противоположные мнения, согласно которым перенесенный COVID-19 способствует формированию более интенсивного и более динамичного, по сравнению с первичной вакцинацией, гуморального иммунного ответа, особенно у людей с тяжелой формой заболевания [16]. При этом бустерная вакцинация индуцирует значительно более высокие титры нейтрализующих антител и, вероятно, более устойчивый по сравнению с COVID-19 антительный ответ. Важно, что все исследователи сходятся в главном, подтверждая эффективность вакцинации, а также предполагая, что вакцинация обеспечивает большую защиту от SARS-CoV-2 по сравнению с иммунными последствиями COVID-19. Кроме того, зафиксирована положительная корреляция между уровнем анти-S-RBD IgG и количеством клонов Т-клеток, специфичных для белка SARS-CoV-2S, у вакцинированных вакциной BNT162b2 людей, что подтверждает представление о параллельной мобилизации обоих звеньев адаптивного иммунитета (гуморального и клеточного), опосредованной вакцинацией [16].

В связи с этим обращает на себя внимание существенное уменьшение времени достижения максимальных уровней анти-SARS-CoV-2 иммуноглобулинов после вакцинации по сравнению со временем развития гуморального иммунного ответа при естественном инфицировании (табл. 1). Причем если для не сталкивавшихся с инфекцией SARS-CoV-2 людей из 2-й группы и людей из первой группы с ранее диагностированным COVID-19 значения этих параметров после введения первого компонента вакцины близки, то для вакцинированных участников проекта из 1-й группы мы фиксируем большее расхождение

для IgA и статистически значимое различие ($p < 0,05$) для IgG.

Наши результаты согласуются с результатами аналогичных исследований, продемонстрировавших, что у всех людей с ранее существовавшим иммунитетом через неделю после введения первой дозы мРНК-вакцины BNT162b2 наблюдалось быстрое увеличение плазменных IgG против RBD SARS-CoV-2 [16]. Кроме того, у ранее инфицированных лиц титры антител через 7 дней после введения первой дозы вакцины существенно не отличались от титров, наблюдаемых у ранее не инфицированных людей через 7 дней после введения второй дозы вакцины, что позволяет предположить достаточность одной дозы вакцины для эффективного иммунного ответа у людей с ранее диагностированным COVID-19 [6]. Отметим, что в представленной нами работе пиковые уровни уровней анти-SARS-CoV-2 иммуноглобулинов А и G достигаются еще до введения второй дозы вакцины «Спутник V» в обеих группах вакцинированных, что согласуется с данными других авторов для мРНК-вакцины Pfizer/BioNTech [4, 15]. Т. е. существенная иммунная защита, вероятно, срабатывает уже после первой инъекции, независимо от платформы, на основе которой разработана та или иная вакцина, предполагая, что вторая доза может быть введена здоровым людям молодого/среднего возраста (например, < 65 лет) через несколько месяцев после первой прививки [15]. Действительно, многокомпонентные вакцины, например вакцины против вирусов гепатита, вируса папилломы человека и вируса кори (использующие разные вакцинные платформы), вводятся с интервалом в несколько месяцев или даже лет [5]. Однако, учитывая, что различные платформы вакцин по-разному воздействуют на иммунную систему, стратегия отсрочки введения второй дозы антиковидной вакцины потребует тщательно спланированных клинических испытаний.

Заключение

Резюмируя, повторяющаяся антигенная стимуляция усиливает иммунологическую защиту от SARS-CoV-2, однако эффективность вакцины будет снижаться по мере распространения вирусов, несущих мутации в ключевых эпитопах нейтрализующих антител, что позволит SARS-CoV-2 частично уклоняться от распознавания антител. Т. е. необходимо обновление вакцин, индуцирующих мощные иммунные ответы против новых штаммов коронавируса по аналогии с вакцинацией против сезонного гриппа [3].

Список литературы / References

1. Семенова Е.В., Павлюк В.В., Уварова М.А., Иванов А.В. Особенности гуморального иммунитета после перенесенного COVID-19// Медицинская иммунология, 2022. Т. 24, № 2. С. 341-354. [Semenova E.V., Pavliuk V.V., Uvarova M.A., Ivanov A.V. Features of humoral immunity after COVID-19. *Meditinskaya Immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2022. Vol. 24, no. 2, pp. 337-350. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-FOH-2452.
2. Baumgarth N., Nikolich-Zugich J., Lee F.E.-H., Bhattacharya D. Antibody responses to SARS-CoV-2: let's stick to known knowns. *J. Immunol.*, 2020, Vol. 205, no. 9, pp. 2342-2350.
3. Castro Dopico X., Ols S., Loré K., Karlsson Hedestam G.B. Immunity to SARS-CoV-2 induced by infection or vaccination. *J. Intern. Med.*, 2022, Vol. 291, no. 1, pp. 32-50.
4. 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.
5. Gallagher K.E., Kadokura E., Eckert L.O., Miyake S., Mounier-Jack S., Aldea M., Ross D.A., Watson-Jones D. Factors influencing completion of multi-dose vaccine schedules in adolescents: a systematic review. *BMC Public Health*, 2016, Vol. 16, 172. doi: 10.1186/s12889-016-2845-z.
6. Gobbi F., Buonfrate D., Moro L., Rodari P., Piubelli C., Caldrea S., Riccetti S., Sinigaglia A., Barzon L. Antibody response to the BNT162b2 mRNA COVID-19 vaccine in subjects with prior SARS-CoV-2 infection. *Viruses*, 2021, Vol. 13, no. 3, 422. doi: 10.3390/v13030422.
7. Ivanov A., Kryshen E., Semenova E. Nonlinear interdependence of the results of measuring anti-SARS-CoV-2 IgG levels using Abbott and Euroimmun test systems. *J. Clin. Virol.*, 2023, Vol. 164, 105448. doi: 10.1016/j.jcv.2023.105448.
8. Ivanov A., Semenova E. Long-term monitoring of the development and extinction of IgA and IgG responses to SARS-CoV-2 infection. *J. Med. Virol.*, 2021, Vol. 93, pp. 5953-5960.
9. Logunov D.Y., Dolzhikova I.V., Zubkova O.V., Tukhvatullin A.I., Shcheblyakov D.V., Dzharullaeva A.S., Grousova D.M., Erokhova A.S., Kovyrshina A.V., 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., Lubenets N.L., Egorova D.A., Shmarov M.M., Nikitenko N.A., Morozova L.F., Smolyarchuk E.A., Kryukov E.V., Babira V.F., Borisevich S.V., Naroditsky B.S., Gintsburg A.L. Safety and immunogenicity of an rAd26 and rAd5 vector-based heterologous prime-boost COVID-19 vaccine in two formulations: two open, non-randomised phase 1/2 studies from Russia. *Lancet*, 2020, Vol. 396, no. 10255, pp. 887-897.
10. Lumley S.F., O'Donnell D., Stoesser N.E., Matthews P.C., Howarth A., Hatch S.B., Marsden B.D., Cox S., James T., Warren F., Peck L.J., Ritter T.G., de Toledo Z., Warren L., Axten D., Cornall R.J., Jones E.Y., Stuart D.I., Srean G., Ebner D., Hoosdally S., Chand M., Crook D.W., O'Donnell A.-M., Conlon C.P., Pouwels K.B., Walker A.S., Peto T.E.A., Hopkins S., Walker T.M., Jeffery K., Eyre D.W. Antibody status and incidence of SARS-CoV-2 infection in health care workers. *N. Engl. J. Med.*, 2021, Vol. 384, no. 6, pp. 533-540.
11. Manisty C., Otter A.D., Treibel T.A., McKnight Á., Altmann D.M., Brooks T., Noursadeghi M., Boyton R.J., Semper A., Moon J.C. Antibody response to first BNT162b2 dose in previously SARS-CoV-2-infected individuals. *Lancet*, 2021, Vol. 397, no. 10279, pp. 1057-1058.
12. Prendecki M., Clarke C., Brown J., Cox A., Gleeson S., Guckian M., Randell P., Dalla Pria A., Lightstone L., Xu X.-N., Barclay W., McAdoo S.P., Kelleher P., Willicombe M. Effect of previous SARS-CoV-2 infection on humoral and T-cell responses to single-dose BNT162b2 vaccine. *Lancet*, 2021, Vol. 397, no. 10280, pp. 1178-1181.
13. Rapaka R.R., Hammershaimb E.A., Neuzil K.M. Are some COVID vaccines better than others? Interpreting and comparing estimates of efficacy in trials of COVID-19 vaccines. *Clin. Infect. Dis.*, 2021. Vol. 74, no. 2, pp. 352-358.
14. Stamatatos L., Czartoski J., Wan Y.-H., Homad L.J., Rubin V., Glantz H., Neradilek M., Seydoux E., Jennewein M.F., MacCamy A.J., Feng J., Mize G., De Rosa S.C., Finzi A., Lemos M.P., Cohen K.W., Moodie Z., McElrath M.J., McGuire A.T. mRNA vaccination boosts cross-variant neutralizing antibodies elicited by SARS-CoV-2 infection. *Science*, 2021, Vol. 372, no. 6549, pp. 1413-1418.
15. Terpos E., Trougakos I.P., Apostolou F., Charitaki I., Sklirou A.D., Mavrianou N., Papanagnou E.D., Liacos C.I., Gumeni S., Rentziou G., Korompoki E., Papassotiriou I., Dimopoulos M.A. Age-dependent and gender-dependent antibody responses against SARS-CoV-2 in health workers and octogenarians after vaccination with the BNT162b2 mRNA vaccine. *Am. J. Hematol.*, 2021, Vol. 96, no. 7, pp. E257-E259. doi: 10.1002/ajh.26185.

16. Trougakos I.P., Terpos E., Zirou C., Sklirou A.D., Apostolakou F., Gumeni S., Charitaki I., Papanagnou E.D., Bagratuni T., Liacos C.I., Scorilas A., Korompoki E., Papassotiriou I., Kastritis E., Dimopoulos M.A. Comparative kinetics of SARS-CoV-2 anti-spike protein RBD IgGs and neutralizing antibodies in convalescent and naïve recipients of the BNT162b2 mRNA vaccine versus COVID-19 patients. *BMC Med.*, 2021, Vol. 19, no. 1, 208. doi: 10.1186/s12916-021-02090-6.

Авторы:

Иванов А.В. — к.б.н., руководитель лаборатории трансляционной биомедицины, Северо-Западный центр доказательной медицины; биолог, Клиника высоких медицинских технологий имени Н.И. Пирогова ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет»; доцент кафедры медицинской биологии ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Уварова М.А. — биолог, Северо-Западный центр доказательной медицины, Санкт-Петербург, Россия

Фролов К.Б. — к.б.н., доцент кафедры медицинской биологии ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Семенова Е.В. — к.б.н., научный сотрудник отдела молекулярной и радиационной биологии ФГБУ «Петербургский институт ядерной физики имени Б.П. Константинова» НИЦ «Курчатовский институт», г. Гатчина, Ленинградская обл., Россия

Authors:

Ivanov A.V., PhD (Biology), Head, Translation Biomedicine Laboratory, North-West Centre for Evidence-Based Medicine; Biologist, N. Pirogov Clinic of Advanced Medical Technologies, St. Petersburg State University; Associate Professor, Medical Biology Department, St. Petersburg State Pediatric Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Uvarova M.A., Biologist, North-West Centre for Evidence-Based Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

Frolov K.B., PhD (Biology), Associate Professor, Medical Biology Department, St. Petersburg State Pediatric Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Semenova E.V., PhD (Biology), Research Associate, Department of Molecular and Radiation Biology, B. Konstantinov Institute of Nuclear Physics, NRC Kurchatov Institute, Gatchina, Leningrad Region, Russian Federation

Поступила 20.10.2023
Принята к печати 10.01.2024

Received 20.10.2023
Accepted 10.01.2024

ПРЕПАРАТЫ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ ДЛЯ ВНУТРИВЕННОГО ВВЕДЕНИЯ И РЕКОМБИНАНТНОГО ГРАНУЛОЦИТАРНОГО КОЛОНИЕСТИМУЛИРУЮЩЕГО ФАКТОРА ВЛИЯЮТ НА ЭКСПРЕССИЮ ЦИТОТОКСИЧЕСКИХ РЕЦЕПТОРОВ НК-КЛЕТОК

**Давыдова А.А., Михайлова В.А., Ковалева А.А., Гребенкина П.В.,
Тыщук Е.В., Зементова М.С., Беспалова О.Н., Соколов Д.И.,
Сельков С.А.**

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

Резюме. Естественные киллеры (НК-клетки) представляют собой популяцию лимфоцитов системы врожденного иммунитета, способных к цитолизу инфицированных или трансформированных клеток без предварительной сенсibilизации. Естественные киллеры выявлены в различных органах и тканях и могут отличаться по фенотипическим и функциональным характеристикам в зависимости от локализации. Например, естественные киллеры являются преобладающей популяцией лимфоцитов децидуальной оболочки матки на ранних сроках беременности, их доля может составлять до 70%. В матке НК-клетки могут контактировать с клетками трофобласта плода, в отношении которых также могут проявлять цитотоксичность. Естественные киллеры регулируют инвазию клеток трофобласта в матку, способствуют ремоделированию спиральных артерий и установлению физиологического кровотока между организмами матери и плода. Обсуждается вклад нарушения функциональной активности НК-клеток в патогенез ранних репродуктивных потерь и бесплодия, вызванного иммунными факторами. Для лечения бесплодия применяют различные препараты, среди которых иммуноглобулины для внутривенного введения (ВВИГ) и рекомбинантный гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (G-CSF). Показано увеличение вероятности имплантации эмбриона и частоты успешных вынашиваний плода у женщин, получавших терапию этими препаратами. Предполагают, что эти препараты могут оказывать влияние на фенотип и функциональную активность НК-клеток. Актуально изучение эффектов препаратов ВВИГ и G-CSF на рецепторный профиль НК-клеток.

Адрес для переписки:

*Давыдова Алина Алексеевна
ФГБНУ «Научно-исследовательский институт
акушерства, гинекологии и репродуктологии имени
Д.О. Отта»
199034, Россия, Санкт-Петербург,
Менделеевская линия, 3.
Тел.: 8 (812) 328-98-50.
E-mail: alyadavydova@gmail.com*

Address for correspondence:

*Alina A. Davydova
D. Ott Research Institute of Obstetrics, Gynecology
and Reproductology
3 Mendeleevskaya Line
St. Petersburg
199034 Russian Federation
Phone: +7 (812) 328-98-50.
E-mail: alyadavydova@gmail.com*

Образец цитирования:

*А.А. Давыдова, В.А. Михайлова, А.А. Ковалева,
П.В. Гребенкина, Е.В. Тыщук, М.С. Зементова,
О.Н. Беспалова, Д.И. Соколов, С.А. Сельков
«Препараты иммуноглобулинов для внутривенного
введения и рекомбинантного гранулоцитарного
колониестимулирующего фактора влияют на
экспрессию цитотоксических рецепторов НК-клеток»
// Медицинская иммунология, 2024. Т. 26, № 6.
С. 1301-1308. doi: 10.15789/1563-0625-IIA-2872*

© Давыдова А.А. и соавт., 2024

*Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0*

For citation:

*A.A. Davydova, V.A. Mikhailova, A.A. Kovaleva,
P.V. Grebenkina, E.V. Tyshchuk, M.S. Zementova,
O.N. Bepalova, D.I. Sokolov, S.A. Selkov "Intravenous
immunoglobulins and recombinant granulocyte-colony
stimulating factor modulate expression of NK cytotoxic
receptors", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya
Immunologiya, 2024, Vol. 26, no. 6, pp. 1301-1308.
doi: 10.15789/1563-0625-IIA-2872*

© Davydova A.A. et al., 2024

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

DOI: 10.15789/1563-0625-IIA-2872

Целью настоящей работы была оценка экспрессии цитотоксических рецепторов клеток линии NK-92 в присутствии препаратов ВВИГ и рекомбинантного G-CSF.

В работе использовали клетки линии NK-92 в качестве эффекторов и клетки трофобласта линии JEG-3 в качестве клеток-мишеней. Клетки культивировали совместно в присутствии одного из препаратов, а также без добавления препаратов. С помощью проточной цитометрии оценивали экспрессию клетками NK-92 рецепторов CD45, CD56, CD215, KIR2DL3, KIR2DS4, NKG2D, NKp44, NKp30.

Установлено, что количество клеток линии NK-92, экспрессирующих рецепторы NKG2D, NKp30, KIR2DL3 и интенсивность экспрессии рецепторов NKG2D и NKp30, снижены в присутствии препаратов ВВИГ. В присутствии препарата G-CSF и клеток трофобласта снижено количество KIR2DL3⁺ и NKp44⁺ NK-клеток.

Полученные результаты могут быть связаны как с непосредственным, так и с косвенным влиянием исследуемых препаратов на фенотип NK-клеток.

Ключевые слова: NK-клетки, NK-92, трофобласт, JEG-3, иммуноглобулины для внутривенного введения, гранулоцитарный колониестимулирующий фактор, цитотоксические рецепторы

INTRAVENOUS IMMUNOGLOBULINS AND RECOMBINANT GRANULOCYTE-COLONY STIMULATING FACTOR MODULATE EXPRESSION OF NK CYTOTOXIC RECEPTORS

Davydova A.A., Mikhailova V.A., Kovaleva A.A., Grebenkina P.V., Tyshchuk E.V., Zementova M.S., Bepalova O.N., Sokolov D.I., Selkov S.A.

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

Abstract. Natural killer cells (NK cells) are a population of innate immune lymphocytes capable of cytolysis of infected or transformed cells without prior sensitization. Natural killers are detected in various organs and tissues and may differ in phenotypic and functional characteristics depending on localization. For example, NK cells are the dominant population (up to 70%) of decidual lymphocytes in early pregnancy. NK cells are able to contact with trophoblast cells, exert cytotoxicity towards them, as well as regulate their invasion, contributing to spiral arteries remodeling and establishment of physiological blood flow between mother and fetus. The contribution of impaired NK cell functional activity to immune mechanisms of the reproductive disorders is widely discussed. Various drugs are used to treat infertility, including intravenous immunoglobulins (IVIg) and recombinant granulocyte colony stimulating factor (G-CSF). Increased rates of embryo implantation and higher frequency of successful gestation have been shown after treatment with these drugs. The effect of these drugs on NK cells phenotype and functional activity is assumed, thus requiring further studies on the effects of IVIg and G-CSF on the receptor profile of NK cells.

The aim of this work was to evaluate expression of cytotoxic receptors on the NK-92 cells in presence of IVIg and recombinant G-CSF preparations.

NK-92 cells were used as effectors, and trophoblast-derived JEG-3 line served as target population. The cells were co-cultured in presence of drugs, as well as without them. Expression of CD45, CD56, CD215, KIR2DL3, KIR2DS4, NKG2D, NKp44, NKp30 receptors by NK-92 cells was evaluated by flow cytometry.

The number of NK-92 cells expressing NKG2D, NKp30, KIR2DL3 receptors and the expression intensity of NKG2D and NKp30 receptors were reduced in presence of IVIg preparations. The numbers of KIR2DL3⁺ and NKp44⁺ NK cells were reduced when supplied with G-CSF and trophoblast cells.

The obtained results may be associated with both direct and indirect effects of the studied drugs on the NK cell phenotype.

Keywords: NK cells, NK-92, trophoblast, JEG-3, intravenous immunoglobulins, granulocyte colony stimulating factor, cytotoxic receptors

This research was supported by the the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation, Research Program No. 122041500061-8.

Introduction

Natural killers are lymphocytes of the innate immune system, which are characterized by the manifestation of cytotoxicity against virus-infected or malignant cells in the body. The cytotoxic function of NK cells is regulated by the balance of signals from activating and inhibiting receptors. In addition to the antiviral and antitumor immune response, NK cells play an important role in the development of pregnancy. By developing cytotoxic activity against trophoblast cells invading the uterine wall and by secreting various cytokines, NK cells regulate trophoblast invasion, contributing to the establishment of the physiological blood flow between mother and fetus [13]. Violation of these processes can cause reproductive pathologies. For example, for women with recurrent miscarriage (RM), the increased cytotoxicity of peripheral blood NK cells against trophoblast cells of the JEG-3 line was shown *in vitro*, in comparison with healthy non-pregnant women [13]. Data on the cytotoxicity of NK cells at infertility and sterility state are contradictory. A number of studies have shown the increased cytotoxicity of peripheral blood NK cells in women with RM and implantation failures, comparing to healthy women [9]. At the same time, a meta-analysis of Seshadri S. & Sunkara S.K. (2014) evaluating the role of NK cells in the outcomes of *in vitro* fertilization (IVF) revealed no differences in live birth rates in women with increased cytotoxicity of NK cells compared to women with NK cell cytotoxicity lying within the normal range.

For treatment of infertility associated with immune factors, IVIG and recombinant G-CSF treatment are used. It has been shown that the use of IVIG in preparation for IVF procedure increases the probability of successful embryo implantation [6]. Previously, we have established the cytoprotective effect of IVIG against trophoblast cells during their contact interaction with NK cells in an *in vitro* model [7], however, the mechanism of IVIG effects is not clearly defined at the moment.

Data on the use of recombinant G-CSF are also ambiguous. In one of the studies, the frequency of successful termination of pregnancy in women with RM receiving G-CSF therapy was almost twice as high as in women with RM receiving placebo [10]. At the same time, the positive effect of G-CSF on pregnancy development in women with a history of

three or more unsuccessful IVF attempts has not been confirmed [1].

Thus, IVIG and G-CSF are used in clinical practice to increase the likelihood of developing a successful pregnancy. However, the data on the direct effect of these drugs on NK cells are contradictory that requires additional research. In this regard, **the aim of the work** was to evaluate the expression of cytotoxic receptors of NK-92 line cells in the presence of IVIG preparations and recombinant G-CSF.

Materials and methods

We used NK-92 line cells (ATCC, USA) with phenotypic and functional characteristics of activated NK cells, as well as cells of the JEG-3 line cells (ATCC, USA), corresponding in their characteristics to the extracellular trophoblasts of the first trimester of pregnancy. The cells were cultured according to ATCC protocols.

The expression of cytotoxic receptors by NK-92 line cells was assessed after culturing cells with G-CSF at a concentration of 400,000 IU per 100 μ L of medium and with IVIG at concentrations of 12 mg/mL and 6 mg/mL. In addition, the expression of receptors by NK-92 line cells was evaluated in case of incubation with trophoblast cells of the JEG-3 line, in the presence of G-CSF or IVIG at the above mentioned concentrations.

Recombinant IL-2 (Biotech, Russia) was added to the NK-92 line cells at a concentration of 500 IU/mL. Cells were placed in the wells of a round-bottomed 96-well plate at concentration of 150,000 cells per 100 μ L of medium. A recombinant G-CSF at a concentration of 400,000 IU/100 μ L was added to the part of the wells. The cells were incubated for 24 hours at 37 °C and 5% CO₂. The next day, trophoblast cells of the JEG-3 line were added to NK-92 line cells at concentration of 30,000 cells per 50 μ L of medium. In part of the wells with NK-92 line cells without the G-CSF preparation, the drug IVIG was added at concentrations 12 mg/mL and 6 mg/mL. The cells were settled by centrifugation at 100g for 3 minutes. Then the cells were incubated for 4 hours at 37 °C and 5% CO₂. After incubation, the cells were treated with a Hanks solution containing 1% embryonic calf serum, the samples were incubated for 10 minutes at 4 °C. Then the cells were treated with antibodies to the receptors: CD45; CD56; CD215; KIR2DL3; KIR2DS4; NKG2D; NKp44; NKp30 (BD, USA). Isotypic antibodies were added to the part of the wells to control the nonspecific binding of the antibodies (BD, USA). The antibody-treated samples were incubated for 20 minutes in the dark at

room temperature. The samples were then analysed using a FACSCanto II flow cytofluorimeter, assessing the relative number of cells expressing receptors and the intensity of receptor expression on the surface of NK cells.

Statistical data processing was carried out using the GraphPad Prism version 8.0.0 for Windows, GraphPad Software, San Diego, California USA, www.graphpad.com. Nonparametric Mann-Whitney test, Kraskel-Wallis test and Wilcoxon test were used.

Results and discussion

Analysis of NK-92 line cells expression of NKG2D activating receptor showed that the number of cells expressing it and the intensity of expression of this receptor were reduced in the presence of IVIG at concentrations of 12 mg/mL and 6 mg/mL (Figure 1A, B). Receptor NKG2D is an activating transmembrane protein of the CD94/NKG2 family of type C lectin receptors. NKG2D ligands are stress-induced proteins of the MIC and RAET1/ULBP families, which are expressed on the surface of malignant cells and infected cells. In the literature, there are few publications on the expression of NKG2D receptor in reproductive pathologies. In one of the studies, the level of NKG2D expression by peripheral blood NK cells in women with repeated implantation failures and in fertile non-pregnant women did not differ [15]. The decrease in the level of activating NKG2D receptor in the presence of IVIG, which we have established, is consistent with the decrease in the cytotoxic function of NK-92 line cells in the presence of IVIG shown earlier [7].

It was found that the addition of IVIG at concentrations of 12 mg/mL and 6 mg/mL to NK-92 line cells caused a decrease in the number of NKp30⁺ NK cells, as well as a decrease in the intensity of their expression of NKp30 (Figure 1C, D). NK cell receptor NKp30 belongs to the family of natural cytotoxicity receptors. Its ligands BAG6 and B7-H6 are characteristic for virus-infected and tumour cells. Earlier, an *in vitro* model of interaction between dendritic cells and peripheral blood NK cells showed a decrease in the expression of NKp30 receptor by NK cells in the presence of IVIG [14]. However, in our work, the addition of trophoblast cells of the JEG-3 line did not cause significant changes in the expression of NKp30 receptor. There is also evidence of changes in NKp30 isoforms in peripheral blood and placenta at early pregnancy loss. The differences in receptor isoforms are also shown in women with elective termination of pregnancy compared to women with spontaneous miscarriage [12], but not in the overall

level of NKp30 expression. Thus, the obtained data complement the literature data on the effect of drugs for RM and infertility treatment.

After incubation of NK cells with IVIG at the concentration of 6 mg/mL, the relative number of cells expressing the inhibitory receptor KIR2DL3 was increased compared to KIR2DL3⁺ cells of the NK-92 line after cocultivation with JEG-3 line cells and IVIG line (Figure 1E). There were no changes in the intensity of KIR2DL3 expression (Figure 1F). Receptor KIR2DL3 belongs to the group of inhibitory receptors of the KIR group – transmembrane glycoproteins expressed by NK cells and T lymphocytes. The ligands for them are HLA class I molecules, which non-classical variants are present on trophoblast cells. The obtained results partially correspond to a decrease in the cytotoxic function of NK-92 line cells in presence of IVIG, which we showed earlier [7]. It should be noted that a whole spectrum of receptors is involved in NK cell realization of their cytotoxic potential. Therefore, IVIG possibly have not only a direct effect on NK cells, but also indirectly influence trophoblast cells. For example, it is shown that IVIG affect the expression of glycoprotein OX-2 of the immunoglobulin superfamily (CD200), which is expressed on trophoblast cells, as well as on endothelial and decidual cells, T and B lymphocytes, [3]. Its interaction with CD200R receptor leads to the synthesis of indolamine-2,3-dioxygenase by myeloid cells, as a result of which the proliferation of T lymphocytes and NK cells is inhibited and T regulatory lymphocytes are activated [4]. It is also possible that IVIG screen negatively charged membrane phospholipids of target cells (like “umbrella cover”) [8]. Further studies are required to study the effect of the IVIG on the interactions of NK cells with trophoblast cells.

We found that the relative number of NK-92 line cells expressing KIR2DL3 inhibitory receptor after incubation with JEG-3 line trophoblast cells and G-CSF was reduced compared to the relative number of KIR2DL3⁺ NK cells with G-CSF, but without trophoblast cells (Figure 2A). At the same time, there were no differences in the expression of KIR2DL3 between intact NK-92 line cells and NK-92 line cells with the addition of G-CSF. The intensity of KIR2DL3 expression in the presence of G-CSF also did not change (Figure 2B). According to the literature, trophoblast cells express a receptor for G-CSF [5]. *In vivo*, G-CSF is secreted by decidual macrophages and stimulates migration and invasion of trophoblast cells. The obtained data can be explained by the fact that in the presence of G-CSF, trophoblast cells acquire an invasive phenotype, which indirectly can cause changes in the phenotype of NK cells,

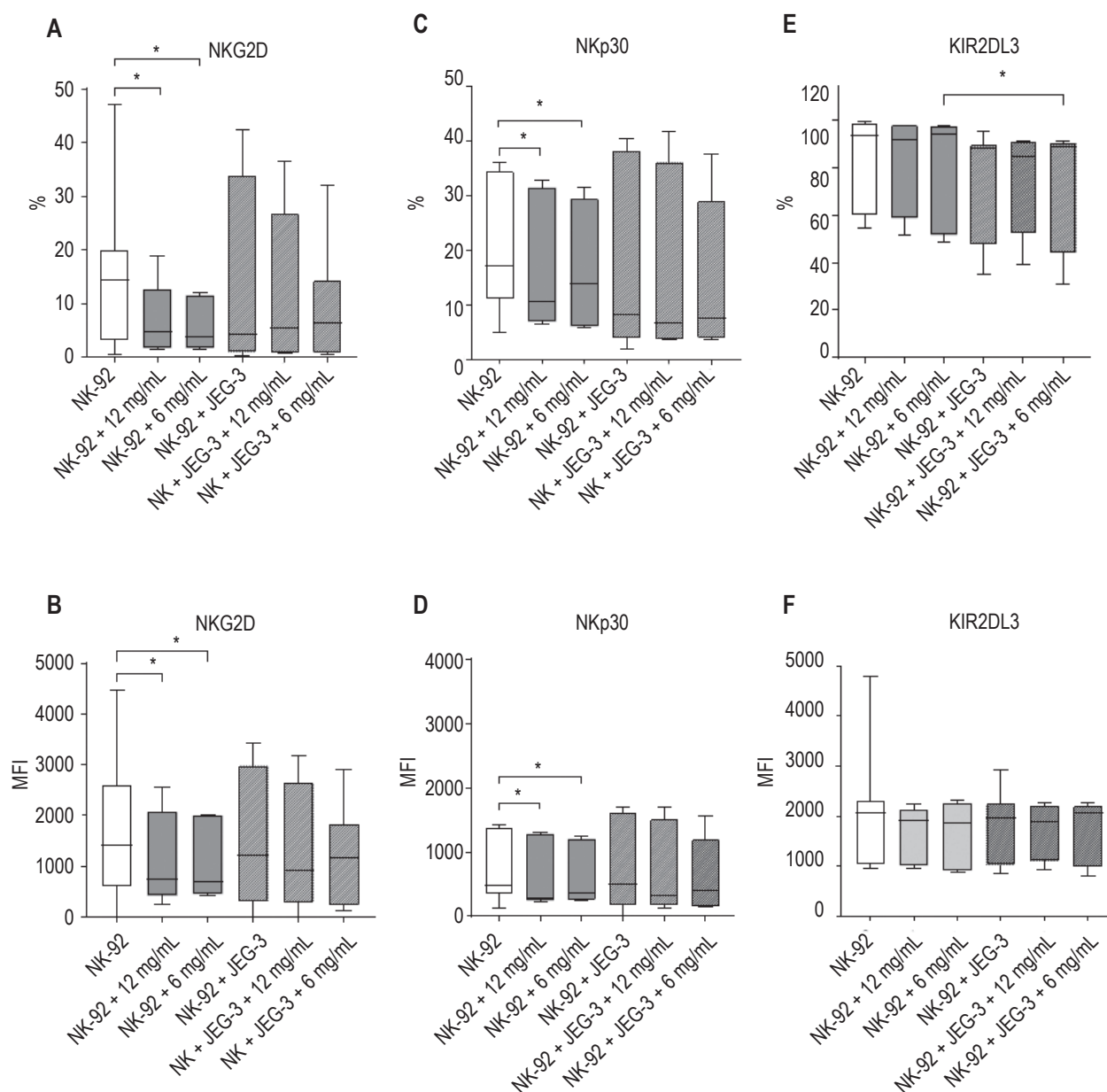


Figure 1. Relative number of NK-92 line cells expressing receptors (A) NKG2D, (C) NKp30, (E) KIR2DL3, as well as the intensity of expression (MFI) of these receptors (B, D, F) in presence of IVIG

Note. The significance of differences: *, $p < 0.05$.

leading to a decrease in the number of NK cells expressing inhibitory receptors, including KIR2DL3.

In this work, it was shown that the relative number of NK cells expressing NKp44 activating receptor after incubation with G-CSF was increased compared to the number of NKp44⁺ NK-92 line cells in the presence of JEG-3 line cells and G-CSF (Figure 2C). There were no changes in the intensity of expression of this receptor in presence of G-CSF (Figure 2D).

NKp44 receptor expression is specific to activated NK cells. Previously, a decrease in the relative number of NKp44⁺ peripheral blood NK cells was shown after stimulation with IL-2 and IL-15 cytokines in the presence of G-CSF, compared with NK cells stimulated by IL-2 and IL-15 and without the addition of G-CSF [11]. The decrease in the number of NK cells expressing NKp44 may be due to both the direct effect of G-CSF on NK cells and an indirect effect

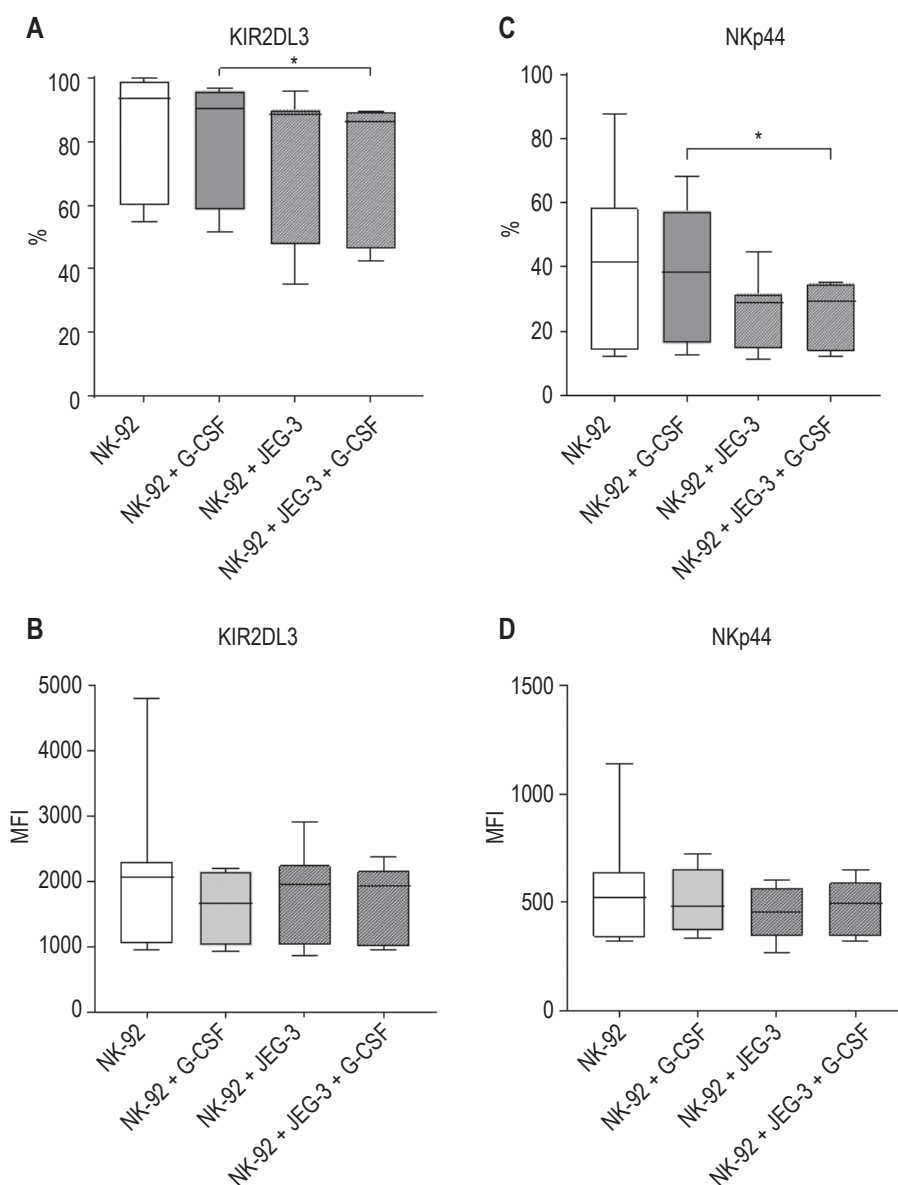


Figure 2. Relative number of NK-92 line cells expressing (A) KIR2DL3 and (C) NKp44, as well as the intensity of expression (MFI) of these receptors (B, D) in presence of recombinant G-CSF

Note. The significance of differences: *, $p < 0.05$.

involving trophoblast cells. There were no differences in the expression of other NK cell receptors in the presence of IVIG and G-CSF preparations.

Conclusion

Thus, the effect of the IVIG on the expression of NKG2D and NKp30 receptors by NK cells in a model using NK-92 line cells was established.

It has been demonstrated that in the presence of trophoblast cells of the JEG-3 line, IVIG and G-CSF contribute to a decrease in the number of NK cells expressing the KIR2DL3 receptor. G-CSF caused a decrease of the number of NK cells expressing NKp44 in the presence of trophoblast cells. The results obtained can be associated with both direct and indirect effects of the studied drugs on the phenotype of NK cells.

References

1. Arefi S., Fazeli E., Esfahani M., Borhani N., Yamini N., Hosseini A., Farifteh F. Granulocyte-colony stimulating factor may improve pregnancy outcome in patients with history of unexplained recurrent implantation failure: An RCT. *Int. J. Reprod. Biomed.*, 2018, Vol. 16, no. 5, pp. 299-304.
2. Arumugam T.V., Tang S.C., Lathia J.D., Cheng A., Mughal M.R., Chigurupati S., Magnus T., Chan S.L., Jo D., Ouyang X., Fairlie D.P., Granger D.N., Vortmeyer A., Basta M., Mattson M.P. Intravenous immunoglobulin (IVIG) protects the brain against experimental stroke by preventing complement-mediated neuronal cell death. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2007, Vol. 104, no. 35, pp. 14104-14109.
3. Barclay N., Gavin J., Brooke G., Brown M. CD200 and membrane protein interactions in the control of myeloid cells. *Trends Immunol.*, 2002, Vol. 23, Iss. 6, pp. 285-290.
4. Clark D.A., Wong K., Banwatt D. CD200-dependent and nonCD200-dependant pathways of NK cell suppression by human IVIG. *J. Assist. Reprod. Genet.*, 2008, Vol. 25, no. 2-3, pp. 67-72.
5. Ding J., Zhang Y., Cai X., Diao L., Yang C., Yang J. Crosstalk between trophoblast and macrophage at the maternal-fetal interface: current status and future perspectives. *Front. Immunol.*, 2021, Vol. 12, 758281. doi: 10.3389/fimmu.2021.758281.
6. Ho Y.K., Chen H.H., Huang C.C., Lee C.I., Lin P.Y., Lee M.S., Lee T.H. Peripheral CD56⁺ CD16⁺ NK cell populations in the early follicular phase are associated with successful clinical outcomes of intravenous immunoglobulin treatment in women with repeated implantation failure. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*, 2019, Vol. 10, 937. doi: 10.3389/fendo.2019.00937.
7. Mikhailova V.A., Davydova A.A., Bazhenov D.O., Kovaleva A.A., Zagaynova V.A., Kogan I.Yu., Beshpalova O.N., Gzgzyn A.M., Sokolov D.I., Selkov S.A. Modulation of the interaction between NK-cells and trophoblast by intravenous immunoglobulin. *Obstetrics and Gynecology (Russia)*, 2022, no. 6, pp. 105-113. (In Russ.)
8. Ronda N., Gatti R., Orlandini G., Borghetti A. Binding and internalization of human IgG by living cultured endothelial cells. *Clin. Exp. Immunol.*, 1997, Vol. 109, no. 1, pp. 211-216.
9. Salazar M.D., Wang W.J., Skariah A., He Q., Field K., Nixon M., Reed R., Dambaeva S., Beaman K., Gilman-Sachs A., Kwak-Kim J. Post-hoc evaluation of peripheral blood natural killer cell cytotoxicity in predicting the risk of recurrent pregnancy losses and repeated implantation failures. *J. Reprod. Immunol.*, 2022, Vol. 150, 103487. doi: 10.1016/j.jri.2022.103487.
10. Scarpellini F., Sbracia M. Use of granulocyte colony-stimulating factor for the treatment of unexplained recurrent miscarriage: a randomised controlled trial. *Hum. Reprod.*, 2009, Vol. 24, no. 11, pp. 2703-2708.
11. Schlaesa L., Jaimes Y., Blasczyk R., Figueiredo C. Granulocyte-colony-stimulatory factor: a strong inhibitor of natural killer cell function. *Transfusion*, 2011, Vol. 51, no. 2, pp. 293-305.
12. Shemesh A., Tirosh D., Sheiner E., Benshalom Tirosh N., Brusilovsky M., Segev R., Rosental B., Porgador A. First trimester pregnancy loss and the expression of alternatively spliced NKp30 isoforms in maternal blood and placental tissue. *Front. Immunol.*, 2015, Vol. 6, 189. doi: 10.3389/fimmu.2015.00189.
13. Sokolov D.I., Mikhailova V.A., Agnayeva A.O., Bazhenov D.O., Khokhlova E.V., Beshpalova O.N., Gzgzyn A.M., Selkov S.A. NK and trophoblast cells interaction: cytotoxic activity on recurrent pregnancy loss. *Gynecol. Endocrinol.*, 2019, Vol. 35, Suppl. 1, pp. 5-10.
14. Tha-In T., Metselaar H.J., Tilanus H.W., Groothuisink Z.M.A., Kuipers E.J., de Man R.A., Kwekkeboom J. Intravenous immunoglobulins suppress T-cell priming by modulating the bidirectional interaction between dendritic cells and natural killer cells. *Blood*, 2007, Vol. 110, no. 9, pp. 3253-3262.
15. Zhang H., Huang C., Chen X., Li L., Liu S., Li Y., Zhang Y., Zeng Y., Hu L. The number and cytotoxicity and the expression of cytotoxicity-related molecules in peripheral natural killer (NK) cells do not predict the repeated implantation failure (RIF) for the *in vitro* fertilization patients. *Genes Dis.*, 2019, Vol. 7, no. 2, pp. 283-289.

Авторы:

Давыдова А.А. — младший научный сотрудник лаборатории межклеточных взаимодействий, отдел иммунологии и межклеточных взаимодействий ФГБНУ «Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии имени Д.О. Отта», Санкт-Петербург, Россия

Михайлова В.А. — к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории межклеточных взаимодействий, отдел иммунологии и межклеточных взаимодействий ФГБНУ «Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии имени Д.О. Отта», Санкт-Петербург, Россия

Authors:

Davydova A.A., Junior Research Associate, Laboratory of Intercellular Interactions, Department of Immunology and Intercellular Interactions, D. Ott Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductology, St. Petersburg, Russian Federation

Mikhailova V.A., PhD (Biology), Senior Research Associate, Laboratory of Intercellular Interactions, Department of Immunology and Intercellular Interactions, D. Ott Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductology, St. Petersburg, Russian Federation

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

Гребенкина П.В. — младший научный сотрудник лаборатории межклеточных взаимодействий, отдел иммунологии и межклеточных взаимодействий ФГБНУ «Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии имени Д.О. Отта», Санкт-Петербург, Россия

Тыщук Е.В. — младший научный сотрудник лаборатории межклеточных взаимодействий, отдел иммунологии и межклеточных взаимодействий ФГБНУ «Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии имени Д.О. Отта», Санкт-Петербург, Россия

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

Беспалова О.Н. — д.м.н., заместитель директора по научной работе ФГБНУ «Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии имени Д.О. Отта», Санкт-Петербург, Россия

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

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

Grebenkina P.V., Junior Research Associate, Laboratory of Intercellular Interactions, Department of Immunology and Intercellular Interactions, D. Ott Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductology, St. Petersburg, Russian Federation

Tyshchuk E.V., Junior Research Associate, 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., Laboratory Technician, Laboratory of Intercellular Interactions, Department of Immunology and Intercellular Interactions, D. Ott Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductology, St. Petersburg, Russian Federation

Bespalova O.N., PhD, MD (Medicine), Deputy Director, D. Ott Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductology, St. Petersburg, Russian Federation

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

Поступила 17.05.2023
Отправлена на доработку 04.07.2023
Принята к печати 04.10.2023

Received 17.05.2023
Revision received 04.07.2023
Accepted 04.10.2023

ФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ СТАТУС НЕЙТРОФИЛОВ КРОВИ ПРИ ВРОЖДЕННЫХ ДЕФЕКТАХ АНТИТЕЛОПРОДУКЦИИ

Новикова И.А., Прокопович С.С.

УО «Гомельский государственный медицинский университет», г. Гомель, Республика Беларусь

Резюме. Проанализированы показатели функционального статуса нейтрофилов крови у 100 взрослых пациентов с верифицированным диагнозом «первичный дефицит антителопродукции» (44 пациента с общим переменным иммунодефицитом — ОВИД, 56 человек с селективным дефицитом IgA — SIgAD). Диагноз установлен в соответствии с диагностическими критериями Панамериканской группы по лечению иммунодефицитов (Pan-American Group for Immunodeficiency) и Европейским обществом иммунодефицитов (European Society for Immunodeficiency). Критериями постановки диагноза являлись клинико-анамнестические данные и результаты лабораторных исследований. Все пациенты с ОВИД получали регулярную заместительную терапию препаратами иммуноглобулинов, а пациенты с SIgAD — симптоматическое лечение при необходимости. Обследование проводилось вне эпизода инфекционно-воспалительного процесса и обострения хронической патологии в день обращения для плановой госпитализации, до проведения лечебно-диагностических процедур. Кроме общепринятого для изучаемых заболеваний клинико-лабораторного обследования проведена оценка функционального статуса нейтрофилов: продукция супероксид-анион-радикала, образование экстрацеллюлярных сетей (нетоз, NETs), поглотительная и апоптотическая активность. С учетом клинических проявлений пациенты с ОВИД разделены на 6 клинических подгрупп: без осложнений, связанных с ОВИД (13,6%); инфекционные осложнения в виде бронхоэктатической болезни (15,9%), аутоиммунный синдром (22,7%), поликлональная лимфоидная инфильтрация (13,6%), энтеропатический синдром (34,1%) и злокачественные новообразования (9,1%). У пациентов с SIgAD выделили 4 фенотипа: без осложнений, связанных с SIgAD (28,6%); аутоиммунный синдром (16,1%), незлокачественная лимфопролиферация (3,6%) и энтеропатия (28,6%). Выявлена более высокая частота неинфекционных осложнений (аутоиммунный синдром, незлокачественная лимфопролиферация, энтеропатии) при ОВИД по сравнению с SIgAD ($\chi^2 = 10,27$; $p = 0,001$). У пациентов обеих групп обнаружены изменения реактивности нейтрофилов по сравнению с контрольными значениями в виде повышения базальной генерации супероксидных радикалов ($p < 0,001$), активности нетоза ($p = 0,005$) и апоптоза ($p < 0,001$) при снижении поглотительной функции ($p < 0,001$) и резерва образования активных форм кислорода ($p < 0,001$). Максимальная степень изменения поглотительной и супероксид-продуцирующей активности наблюдалась при ОВИД, а нетоза — при SIgAD. Развитие осложнений неинфекционного характера сопровождалось значительным повышением параметров стимулированного нетоза (NETst), что делает этот показатель перспективным для оценки стабильности течения и прогноза развития осложнений при врожденных дефектах антителопродукции.

Ключевые слова: селективный дефицит иммуноглобулина А, общий переменный иммунодефицит, взрослые пациенты, клинические фенотипы, нейтрофилы, нетоз

Адрес для переписки:

Прокопович Светлана Сергеевна
УО «Гомельский государственный медицинский университет»
246000, Республика Беларусь, г. Гомель, ул. Ланге, 5.
Тел.: +375 (232) 35-98-38.
Факс: +375 (232) 35-98-38.
E-mail: prokopovich.s1983@gmail.com

Address for correspondence:

Svetlana S. Prokopovich
5 Lange St
Gomel
246000 Republic of Belarus
Phone: +375 (232) 35-98-38.
Fax: +375 (232) 35-98-38.
E-mail: prokopovich.s1983@gmail.com

Образец цитирования:

И.А. Новикова, С.С. Прокопович «Функциональный статус нейтрофилов крови при врожденных дефектах антителопродукции» // Медицинская иммунология, 2024. Т. 26, № 6. С. 1309-1314.
doi: 10.15789/1563-0625-FSO-2947

© Новикова И.А., Прокопович С.С., 2024
Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

I.A. Novikova, S.S. Prokopovich "Functional status of blood neutrophils in congenital defects of antibody production", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2024, Vol. 26, no. 6, pp. 1309-1314.
doi: 10.15789/1563-0625-FSO-2947

© Novikova I.A., Prokopovich S.S., 2024
The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License
DOI: 10.15789/1563-0625-FSO-2947

FUNCTIONAL STATUS OF BLOOD NEUTROPHILS IN CONGENITAL DEFECTS OF ANTIBODY PRODUCTION

Novikova I.A., Prokopovich S.S.

Gomel State Medical University, Gomel, Republic of Belarus

Abstract. We evaluated some functional indices of neutrophils in 100 adult patients with a verified diagnosis of primary antibody production deficiency (44 patients with common variable immunodeficiency – CVID, and 56 patients with selective IgA deficiency – SIgAD). The diagnosis was made according to the criteria of the Pan-American Group for Immunodeficiency and European Society for Immunodeficiency. The criteria for diagnosis were based on clinical data, medical history and results of laboratory tests. All patients with CVID received regular immunoglobulin replacement therapy, and the SIgAD patients received symptomatic treatment on demand. The examination was performed beyond the infectious episodes, inflammatory events or exacerbation of chronic disorders upon admission for planned hospitalisation, before any therapeutic and diagnostic procedures. In addition to standard clinical and laboratory examination appointed for the mentioned diseases, we assessed functional status of neutrophils: superoxide-anion radical production, NETosis, phagocytosis and apoptosis. Taking into account clinical manifestations, the patients with CVID were divided into 6 clinical subgroups: without CVID-related complications (13.6%); with infectious complications, i.e., bronchiectatic disease (15.9%), autoimmune syndromes (22.7%), polyclonal lymphoid infiltration (13.6%), enteropathic syndrome (34.1%), and malignant neoplasms (9.1%). Four phenotypes were identified in the patients with SIgAD: absence of SIgAD-related complications (28.6%); autoimmune syndrome (16.1%), non-malignant lymphoproliferation (3.6%) and enteropathy (28.6%). Higher incidence of non-infectious complications (autoimmune syndrome, non-malignant lymphoproliferation, enteropathies) was found in CVID compared to SIgAD patients ($\chi^2 = 10.27$; $p = 0.001$). Patients from the both groups showed changes in neutrophil reactivity compared to control values expressing higher basal generation of superoxide radicals ($p < 0.001$), NETosis activity ($p = 0.005$) and apoptosis ($p < 0.001$) with decreased phagocytic function ($p < 0.001$) and lower reserve for reactive oxygen species formation ($p < 0.001$). The maximal degree of changes in phagocytosis and superoxide-producing activity was observed in CVID; altered NETosis was revealed in SIgAD. The development of non-infectious complications was accompanied by a significant increase in stimulated NETosis indexes, thus suggesting a promising index in order to assess stability of clinical course and to predict development of complications in congenital defects of antibody production.

Keywords: selective IgA deficiency, common variable immunodeficiency, adult patients, clinical phenotypes, neutrophils, NETosis

Введение

Среди врожденных нарушений антителопродукции лидирующие позиции у взрослых пациентов занимают селективный дефицит IgA (SIgAD) и общий вариабельный иммунодефицит (ОВИД) [3, 7]. В основе развития этих заболеваний лежат дефекты созревания и/или функционирования компартмента В-клеток, что приводит к недостаточной продукции иммуноглобулинов.

Как SIgAD, так и ОВИД характеризуются значительным разнообразием клинических проявлений. Помимо частых и тяжелых, торпидных к терапии инфекций, возможно развитие аутоиммунной патологии, лимфопролиферации, энтеропатий, повышенной предрасположенности к злокачественным новообразованиям [4, 5, 8]. Различные клинические фенотипы определяют прогноз заболевания, а также различаются по степени нарушений в иммунной системе [6, 8].

В настоящее время установлено, что кроме дефектов гуморального звена иммунитета при

SIgAD и ОВИД обнаруживаются различные проявления иммунной дисрегуляции: изменение субпопуляционного состава лимфоцитов с повышением экспрессии маркеров ранней и поздней активации, дефекты цитокиновых сетей и различных компонентов врожденного иммунитета [1, 2].

Цель работы — оценка параметров функциональной активности нейтрофилов крови при SIgAD и ОВИД в зависимости от клинических проявлений заболевания.

Материалы и методы

В исследование включены 100 пациентов (41 мужчина и 59 женщин в возрасте $37,3 \pm 12,1$ года) с верифицированным в соответствии с критериями PAGID и ESID (2019) первичным гуморальным иммунодефицитом: 44 пациента с ОВИД и 56 человек с SIgAD.

Все пациенты с ОВИД находились на регулярной заместительной терапии препаратами имму-

ноглобулинов для внутривенного введения в дозе 0,4–0,5 г/кг массы тела. Пациенты с SIgAD получали симптоматическую терапию при возникновении инфекционных осложнений, а также при необходимости лечения коморбидной патологии.

Контрольную группу составили 100 сопоставимых по полу и возрасту практически здоровых лиц без клинико-лабораторных признаков иммунологической недостаточности.

Кроме общепринятого для изучаемых заболеваний клинико-лабораторного обследования вне эпизода инфекционно-воспалительного процесса проведена оценка функционального статуса нейтрофилов: продукция супероксид-анион-радикала, образование экстрацеллюлярных сетей (нетоз, NETs), поглотительная и апоптотическая активность. Материалом для исследования служила взвесь лейкоцитов, полученных из гепаринизированной крови (10 Ед/мл) с содержанием нейтрофилов 5×10^6 клеток/мл. В качестве индуктора использовали инактивированный нагреванием преопсонизированный музейный штамм *S. aureus* ATCC 25923.

Супероксид-продуцирующую активность нейтрофилов оценивали в реакции восстановления нитросинего тетразолия (НСТ-тест) в двух вариантах: спонтанный (НСТсп) и стимулированный (НСТст). Поглотительную способность определяли в реакции фагоцитоза *S. aureus* с подсчетом фагоцитарного индекса (ФИ) и фагоцитарного числа. Образование внеклеточных ловушек оценивали микроскопически по методу И.И. Долгушина и соавт. (2010) в нашей модификации [1] по количеству внеклеточно расположенных сетей после инкубации клеток при температуре 37 °C в течение 150 минут в спонтанном (NETсп) и индуцированном (NETст) вариантах. Апоптоз лейкоцитов оценивали по методике А. Gorman (1996) методом люминесцентной микроскопии после окрашивания акридиновым оранжевым и этидиумом бромидом; определяли долю апоптотических клеток в спонтанном (Асп) и стимулированном (Аст) вариантах теста, результат выражали в процентах.

Статистическая обработка проведена с помощью пакетов программ StatSoft Statistica 13.0 (Trial-версия) и GraphPad Prism версии 9. Для оценки нормальности распределения использован критерий Шапиро–Уилка. Результаты исследования представлялись в виде медианы (Me) и интерквартильного размаха ($Q_{0,25}$ – $Q_{0,75}$). Проверка достоверности различий непараметрически распределенных величин производилась с использованием критерия Манна–Уитни (U-критерий). Различия частот встречаемости признаков оценивались с помощью критерия χ^2 в таблицах со-

пряженности 2×2 . Критический уровень нулевой гипотезы принимался при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

С учетом имеющихся клинических проявлений пациенты с ОВИД разделены на 6 клинических подгрупп: без осложнений, связанных с ОВИД ($n = 6$; 13,6%); инфекционные осложнения в виде бронхоэктатической болезни ($n = 7$; 15,9%), аутоиммунный синдром (АИС – $n = 10$; 22,7%), поликлональная лимфоидная инфильтрация ($n = 6$; 13,6%), энтеропатический синдром ($n = 15$; 34,1%) и злокачественные новообразования ($n = 4$; 9,1%). В состав аутоиммунного синдрома включали аутоиммунную цитопению, ревматоидный артрит, аутоиммунный тиреоидит, алопецию. В группу «поликлональная лимфоидная пролиферация» вошли пациенты с увеличением периферических лимфатических узлов, лимфоидной гиперплазией кишечника, спленомегалией. Энтеропатический синдром включал гастродуоденит, синдром раздраженного кишечника, хронический энтероколит, илеит; злокачественные новообразования – аденокарцинома желудка, лимфома. При этом следует отметить, что частота эпизодов респираторных инфекционно-воспалительных заболеваний у всех обследованных пациентов с ОВИД составила 1–3 случая в год, т. е. не отличалась от популяционной нормы, так как все они получали регулярную заместительную терапию препаратами иммуноглобулинов.

У пациентов с SIgAD, напротив, редкие эпизоды инфекций наблюдались только у 11 человек (19,6%), тогда как в остальных случаях средняя частота инфекционно-воспалительных заболеваний колебалась от 4 до 8 случаев в год. По особенностям клинических проявлений и осложнений у пациентов с SIgAD удалось выделить 4 фенотипа: без осложнений, связанных с SIgAD ($n = 16$; 28,6%); аутоиммунный синдром ($n = 9$; 16,1%), включивший ревматоидный артрит, аутоиммунный тиреоидит, сахарный диабет 1-го типа; незлокачественная лимфопрлиферация (лимфоаденопатия, лимфоидная гиперплазия кишечника, спленомегалия; $n = 2$; 3,6%) и энтеропатия (гастродуоденит, хронический илеит, хронический колит, синдром раздраженного кишечника с диареей) – $n = 16$; 28,6%. Всего неинфекционные осложнения имели 48,3% пациентов SIgAD, что значительно ниже, чем при ОВИД (48,3% vs 79,5% соответственно; $\chi^2 = 10,27$; $p = 0,001$).

Результаты оценки функциональных свойств нейтрофилов у пациентов с SIgAD и ОВИД представлены в таблице 1.

Как следует из таблицы 1, в обеих группах пациентов наблюдались более высокие значения

ТАБЛИЦА 1. ПАРАМЕТРЫ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ НЕЙТРОФИЛОВ У ПАЦИЕНТОВ С SIgAD И ОВИД, Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)

TABLE 1. PARAMETERS OF NEUTROPHIL FUNCTIONAL ACTIVITY IN PATIENTS WITH SIgAD AND CVID, Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)

Показатель, единицы измерения, % Parameter, units of measurement, %	Контрольная группа Control group (n = 100)	Селективный дефицит IgA Patients with SIgAD (n = 56)	Общий вариабельный иммунодефицит Patients with CVID (n = 44)
НСТсп NBTsp	6,0 (4,0-9,0)	12,0 (7,0-18,0)*	24,0 (15,0-33,0)*/**
НСТст NBTst	56,0 (49,0-60,0)	49,0 (45,0-56,0)*	42,0 (37,0-49,0)*/**
ФИ FI	69,5 (66,0-73,0)	66,0 (61,0-72,0)*	55,0 (50,0-62,0)*/**
NETсп NETsp	5,0 (4,0-5,0)	9,0 (6,0-11,0)*	7,0 (5,0-9,0)*/**
NETст NETst	9,0 (9,0-10,0)	13,0 (9,0-16,0)*	10,0 (8,0-12,0)*/**
Асп Asp	10,0 (8,0-12,0)	20,0 (12,0-30,0)*	22,0 (16,0-30,0)*
Аст Ast	26,0 (25,0-29,0)	28,5 (26,0-34,0)*	31,5 (26,0-36,0)*

Примечание. * – различия значимы в сравнении с контрольной группой ($p < 0,05$; U-критерий Манна–Уитни); ** – различия значимы в сравнении с группой пациентов с SIgAD ($p < 0,05$; U-критерий Манна–Уитни).

Note. *, the differences are significant in comparison with the control group ($p < 0.05$; U Mann–Whitney test); **, the differences are significant in comparison with the group of patients with SIgAD ($p < 0.05$; U Mann–Whitney test).

базальной супероксид-продуцирующей активности нейтрофилов (НСТсп $p < 0,001$), параметров нетоза и апоптоза ($p < 0,001$), но снижение их поглотительной функции (ФИ $p < 0,001$) и потенциальной внутриклеточной бактерицидности (НСТст $p < 0,001$) по сравнению с контрольной группой. Вектор изменения этих показателей у пациентов с SIgAD и ОВИД не отличался, однако имелись определенные особенности. При ОВИД в большей мере по сравнению с SIgAD изменялись параметры внутриклеточной бактерицидности (НСТсп, НСТст и ФИ; $p < 0,001$ соответственно), но в меньшей степени показатели нетоза (NETсп $p = 0,03$; NETст $p = 0,005$).

Комплексный анализ параметров нейтрофилов в зависимости от клинических фенотипов проведен нами у 41 пациента с ОВИД (табл. 2).

Как видно из таблицы 2, максимальное количество отклонений изучаемых параметров наблюдалось у пациентов с АИС. Отмечались более высокие значения нетоза (NETсп $p = 0,02$; NETст $p < 0,001$) и более низкие показатели фагоцитоза ($p = 0,04$) в сравнении с группой без осложнений. У пациентов с клиническим фенотипом «энтеропатии» также наблюдались более высокие параметры нетоза, но только по тесту NETст ($p = 0,001$), и значимое повышение базальной продукции супероксидных радикалов относительно пациентов без осложнений ($p = 0,04$). В группе «лимфопролиферативный синдром» и

«злокачественные новообразования» были повышены значения NETст ($p < 0,001$). Высокая частота встречаемости АИС и энтеропатии у больных с максимальными значениями нетоза подтверждена результатами частотного анализа (41,6%, $\chi^2 = 6,04$; $p = 0,01$ и 49,2%, $\chi^2 = 4,0$; $p = 0,04$ соответственно).

У 41 пациента с SIgAD проанализированы параметры нейтрофилов при 3-х клинических фенотипах: без осложнений, связанных с SIgAD; АИС и энтеропатия (табл. 3).

У пациентов с фенотипом «АИС», как и с фенотипом «энтеропатии» выявлены более высокие значения показателей стимулированного нетоза (NETст $p = 0,01$ и $p = 0,04$ соответственно) относительно группы без осложнений. Однако следует отметить, что степень повышения этого показателя была максимальной именно у пациентов с АИС ($p = 0,02$ относительно значений при энтеропатии). Значимых изменений функциональной активности нейтрофилов по другим показателям в зависимости от преобладающего клинического фенотипа мы не обнаружили.

Наше исследование продемонстрировало, что у пациентов с врожденным дефицитом антителообразования имеется дисфункция нейтрофилов выраженной степени, проявления которой имеют особенности в зависимости от клинического фенотипа заболевания. Полученные результаты указывают на потенциальную возможность ис-

ТАБЛИЦА 2. ПАРАМЕТРЫ РЕАКТИВНОСТИ НЕЙТРОФИЛОВ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ КЛИНИЧЕСКОГО ФЕНОТИПА ОВИД, Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)

TABLE 2. NEUTROPHIL REACTIVITY PARAMETERS DEPENDING ON THE CLINICAL PHENOTYPE OF CVID, Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)

Показатель, единицы измерения, % Parameter, units of measurement, %	Клинический фенотип ОВИД / Clinical phenotype of CVID				
	Без осложнений No complications (n = 6)	АИС Autoimmunity (n = 10)	Энтеропатии Enteropathy (n = 15)	ЛПС Polyclonal lymphocytic infiltration (n = 6)	Новообразования Malignancy (n = 4)
НСТсп NBTsp	23,0 (15,0-36,0)	26,5 (17,5-33,0)	27,5 (22,0-39,5)*	23,5 (17,0-32,5)	23,0 (15,0-30,5)
НСТст NBTst	46,0 (37,0-53,0)	44,0 (38,5-47,5)	45,5 (38,5-51,5)	41,5 (35,0-50,0)	40,0 (33,0-49,0)
ФИ FI	56,0 (50,0-62,5)	51,0 (48,0-57,0)*	57,5 (52,0-67,0)	54,5 (50,0-61,0)	55,0 (49,0-63,0)
NETсп NETsp	7,0 (5,0-9,0)	8,0 (7,5-9,0)*	6,5 (5,0-10,0)	7,0 (6,0-9,0)	8,0 (7,0-10,0)
NETст NETst	9,0 (6,0-11,0)	11,0 (10,0-14,0)*	9,0 (8,0-12,5)*	10,0 (7,0-12,0)*	11,0 (9,0-13,0)*
Асп Asp	21,0 (16,0-31,0)	19,0 (16,0-29,0)	21,0 (14,0-31,0)	20,0 (17,0-32,0)	26,0 (19,0-31,0)
Аст Ast	31,0 (27,0-35,0)	30,0 (26,0-38,0)	29,0 (23,5-34,0)	32,0 (28,0-36,0)	29,5 (27,5-38,0)

Примечание. * – различия значимы в сравнении с группой пациентов «Без осложнений» ($p < 0,05$; U-критерий Манна–Уитни). Фенотип «инфекционные осложнения» в виде бронхоэктатической болезни не включен в связи с отсутствием указанных осложнений в группе обследуемых пациентов с SlgAD.

Note. *, the differences are significant in comparison with the group of patients "No complications" ($p < 0.05$; U Mann–Whitney test). The phenotype of infectious complications in the form of bronchiectatic disease was not included due to the absence of these complications in the group of studied patients with SlgAD.

ТАБЛИЦА 3. ПАРАМЕТРЫ РЕАКТИВНОСТИ НЕЙТРОФИЛОВ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ КЛИНИЧЕСКОГО ФЕНОТИПА SlgAD, Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)

TABLE 3. NEUTROPHIL REACTIVITY PARAMETERS DEPENDING ON THE CLINICAL PHENOTYPE OF SlgAD, Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)

Показатель, единицы измерения, % Parameter, units of measurement, %	Клинический фенотип SlgAD / Clinical phenotype of SlgAD		
	Без осложнений No complications (n = 16)	АИС Autoimmunity (n = 9)	Энтеропатии Enteropathy (n = 16)
НСТсп NBTsp	12,5 (6,0-17,5)	12,0 (9,5-26,0)	21,0 (11,0-25,0)
НСТст NBTst	44,5 (40,0-52,0)	44,5 (39,0-55,5)	50,0 (42,0-53,0)
ФИ FI	62,0 (58,0-66,0)	67,0 (62,0-71,0)	62,0 (47,0-70,0)
NETсп NETsp	8,0 (6,0-11,0)	8,0 (7,5-9,0)	9,0 (7,0-12,0)
NETст NETst	9,0 (8,0-13,0)	14,0 (8,0-19,0)*	11,0 (10,0-16,0)*
Асп Asp	24,0 (11,0-32,0)	25,0 (13,0-29,0)	22,0 (13,0-24,0)
Аст Ast	29,0 (27,0-38,0)	30,5 (26,0-34,0)	31,0 (26,0-33,0)

Примечание. * – различия значимы в сравнении с группой пациентов «Без осложнений» ($p < 0,05$; U-критерий Манна–Уитни).

Note. *, the differences are significant in comparison with the group of patients "No complications" ($p < 0.05$; U Mann–Whitney test).

пользования параметров нейтрофилов для лабораторного контроля стабильности течения патологического процесса, что может быть перспективно для мониторинга и прогноза развития осложнений при ОВИД и SIgAD.

Выводы

1. При общем вариабельном иммунодефиците, несмотря на регулярную заместительную терапию и отсутствие повышенной частоты инфекционно-воспалительных заболеваний чаще, чем при селективном дефиците IgA, формируются неинфекционные осложнения ($\chi^2 = 10,27$; $p = 0,001$) и спектр коморбидной патологии шире.

2. У пациентов с общим вариабельным иммунодефицитом и селективным дефицитом IgA обнаружены изменения реактивности нейтро-

филов в виде повышения базальной генерации супероксидных радикалов ($p < 0,001$), активности нетоза ($p = 0,005$) и апоптоза ($p < 0,001$) при снижении поглотительной функции ($p < 0,001$) и резерва образования активных форм кислорода ($p < 0,001$). Максимальная степень изменения поглотительной и супероксид-продуцирующей активности выявлена при общем вариабельном иммунодефиците (НСТсп, НСТст и ФИ, $p < 0,001$), а нетоза – при селективном дефиците IgA (NETсп $p = 0,03$; NETст $p = 0,005$).

3. У пациентов с общим вариабельным иммунодефицитом и селективным дефицитом IgA при наличии неинфекционных осложнений вне зависимости от их характера повышены параметры стимулированного нетоза (NETст), что делает этот показатель перспективным для оценки стабильности течения заболевания и прогноза развития осложнений.

Список литературы / References

1. Прокопович С.С., Новикова И.А. Параметры нетоза у пациентов с селективным дефицитом иммуноглобулина А // Журнал Гродненского государственного медицинского университета, 2022. Т. 20, № 4. С. 420-423. [Prokopovich S.S., Novikova I.A. NETosis parameters in patients with selective IgA deficiency. *Zhurnal Grodnenskogo gosudarstvennogo meditsinskogo universiteta = Journal of the Grodno State Medical University*, 2022, Vol. 20, no. 4, pp. 420-423. (In Russ.)]
2. Прокопович С.С., Новикова И.А. Состояние киллерного звена иммунитета у взрослых пациентов с общей вариабельной иммунологической недостаточностью // Российский иммунологический журнал, 2022. Т. 25, № 1. С. 93-98. [Prokopovich S.S., Novikova I.A. Killer cell cluster immunity state in adult patients with common variable immunodeficiency. *Rossiyskiy immunologicheskii zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2022, Vol. 25, no. 1, pp. 93-98. (In Russ.)] doi: 10.46235/1028-7221-1097-KCC.
3. Ameratunga R., Woon S.T. Perspective: evolving concepts in the diagnosis and understanding of Common Variable Immunodeficiency Disorders (CVID). *Clin. Rev. Allergy Immunol.*, 2020, Vol. 59, no. 1, pp. 109-121.
4. Fortier J.C., Haltigan E., Cavero-Chavez V., Gomez-Manjarres D., Squire J.D., Reeves W.H., Cuervo-Pardo L. Clinical and phenotypic characterization of common variable immunodeficiency diagnosed in younger and older adults. *J. Clin. Immunol.*, 2022, Vol. 42, no. 6, pp. 1270-1279.
5. Ho H.E., Cunningham-Rundles C. Non-infectious complications of common variable immunodeficiency: updated clinical spectrum, sequelae, and insights to pathogenesis. *Front. Immunol.*, 2020, Vol. 7, no. 11, 149. doi: 10.3389/fimmu.2020.00149.
6. Resnick E.S., Moshier E.L., Godbold J.H., Cunningham-Rundles C. Morbidity and mortality in common variable immune deficiency over 4 decades. *Blood*, 2012, Vol. 119, no. 7, pp. 1650-1657.
7. Wood P. Primary antibody deficiency syndromes. *Ann. Clin. Biochem.*, 2009, Vol. 46, no. 2, pp. 99-108.
8. Yazdani R., Latif A., Tabassomi F., Abolhassani H., Azizi G., Rezaei N., Aghamohammadi A. Clinical phenotype classification for selective immunoglobulin A deficiency. *Expert Rev. Clin. Immunol.*, 2015, Vol. 11, no. 11, pp. 1245-1254.

Авторы:

Новикова И.А. — д.м.н., профессор, заведующий кафедрой клинической лабораторной диагностики, аллергологии и иммунологии УО «Гомельский государственный медицинский университет», г. Гомель, Республика Беларусь

Прокопович С.С. — аспирант кафедры клинической лабораторной диагностики, аллергологии и иммунологии УО «Гомельский государственный медицинский университет», г. Гомель, Республика Беларусь

Authors:

Novikova I.A., PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Department of Clinical Laboratory Diagnostics, Allergology and Immunology, Gomel State Medical University, Gomel, Republic of Belarus

Prokopovich S.S., Postgraduate Student, Department of Clinical Laboratory Diagnostics, Allergology and Immunology, Gomel State Medical University, Gomel, Republic of Belarus

Поступила 30.12.2023
Принята к печати 09.03.2024

Received 30.12.2023
Accepted 09.03.2024

УВЕЛИЧЕНИЕ ПОПУЛЯЦИИ $\gamma\delta$ T-КЛЕТОК КРОВИ КАК РЕАКЦИЯ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ НА ПОРАЖЕНИЕ СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКИ ЖЕЛУДКА И КИШЕЧНИКА У ЛЮДЕЙ СТАРШИХ ВОЗРАСТНЫХ ГРУПП

Стенина М.А., Громова Т.В., Греченко В.В., Ганковская Л.В.

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

Резюме. $\gamma\delta$ T-клетки — это уникальные лимфоциты, занимающие промежуточное положение между клетками врожденного и адаптивного иммунитета. Еще на этапе дифференцировки в тимусе они приобретают статус эффекторов с цитотоксической активностью и становятся мощными продуцентами цитокинов. Образованному γ - и δ -цепями, распознающему антиген рецептору $\gamma\delta$ T-клеток отводят важную роль в активации этих клеток в тканях: он узнает инфицированные и опухолевые клетки по наличию в них молекул внутриклеточного стресса. $\gamma\delta$ T-клетки обнаруживают в крови и в слизистых оболочках. Сегодня внимание исследователей сосредоточено на двух субпопуляциях $\gamma\delta$ T-клеток: $\gamma\delta 1$ и $\gamma\delta 2$. Первая обильно представлена в слизистых оболочках, вторая образует основную массу (90%) циркулирующих $\gamma\delta$ T-клеток. Целью нашей работы стала оценка уровня циркулирующих $\gamma\delta$ T-клеток у пациентов старших возрастных групп при наличии у них патологического процесса в различных отделах слизистой оболочки пищеварительного тракта. Мы сформировали группы из числа пациентов Российского геронтологического научно-клинического центра в возрасте от 60 до 90 лет. В основную группу ($n = 28$) вошли пациенты с поражением слизистой оболочки желудка и двенадцатиперстной кишки в виде эрозивно-язвенных очагов. Сопоставимую по возрасту группу сравнения ($n = 33$) составили пациенты, не предъявляющие жалоб со стороны пищеварительного тракта, не имеющие показаний к гастродуоденоскопии. В отдельную группу ($n = 35$) вошли пациенты с различной степенью дисбиоза толстой кишки. Количество $\gamma\delta$ T-клеток в крови определяли методом двухцветной проточной цитофлюорометрии с использованием моноклональных антител. Циркулирующая популяция $\gamma\delta$ T-клеток реагировала на эрозивно-язвенные очаги в слизистой оболочке желудка и двенадцатиперстной кишки увеличением своей численности.

Адрес для переписки:

Громова Татьяна Вячеславовна
ФГАОУ ВО «Российский национальный
исследовательский медицинский университет имени
Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения РФ
117997, Россия, Москва, ул. Островитянова, 1.
Тел.: 8 (916) 562-14-83.
E-mail: tvlevashova@gmail.com

Address for correspondence:

Tatyana V. Gromova
N. Pirogov Russian National Medical University
1 Ostrovityanov St
Moscow
117997 Russian Federation
Phone: +7 (916) 562-14-83.
E-mail: tvlevashova@gmail.com

Образец цитирования:

М.А. Стенина, Т.В. Громова, В.В. Греченко,
Л.В. Ганковская «Увеличение популяции $\gamma\delta$ T-клеток
крови как реакция иммунной системы на поражение
слизистой оболочки желудка и кишечника у людей
старших возрастных групп» // Медицинская
иммунология, 2024. Т. 26, № 6. С. 1315-1321.
doi: 10.15789/1563-0625-EOT-2889

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

For citation:

M.A. Stenina, T.V. Gromova, V.V. Grechenko,
L.V. Gankovskaya "Expansion of the $\gamma\delta$ T cell population in
peripheral blood: a response of immune system to the damage
of gastrointestinal mucous membranes in older age groups",
Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya,
2024, Vol. 26, no. 6, pp. 1315-1321.
doi: 10.15789/1563-0625-EOT-2889

© Stenina M.A. et al., 2024
The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License
DOI: 10.15789/1563-0625-EOT-2889

ности. Пагубным последствием дисбиоза толстой кишки считают снижение барьерной функции кишечника. Среди пациентов с тяжелым дисбиозом третьей степени доля лиц с высоким содержанием $\gamma\delta$ T-клеток была достоверно выше, чем среди пациентов с первой (легкой) степенью дисбиоза. Т. е. у пациентов старшей возрастной группы циркулирующая популяция $\gamma\delta$ T-клеток откликается увеличением своей численности на повреждение (тяжесть повреждения) слизистой оболочки разных отделов пищеварительного тракта. Неспецифичный характер реакции очевиден, тем не менее экспансия этой популяции в крови сигнализирует о том или ином патологическом процессе, требующим дальнейшей углубленной диагностики.

Ключевые слова: $\gamma\delta$ T-клетки, проточная цитофлюориметрия, пациенты старших возрастных групп, язвенная болезнь желудка, дисбиоз кишечника, слизистая желудочно-кишечного тракта

EXPANSION OF THE $\gamma\delta$ T CELL POPULATION IN PERIPHERAL BLOOD: A RESPONSE OF IMMUNE SYSTEM TO THE DAMAGE OF GASTROINTESTINAL MUCOUS MEMBRANES IN OLDER AGE GROUPS

Stenina M.A., Gromova T.V., Grechenko V.V., Gankovskaya L.V.

N. Pirogov Russian National Medical University, Moscow, Russian Federation

Abstract. $\gamma\delta$ T cells are unique lymphocytes that take an intermediate position between the cells of innate and adaptive immunity. Even at the stage of differentiation in the thymus, they acquire the status of effectors with cytotoxic activity and become powerful cytokine producers. The antigen-recognizing receptor of $\gamma\delta$ T cells formed by γ and δ chains and is assigned an important role in activation of these cells in tissues: it recognizes infected and tumor cells by the presence of intracellular stress molecules. $\gamma\delta$ T cells are found in the blood and mucous membranes. Today, researchers' attention is focused on two subpopulations of $\gamma\delta$ T cells: $\gamma\delta$ 1 and $\gamma\delta$ 2. The first is abundantly represented in the mucous membranes, the second forms the bulk (90%) of circulating $\gamma\delta$ T cells. The aim of this study was to assess the level of circulating $\gamma\delta$ T cells in patients of older age groups with proven pathologies affecting mucous surfaces at various segments of the digestive tract. We have recruited older patients from the Russian Gerontological Research and Clinical Center aged 60 to 90 years. The main group ($n = 28$) included patients with lesions of the gastric mucosa and duodenum with erosive ulcerative foci. The age-matched comparison group ($n = 33$) consisted of patients without gastrointestinal manifestations and did not have indications for gastroduodenoscopy. A separate group ($n = 35$) included patients with varying degrees of colon dysbiosis. The number of $\gamma\delta$ T cells in the blood was determined by two-color flow cytometry using monoclonal antibodies. Presence of erosive and ulcerative foci in the mucous membranes of the stomach and duodenum was associated with increased numbers of circulating $\gamma\delta$ T cells population. An impaired function of intestinal barrier is considered a detrimental consequence of colon dysbiosis. Among patients with severe dysbiosis (3rd degree), the proportion of patients with a high content of $\gamma\delta$ T cells was significantly higher than among patients with the 1st (milder) degree of dysbiosis. Hence, the circulating population of $\gamma\delta$ T cells in the patients of the older age group responds by increased numbers to the damage (severity of damage) of the mucous membrane observed at different segments of digestive tract. The nonspecific nature of this response is obvious. Nevertheless, the expansion of this population in the circulating blood may be a sign of particular pathological process thus requiring further advanced diagnosis.

Keywords: $\gamma\delta$ T cells, flow cytometry, older patients, gastric ulcer, intestinal dysbiosis, gastrointestinal tract mucosa

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда №23-15-00137, <https://rscf.ru/project/23-15-00137/>.

Введение

$\gamma\delta$ T-клетки получили свое название в связи с особенностями строения распознающего антигены рецептора (TCR). У этих клеток он представлен γ - и δ -цепями гетеродимера, связанного с CD3 комплексом ($\gamma\delta$ -TCR). Это контрастирует с $\alpha\beta$ -TCR традиционных T-клеток. На сегодняшний день сформирована точка зрения на $\gamma\delta$ T-клетки как мощные, созревшие еще на этапе дифференцировки в тимусе эффекторы. В литературе часто отмечают уникальность этой популяции лимфоцитов, фенотипически во многом схожей с клетками врожденного иммунитета. В частности, $\gamma\delta$ T-клетки могут быть активированы сигнализацией как с $\gamma\delta$ -TCR, так и с лектиноподобных NK-рецепторов С-типа (NKG2D) и паттерн-распознающих рецепторов. Но сегодня, при обсуждении проблемы об активации $\gamma\delta$ T-клеток вне тимуса, акцентируют внимание преимущественно на $\gamma\delta$ -TCR.

Существует концепция, согласно которой $\gamma\delta$ T-клетки осуществляют иммунный надзор в тканях, распознавая с помощью своего TCR стрессированные клетки-мишени [9]. В медицине термин внутриклеточный стресс применяют к таким состояниям, как инфекция и опухолевой рост, и полагают, что в клетках накапливаются молекулы внутриклеточного стресса. В их число сегодня включают промежуточные (побочные) продукты синтеза изопrenoидов бактериями и опухолевыми клетками (фосфоантигены), метаболиты синтезируемого микробами витамина B2, гликолипиды опухоли и внутриклеточных патогенов и другие. Активированные таким образом $\gamma\delta$ T-клетки проявляют в тканях как цитотоксическую активность в отношении инфицированных и трансформированных клеток, так и эффекты, связанные с продуцируемыми ими цитокинами. Отсюда понятно, почему $\gamma\delta$ T-клетки представляют большой интерес как инструмент для адоптивной терапии опухолей и внутриклеточных инфекций.

$\gamma\delta$ T-клетки обнаруживают как в крови, так и в слизистых оболочках. При этом очевидно, что циркулирующая популяция этих клеток имеет преимущества как объект исследования при ре-

шении задач, связанных с иммунодиагностикой и иммунотерапией. Однако в контексте геронтологических проблем характеристика этой клеточной популяции в процессе старения явно не является полной.

Целью нашей работы стала оценка уровня $\gamma\delta$ T-клеток крови у пациентов старших возрастных групп при наличии у них патологического процесса в различных отделах слизистой оболочки пищеварительного тракта.

Материалы и методы

Объектом исследования служила периферическая кровь пациентов в возрасте от 60 до 90 лет, проходивших обследование и лечение в Российском геронтологическом научно-клиническом центре (РГНКЦ). От каждого пациента было получено информированное согласие на проведение лабораторных исследований, включая иммунологическое. 98 пациентов РГНКЦ вне фазы обострения хронических заболеваний мы распределили на две сопоставимые по возрасту группы. В первую (основную) группу вошли 28 пациентов, которым была показана гастродуоденоскопия. При эндоскопии у них обнаружили изменения слизистой оболочки желудка и начального отдела тонкой кишки, варьирующие от поверхностных эрозий до язвенно-некротических очагов. У 35 пациентов другой группы (группа сравнения), не предъявляющих жалоб со стороны пищеварительного тракта, показания к эндоскопии по мнению гастроэнтеролога отсутствовали.

В отдельную группу вошли 35 человек, у которых выявлен дисбиоз толстого кишечника. Оценку состояния микрофлоры кишечника проводили методом серийных разведений фекалий с последующим высевом на дифференциально-диагностические среды и определением степени дисбактериоза в соответствии с общепринятым критериями [1].

Полученные от пациентов образцы крови из локтевой вены обрабатывали моноклональными антителами: анти-TCR- $\gamma\delta$, конъюгированными с фикоэритрином и анти-CD3, конъюгированные с фикоэритрин цианином-5 (Beckman Coulter, США). Лизис эритроцитов осуществляли с помощью лизирующего раствора (215 ч 0,8%-ного р-ра NH_4Cl + 1 ч 0,037%-ного р-ра EDTA-Na_4). На последнем этапе клетки фиксировали добав-

лением к отмытому осадку 100 мкл 1%-ного раствора формальдегида.

Анализ флуоресценции обработанных антителами лейкоцитов проводили на лазерном цитофлюориметре FACScan (фирма Becton Dickinson, США). В Dot Plot по показателям FSC (малое угловое светорассеяние) и SSC (боковое светорассеяние) и одновременно по наличию CD45⁺ клеток (свечение по FL1) и CD14⁺ клеток (свечение по FL2) выделяли гейт лимфоцитов. Анализ субпопуляций проводили на основе следующих параметров: FSC, SSC, а также наличие флуоресценции в координатах FL1 (зеленое свечение), FL2 (оранжево-красное свечение) и FL3 (красное свечение).

Статистическую обработку полученных результатов проводили с помощью программ Microsoft Excel 2016 и STATISTICA 10.0. При первоначальном анализе данных мы установили, что в исследованных группах распределение пациентов по уровню $\gamma\delta$ T-клеток отличается от нормального. Поэтому сравнение групп мы проводили, используя непараметрические критерии статистики.

Результаты и обсуждение

Диаграмма, представленная на рисунке 1, позволяет сравнить содержание в крови $\gamma\delta$ T-клеток в двух одинаковых по возрастному составу группах обследованных. Пациенты основной группы отличались от пациентов группы сравнения эрозивно-язвенными дефектами слизистой оболочки желудка и начального отдела тонкой кишки. Эти дефекты обнаруживали при проведении гастродуоденоскопии. Пациенты группы сравнения, не предъявляющие жалоб со стороны пищеварительного тракта, не имели показаний для эндоскопии. Согласно критерию Манна–Уитни количество $\gamma\delta$ T-клеток в мкл крови у пожилых людей из основной группы достоверно выше, чем у пациентов из группы сравнения.

Наши данные об экспансии циркулирующей популяции $\gamma\delta$ T-клеток у пациентов старшей возрастной группы с эрозивно-язвенным поражением слизистой оболочки желудка и двенадцатиперстной кишки хорошо согласуются с исследованиями, в которых продемонстрировали, что эта популяция $\gamma\delta$ T-клеток может реагировать отчетливым увеличением своей численности

на бактериальные [2, 3, 5, 6, 7] и паразитарные инфекции [10].

На следующем этапе нашей работы мы сопоставили уровни $\gamma\delta$ T-клеток крови с состоянием эпителиального барьера слизистой оболочки толстой кишки. Это состояние оценивали по степени дисбиоза. Дисбиозом называют изменение структуры громадного сообщества условно-патогенных и симбиотических микроорганизмов, населяющих эпителии слизистых оболочек. В геронтологии дисбиоз включен в список клеточных и молекулярных признаков/механизмов старения [8] наряду с нестабильностью генома, истощением теломер, эпигенетическими изменениями, нарушениям белкового гомеостаза (протеостаза), дефектом макроаутофагии, нарушением регуляции восприятия питательных веществ, митохондриальной дисфункцией, клеточным старением, истощением стволовых клеток, изменением межклеточной коммуникации, хроническим воспалением. Пагубным последствием дисбиоза, лучше всего продемонстрированным на примере толстой кишки, является нарушение эпителиального барьера слизистой оболочки [4].

Из 35 пациентов в возрасте 60 лет и старше мы сформировали три группы. Пациенты в этих группах различались по степени диагностированного у них дисбиоза: первая (легкая), вторая и третья (тяжелая). Возвращаясь к диаграмме, представленной на рисунке 1, мы обратили внимание на асимметрию распределения показателя количества циркулирующих $\gamma\delta$ T-клеток, особенно выраженную в основной группе. В этой группе присутствовали пациенты с очень высоким содержанием $\gamma\delta$ T-клеток. Поэтому, анализируя данные, касающиеся дисбиоза, мы определили долю лиц, у которых количество циркулирующих $\gamma\delta$ T-клеток превышало норму, а именно 70 клеток в мкл крови (рис. 2). Согласно точному критерию Фишера частота встречаемости пациентов с повышенным содержанием в крови $\gamma\delta$ T-клеток среди пациентов с третьей (тяжелой) степенью дисбиоза (89%) была достоверно выше, чем среди пациентов с первой (легкой) степенью (33%). Т. е. при локализации патологического процесса в слизистой оболочке толстой кишки популяция циркулирующих $\gamma\delta$ T-клеток реагирует на степень повреждения эпителиального барьера слизистой оболочки увеличением

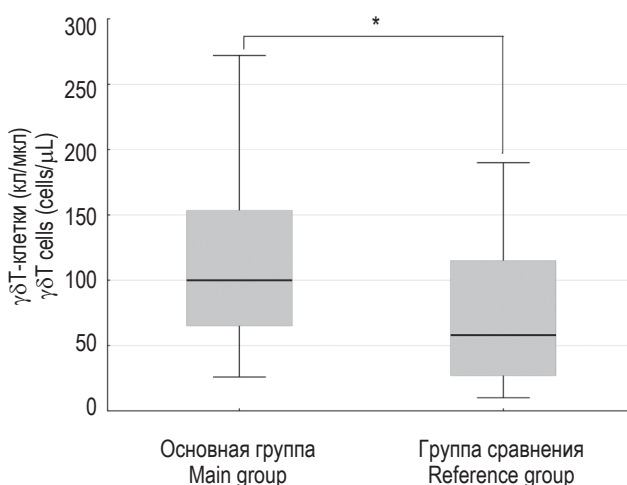


Рисунок 1. Содержание $\gamma\delta T$ -клеток в мкл крови пациентов старше 60 лет с эрозивно-язвенными дефектами слизистой оболочки желудка и начального отдела тонкой кишки (основная группа) и пациентов группы сравнения, не имеющих показаний к гастродуоденоскопии

Примечание. На диаграмме приведены медианные значения уровней циркулирующих $\gamma\delta T$ -клеток, максимальные и минимальные значения этого показателя, 25% и 75% процентиля. * – различия между группами статистически значимы, $p \leq 0,04$.

Figure 1. Content of $\gamma\delta T$ cells in one microliter of blood of patients older than 60 years with erosive and ulcerative defects of the gastric mucosa and the initial part of the small intestine (main group) and patients of the comparison group with no indications for gastroduodenoscopy

Note. The diagram shows the median values of circulating $\gamma\delta T$ cell levels, the maximum and minimum values of this indicator, 25% and 75% percentiles. *, differences between groups are statistically significant, $p \leq 0.04$.

своей численности. Эти данные перекликаются с данными, полученными при сальмонеллезе. Было показано, что экспансия популяции $\gamma\delta T$ -клеток зависела от распространенности патологического процесса и была выражена значительно в большей степени при генерализованном процессе с поражением почек, надпочечников, миокарда, чем при ограниченной кишечником форме инфекции [5].

Заключение

Популяцию $\gamma\delta T$ -клеток разделяют на суб-популяции. Одна из них ($\gamma\delta 1$) обильно пред-

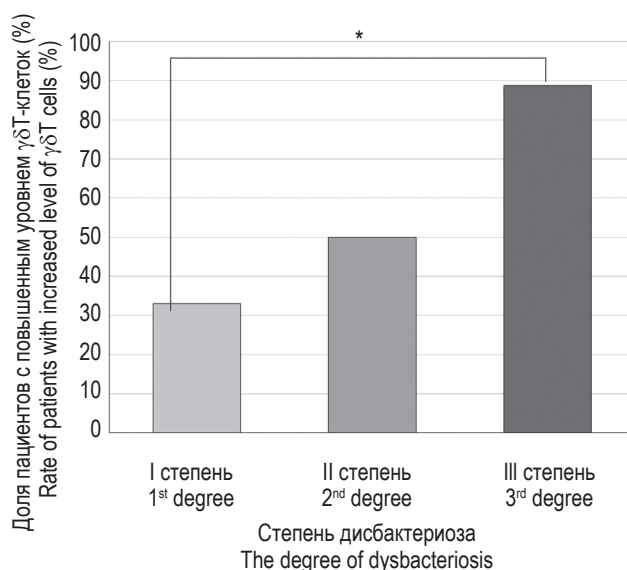


Рисунок 2. Доли лиц, у которых содержание циркулирующих $\gamma\delta T$ -клеток повышено (более 70 клеток/мкл) среди пациентов с дисбиозом толстой кишки первой, второй, третьей степени

Примечание. * – различия между группами статистически значимы, $p \leq 0,02$.

Figure 2. Proportion of individuals with an increased content of circulating $\gamma\delta T$ cells (more than 70 cells/mL) among patients with first, second, and third degree colon dysbiosis

Note. *, differences between groups are statistically significant, $p \leq 0.02$.

ставлена в слизистых оболочках. Другую ($\gamma\delta 2$) уже исследуют как возможный инструмент для адоптивной терапии опухолей. По некоторым данным она составляет 95% циркулирующих $\gamma\delta T$ -клеток [9]. Однако, несмотря на более чем 30-летнюю историю изучения $\gamma\delta T$ -клеток, вопрос о путях их миграции из крови освящен недостаточно. Основным итогом нашей работы можно считать утверждение, что циркулирующая популяция $\gamma\delta T$ -клеток у пациентов старшей возрастной группы откликается увеличением своей численности на повреждение слизистой оболочки разных отделов пищеварительного тракта. Неспецифичный характер реакции очевиден, тем не менее экспансия этой популяции в крови сигнализирует о наличии того или иного патологического процесса, требующего дальнейшей углубленной диагностики и диспансерного наблюдения за пациентами с высоким уровнем в крови $\gamma\delta T$ -клеток.

Список литературы / References

1. Алёшкин В.А., Селькова Е.П., Затевалов А.М., Миронов А.Ю., Волчецкий А.Л., Гудова Н.В. Определение дисбиотических изменений желудочно-кишечного тракта по маркерам содержимого кишечника. Федеральные клинические рекомендации. Н. Новгород: Ремедиум Приволжье, 2016. 40 с. [Aleshkin V.A., Selkova E.P., Zatevalov A.M., Mironov A.Yu., Volchetsky A.L., Gudkova N.V. Determination of dysbiotic changes in the gastrointestinal tract by markers of intestinal contents. Federal clinical guidelines]. N. Novgorod: Remedium Privolzhye, 2016. 40 p.
2. Bertotto A., Gerli R., Spinozzi F., Muscat C., Scalise F., Castellucci G., Sposito M., Candio F., Vaccaro R. Lymphocytes bearing the gamma delta T cell receptor in acute Brucella melitensis infection. *Eur. J. Immunol.*, 1993, Vol. 23, no. 5, pp. 1173-1180.
3. Caldwell C.W., Everett E.D., McDonald G., Jesus Y.W., Roland W.E. Lymphocytosis of gamma/delta T cells in human ehrlichiosis. *Am. J. Clin. Pathol.*, 1995, Vol. 10, no. 6, pp. 761-76.
4. DeJong E.N., Surette M.G., D.M.E Bowdish. The gut microbiota and unhealthy aging: disentangling cause from consequence. *Cell Host Microbe*, 2020, Vol. 28, no. 2, pp. 180-189.
5. Hara T., Mizuno Y., Takaki K., Takada H., Akeda H., Aoki T., Nagata M., Ueda K., Matsuzaki G., Yoshikai Y. Predominant activation and expansion of V gamma 9-bearing gamma delta T cells in vivo as well as in vitro in Salmonella infection. *J. Clin. Invest.*, 1992, Vol. 90, no. 1, pp. 204-210.
6. Ito M., Kojiro N., Ikeda T., Ito T., Funada J., Kokubu T. Increased proportions of peripheral blood gamma delta T cells in patients with pulmonary tuberculosis. *Chest*, 1992, Vol. 102, no. 1, pp. 195-197.
7. Jouen-Beades F., Paris E., Dieulois C., Lemeland J.F., Barre-Dezelus V., Marret S., Humbert G., Leroy J., Tron F. In vivo and in vitro activation and expansion of gamma delta T cells during Listeria monocytogenes infection in humans. *Infect. Immun*, 1997, Vol. 65, no. 10, pp. 4267-4272.
8. López-Otín C., Blasco M.A., Partridge L., Serrano M., Kroemer G. Hallmarks of aging: An expanding universe. *Cell*, 2023, Vol. 186, no. 2, pp. 243-278.
9. Saura-Esteller J., de Jong M., King L.A., Ensing E., Winograd B., de Gruijl T.D., Parren P.W.H.I., van der Vliet H.J. Gamma Delta T-Cell Based Cancer Immunotherapy: Past-Present-Future. *Front. Immunol.*, 2022, Vol. 13, 915837. doi: 10.3389/fimmu.2022.915837.
10. Scalise F., Gerli R., Castellucci G., Spinozzi F., Fabietti G.M., Crupi S., Sensi L., Britta R., Vaccaro R., Bertotto A. Lymphocytes bearing the gamma delta T-cell receptor in acute toxoplasmosis. *Immunology*, 1992, Vol. 76, no. 4, pp. 668-670.

Авторы:

Стенина М.А. — д.м.н., профессор кафедры иммунологии медико-биологического факультета ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Громова Т.В. — к.б.н., доцент кафедры иммунологии медико-биологического факультета ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Authors:

Stenina M.A., PhD, MD (Medicine), Professor, Department of Immunology, Faculty of Medicine and Biology, N. Pirogov Russian National Medical University, Moscow, Russian Federation

Gromova T.V., PhD (Biology), Associate Professor, Department of Immunology, Faculty of Medicine and Biology, N. Pirogov Russian National Medical University, Moscow, Russian Federation

Греченко В.В. — к.м.н., доцент кафедры иммунологии
медико-биологического факультета ФГАОУ ВО
«Российский национальный исследовательский
медицинский университет имени Н.И. Пирогова»
Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

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

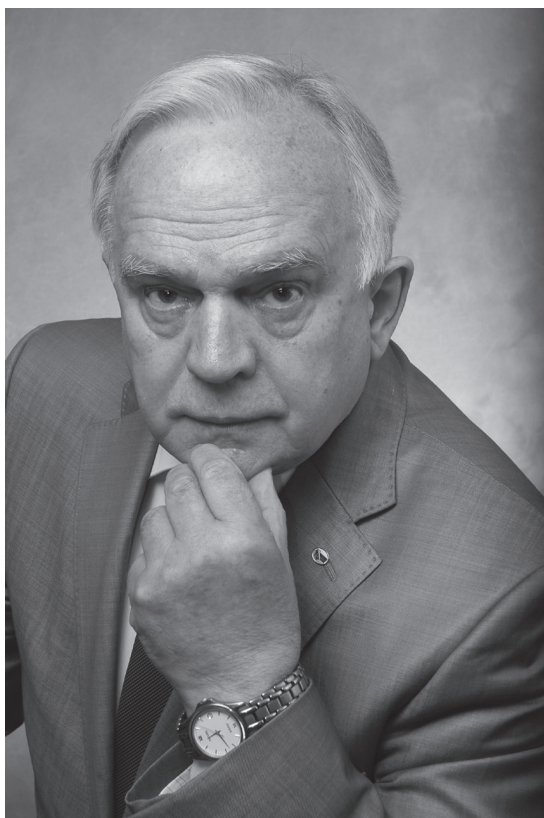
Grechenko V.V., PhD (Medicine), Associate Professor,
Department of Immunology, Faculty of Medicine and Biology,
N. Pirogov Russian National Medical University, Moscow,
Russian Federation

Gankovskaya L.V., PhD, MD (Medicine), Professor,
Department of Immunology, Faculty of Medicine and Biology,
N. Pirogov Russian National Medical University, Moscow,
Russian Federation

Поступила 07.07.2023
Принята к печати 05.10.2023

Received 07.07.2023
Accepted 05.10.2023

К 80-ЛЕТИЮ СО ДНЯ РОЖДЕНИЯ ВАЛЕРИЯ АЛЕКСАНДРОВИЧА ЧЕРЕШНЕВА



24 октября 2024 года исполняется 80 лет академику Валерию Александровичу Черешневу — выдающемуся российскому ученому в области фундаментальной и прикладной иммунологии. Основные направления научной деятельности Валерия Александровича говорят о широте взглядов и многогранности его фигуры: экология и иммунитет, иммунофизиология, иммунные механизмы воспаления, стресса, сердечно-сосудистой патологии, опухолей, глазных болезней, СПИД. Своими работами он внес существенный вклад в изучение комбинированных радиационных поражений. Большое значение Валерий Александрович уделяет и практическому применению полученных значимых результатов фундаментальных исследований. Так, В.А. Черешнев с соавторами установил основные закономерности отклонений функционирования иммунной системы, возникающих под влиянием различных экологически неблагоприятных факторов, что позволило разработать методы устранения этих нарушений. Вместе с коллективом исследователей он обосновал принципиально новую концепцию системного воспаления, охарактеризовав его как типовой патологический процесс; концепцию аутоиммунной регуляции гомеостаза; общебиологическую концепцию развития заболеваний, связав этот процесс с нарушением экологических взаимоотношений между макроорганизмом (человек) и микроорганизмами (бактерии, вирусы). На основе фундамен-

тальных исследований В.А. Черешнева, его учеников и коллег в медицинскую практику внедрен ряд инновационных технологий, в частности организовано производство эффективного иммуномодулятора «Профеталь». Препарат применяется для лечения аутоиммунных заболеваний, а также в биотерапии онкологических и инфекционных заболеваний.

Валерием Александровичем создана известная в России научная школа, к которой принадлежат не только сотрудники его институтов и кафедр, но и широкий круг исследователей в различных областях биологии и медицины. Создана научная школа, получавшая в течение ряда лет (2005–2015) в результате конкурсного отбора государственную поддержку исследований в рамках грантов Президента РФ.

Черешнев В.А. известен в нашей стране не только как выдающийся ученый, но и как человек, обладающий незаурядными организаторскими способностями. Он организовал и является заведующим кафедрами микробиологии и иммунологии Пермского государственного университета — ныне Пермского государственного национального исследовательского университета (с 1994), иммунохимии Уральского государственного технического университета — ныне Уральского федерального университета им. первого Президента России Б.Н. Ельцина (с 2000), иммунологии Пермской государственной медицинской академии им. акад. Е.А. Вагнера — ныне Пермского государственного медицинского университета им. акад. Е.А. Вагнера (с 2008), принимал участие в создании и был профессором кафедры иммунологии на биологическом факультете МГУ им. М.В. Ломоносова (2010–2020).

Черешнев В.А. создал и возглавил вначале Екатеринбургский филиал Института экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, на базе которого в дальнейшем был создан Институт иммунологии и физиологии (ИИФ) УрО РАН, которым он руководил с 2003 г. по 2018 г., а сегодня Валерий Александрович — научный руководитель ИИФ УрО РАН.

Под его руководством издаются ведущие журналы страны в области медицины и иммунологии, В.А. Черешнев — главный редактор «Российского иммунологического журнала», «Вестника Уральской медицинской академической науки», вестника УрО РАН «Наука. Общество. Человек», «Имму-

нология Урала», он также является членом редколлегий и редакционных советов ряда центральных журналов.

Свои силы и опыт Валерий Александрович вкладывает и в развитие отечественной науки, являясь заместителем президента РАН. Большое внимание уделял развитию и продвижению отечественной иммунологии, 22 года он работал на посту президента Российского научного общества иммунологов, а в текущем году избран почетным президентом общества.

Валерий Александрович — инициатор, организатор и участник многих международных и российских научных форумов, съездов, конгрессов мирового уровня по различным вопросам биологии и медицины. Ученые нашей страны знают его как блестящего лектора с запоминающейся харизмой и ораторским обаянием.

Валерий Александрович воспитал целую плеяду высококлассных специалистов, ставших известными учеными, среди которых доктора наук, профессора, члены-корреспонденты. Под его руководством подготовлено и защищено 35 кандидатских и 53 докторских диссертаций. Он автор и соавтор более 900 научных трудов, в том числе 74 книг и монографий, 2 атласов, 45 учебных изданий, 44 запатентованных изобретений, 2 открытий, 169 общественных публикаций.

О признании таланта Валерия Александровича как ученого и наставника свидетельствует избрание его членом ряда международных академий, в том числе Международной академии наук экологии и безопасности жизнедеятельности (1994), Европейской академии наук, (2002), Всемирной академии наук (2005), Washington Academy of Sciences (2005), The World Academy of Art and Science (2005) и др. В.А. Черешневу присуждено почетное звание «Почетный доктор» ряда передовых российских научных институтов и университетов: Института экспериментальной медицины РАМН (Санкт-Петербург, 2010), Российской Военно-медицинской академии (Санкт-Петербург, 2013), Санкт-Петербургского гуманитарного университета профсоюзов (2014), Санкт-Петербургского национального исследовательского Академического университета РАН (2016), Санкт-Петербургского государственного университета (2019), Северного (Арктического) федерального университета им. М.В. Ломоносова (Архангельск, 2019); он почетный профессор Московского государственного медико-стоматологического университета им. А.И. Евдокимова «HONORIS CAUSA» (ныне Российский университет медицины Минздрава России) (2016), Уральского государственного экономического университета (2017).

За достижения в научной, научно-организационной и общественной деятельности В.А. Черешнев отмечен орденами «Дружбы», «За заслуги перед Отечеством» IV, III и II степени, «Александра Невского», а также тремя премиями Правительства Российской Федерации.

Все иммунологическое сообщество ценит Валерия Александровича за его человечность, мудрость, доброжелательность и внимательность в отношениях с людьми, неиссякаемую энергию и оптимизм. Желаем Вам, дорогой Валерий Александрович, здорового долголетия, новых научных достижений и много новых талантливых учеников!

АВТОРСКИЙ УКАЗАТЕЛЬ

Абакушина Е.В.	1163	Гришина Л.В.	1279	Пашкина Е.А.	1279	Упатова А.Г.	1249
Абрамова З.И.	1213	Громова Т.В.	1315	Поддубняк А.О.	1223	Фролов К.Б.	1291
Абрамова Т.Я.	1279	Даминова А.Г.	1213	Поленок Е.Г.	1269	Хуторная М.В.	1223
Абрамов С.Н.	1213	Евтушенко А.В.	1223	Понасенко А.В.	1223	Чумасова О.А.	1279
Антонов А.В.	1269	Евтюгин В.Г.	1213	Потапова М.Б.	1249	Шабалдин А.В.	1183
Арсентьева Н.А.	1235	Журиков Р.В.	1197	Прокопович С.С.	1309	Шабалдин Н.А.	1183
Асанов М.А.	1223	Ибрагимов Б.Р.	1213	Рассказова Н.Д.	1249	Эсауленко Е.В.	1235
Базальный В.В.	1205	Иванов А.В.	1291	Расулова М.А.	1257	Яцков И.А.	1139
Байрамов П.В.	1269	Ильина Н.А.	1279	Расулова Х.А.	1257	Bespalova O.N.	1301
Басина В.В.	1235	Казачек Я.В.	1223	Решетникова И.Д.	1213	Davydova A.A.	1301
Бацунов О.К.	1235	Коваленко Л.П.	1197	Свитич О.А.	1249	Grebenkina P.V.	1301
Белоглазов В.А.	1139	Ковтун О.П.	1205	Семенова Е.В.	1291	Kovaleva A.A.	1301
Белокопытова Е.А.	1249	Козлов В.А.	1279	Семенова И.Б.	1249	Mikhailova V.A.	1301
Блинова Е.А.	1279	Колпинский Г.И.	1269	Сизиков А.Э.	1279	Mohammad Reza Ataollahi ..	1177
Богданов Л.А.	1183	Копенкин М.А.	1205	Синицкая А.В.	1183, 1223	Mohammad Reza Atashzar ..	1177
Вальдман Е.А.	1197	Корякина О.В.	1205	Синицкий М.Ю.	1223	Monireh Askarzadeh.	1177
Вержбицкая Н.Е.	1269	Любимова Н.Е.	1235	Скибо Ю.В.	1213	Selkov S.A.	1301
Воробьева И.Г.	1163	Меремьянина Е.А.	1249	Солодкова А.А.	1249	Sokolov D.I.	1301
Ганковская Л.В.	1315	Мун С.А.	1269	Стенина М.А.	1315	Tyshchuk E.V.	1301
Глушков А.Н.	1269	Мурзина А.А.	1249	Стойнова А.М.	1149	Zahra Shokrolahi.	1177
Гогина С.С.	1149	Никитин С.В.	1197	Тоголян Арег А.	1235	Zementova M.S.	1301
Гордеева Л.А.	1269	Новикова И.А.	1309	Уварова М.А.	1291		
Греченко В.В.	1315	Олисова О.Ю.	1249	Ульянова Д.И.	1139		

ПРЕДМЕТНЫЙ УКАЗАТЕЛЬ

5-гидроксипримидины	1198	иммунопатогенез.....	1236	рецептор эстрадиола	1270
автономные эффекты		ингибирование контрольных точек..	1163	сахарный диабет 1-го типа	1140
апоптоза	1280	интерлейкины	1206	селективный дефицит	
аллергия	1198	инфекционный эндокардит.....	1224	иммуноглобулина А	1309
анафилаксия	1198	ишемический инсульт.....	1257	сигнальный путь.....	1184
анти-SARS-CoV-2 антитела.....	1292	кишечная проницаемость.....	1140	слизистая желудочно-кишечного	
антиидиотипические антитела		«клеточное соседство».....	1280	тракта	1316
к прогестерону.....	1270	клинические фенотипы	1309	сосудистое воспаление.....	1140
антиидиотипические антитела		коронавирус SARS-CoV-2.....	1292	сыворотка крови.....	1257
к эстрадиолу	1270	липополисахарид	1140	трофобласт.....	1302
антитела	1150	липосомы.....	1150	факторы роста	1236
«апоптотизирующие» клетки	1280	локальная продукция кортизола	1280	фиброз	1140
асептический некроз.....	1184	маркер.....	1250	фиброз печени.....	1236
атопическая бронхиальная астма ...	1214	молекулы основного комплекса	1150	хемокины.....	1236
атопические заболевания.....	1250	молекулярные предикторы	1184	химиотерапия	1206
атопический дерматит.....	1250	моноциты	1214	хронический вирусный гепатит С ..	1236
аутофагия	1214	мультиспецифические антитела	1163	целевая миграция	1163
белки-носители	1150	наноантитела	1163	цитокины.....	1150, 1198, 1224, 1236
белки комплемента	1150	наночастицы.....	1150	цитотоксические рецепторы.....	1302
белок-усилитель NK-клеток.....	1163	нативные клапаны сердца.....	1224	эндотелиальная дисфункция	1140
биомаркер.....	1177	не автономные эффекты апоптоза...	1280	язвенная болезнь желудка.....	1316
вакцина «Спутник V»	1292	нейроиммунология	1257	C17orf99	1177
вакцинация	1292	нейротоксичность	1206	COVID-19	1257, 1292
взрослые пациенты	1309	нейротропные аутоантитела	1257	γδT-клетки	1316
вирус гепатита С	1236	нейтрофилы.....	1309	IL-40.....	1177
вирусоподобные частицы	1150	нетоз.....	1309	JEG-3	1302
воспаление.....	1224	общий вариабельный	1309	Ki-67.....	1270
врожденный иммунитет	1250	иммунодефицит	1309	LC3.....	1214
генная экспрессия	1224	орфанные цитокины	1177	LC3-ассоциированный фагоцитоз...	1214
гранулоцитарный		острый лейкоз	1206	NK-92.....	1302
колониестимулирующий фактор....	1302	патогенная бактериемия	1224	NK-клетки	1163, 1302
гуморальный иммунитет.....	1292	пациенты старших		Rubicon	1214
дезлоратадин	1198	возрастных групп	1316	SNP	1250
дети	1206	полиневропатия	1206	T-лимфоциты	1280
динамика заболевания	1257	полиэтиленгликоль	1150	TLR	1250
дисбиоз кишечника.....	1316	«пролиферирующие» клетки	1280	Toll-подобные рецепторы	1150
иммунная активность	1150	проточная цитофлюориметрия.....	1316		
иммуноблоттинг	1184	рак молочной железы	1270		
иммуноглобулин Е	1198	ревматоидный артрит.....	1280		
иммуноглобулины		рецептор прогестерона.....	1270		
для внутривенного введения	1302				

ИЛЛЮСТРАЦИИ К СТАТЬЕ «ВЛИЯНИЕ ВОСПАЛЕНИЯ НА ТЕЧЕНИЕ АСЕПТИЧЕСКОГО НЕКРОЗА ГОЛОВКИ БЕДРЕННОЙ КОСТИ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ» (АВТОРЫ: ШАБАЛДИН Н.А., СИНИЦКАЯ А.В., БОГДАНОВ Л.А., ШАБАЛДИН А.В. [с. 1183-1196])

ILLUSTRATIONS FOR THE ARTICLE "THE EFFECT OF INFLAMMATION ON THE COURSE OF EXPERIMENTAL ASEPTIC NECROSIS OF FEMORAL HEAD" (AUTHORS: SHABALDIN N.A., SINITSKAYA A.V., BOGDANOV L.A., SHABALDIN A.V. [pp. 1183-1196])

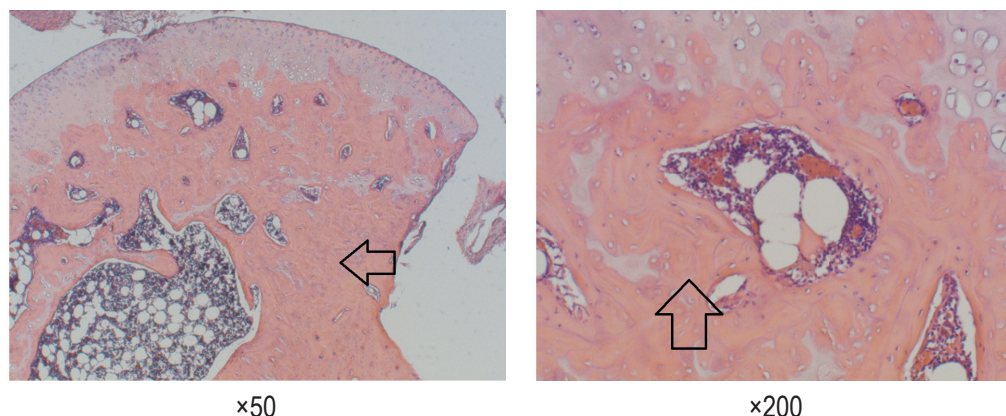


Рисунок 1. Гистологическое исследование 2 недель

Примечание. Окраска гематоксилин-эозин (x50; x200). Начальные признаки волнообразного расположения костных трабекул (указаны стрелочкой).

Figure 1. Histological examination for 2 weeks

Note. Hematoxylin-eosin staining (x50; x200). The initial signs of a wave-like arrangement of bone trabeculae (indicated by an arrow).

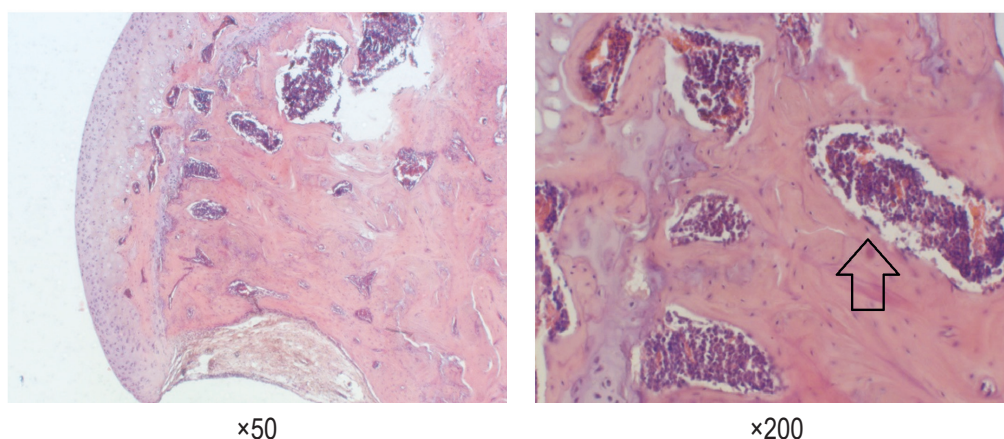


Рисунок 2. Гистологическое исследование 6 недель

Примечание. Окраска гематоксилин-эозин (x50; x200). Активные остеокласты, лакуны костной резорбции (указаны стрелочкой)

Figure 2. Histological examination of 6 weeks

Note. Hematoxylin-eosin staining (x50; x200). Active osteoclasts, lacunae of bone resorption (indicated by an arrow)

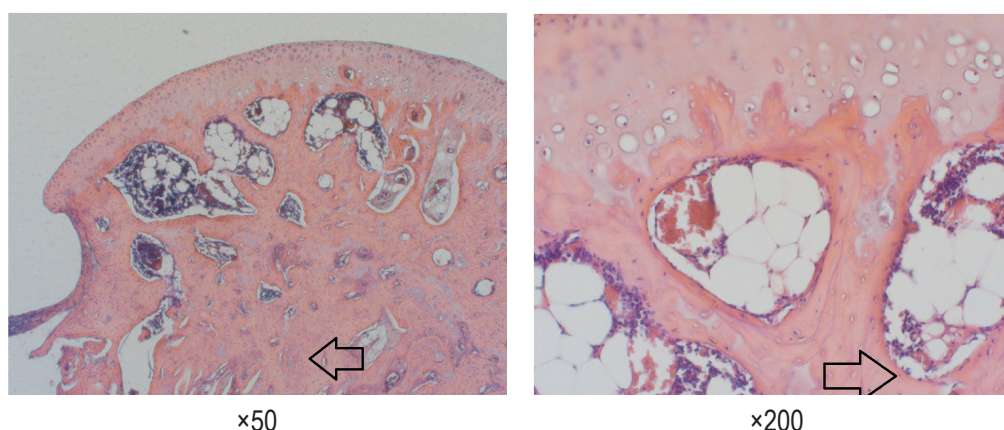


Рисунок 3. Гистологическое исследование 8 недель

Примечание. Окраска гематоксилин-эозин (x50; x200). Активные остеобласты, замещение фиброзной тканью (указаны стрелочками).

Figure 3. Histological examination of 8 weeks

Note. Hematoxylin-eosin staining (x50; x200). Active osteoblasts, replacement with fibrous tissue (indicated by arrows).

ПОДПИСНОЙ ИНДЕКС:
УРАЛ-ПРЕСС – 42311

