

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

Том 27, № 1. С. 1-236

2025

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
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 31 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

январь-февраль

2025, том 27

№ 1

Основан в марте 1999 года

Главный редактор

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

Исполняющий обязанности главного редактора

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

Редакционная коллегия

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

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

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

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

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

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

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

Ответственный секретарь:

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

Редактор перевода:

д.м.н. Чухловин А.Б.

Редактор электронной версии:

Ерофеева В.С.

Редакция: тел./факс (812) 233-08-58

Адрес для корреспонденции:

197101, Санкт-Петербург, а/я 130.

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

© Медицинская иммунология

Журнал зарегистрирован Северо-Западным региональным управлением Государственного комитета РФ по печати 26 марта 1999 г.

Свидетельство о регистрации № П 3612.

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

Свидетельство о регистрации ПИ № 77-15892.

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

Свидетельство о регистрации средства массовой информации ПИ №ФЦ77-60436 30 декабря 2014 г.

Данный материал распространяется по лицензии Creative Commons Attribution 4.0 License.

Издательство «Человек»

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

E-mail: mail@mirmed.ru

Тел./факс: (812) 325-25-64.

Подписано в печать 09.12.2024 г. Формат 60 x 90 1/8. Печать офсетная.

Усл. печ. л. 29,5. Тираж 2000 экз. (1-й завод – 1000 экз.) Заказ № 073

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

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

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

(SPb RAACI)

MEDICAL IMMUNOLOGY/ MEDITSINSKAYA IMMUNOLOGIYA

January-February

2025, volume 27

No. 1

Published since March 1999

Editor-in-Chief

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

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 09.12.2024. Print format 60 x 90 1/8. Offset printing.

Printed sheets 29.5. Circulation 2000 copies. (1st edition – 1000 copies.)

Print in LLC «ARTEMIDA»

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

Phone: (812) 950-10-99

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

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

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

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

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

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

Editorial Council

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

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

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

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

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

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

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

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

СОДЕРЖАНИЕ

Обзоры

Ширинский И.В., Ширинский В.С.

АУТОИММУННЫЙ УВЕИТ: ФАКТОРЫ РИСКА И ПРОБЛЕМЫ ИММУНОПАТОГЕНЕЗА	7
---	---

Глазанова Т.В., Павлова И.Е., Кузьмич Е.В., Бубнова Л.Н.

РАСТВОРИМЫЕ МОЛЕКУЛЫ ИММУННЫХ КОНТРОЛЬНЫХ ТОЧЕК: МЕХАНИЗМЫ ОБРАЗОВАНИЯ, ФУНКЦИИ, РОЛЬ ПРИ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ НОВООБРАЗОВАНИЯХ	21
--	----

Оригинальные статьи

Орлова Е.С., Чепанов С.В., Зайнулина М.С., Сельков С.А.

КЛИНИКО-ИММУНОЛОГИЧЕСКОЕ ОБОСНОВАНИЕ ПРОТОКОЛА ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ПЛАЗМАФЕРЕЗА И ВНУТРИВЕННЫХ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ У БЕРЕМЕННЫХ С АНТИФОСФОЛИПИДНЫМ СИНДРОМОМ	35
--	----

Черепович Б.С., Кудряшова А.М., Панкратьева Л.Л., Боголюбова А.В., Мануйлов В.А., Гуштин В.А., Почтовый А.А., Борисова О.В., Свистич О.А.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ Т-КЛЕТОЧНОГО ИММУННОГО ОТВЕТА К КОРОНАВИРУСУ SARS-CoV-2, ОСНОВАННОГО НА ИНДУКЦИИ ВЫРАБОТКИ γ -ИНТЕРФЕРОНА СПЕЦИФИЧЕСКИМИ Т-ЛИМФОЦИТАМИ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ПРИ ИХ СТИМУЛЯЦИИ ВИРУСНЫМ АНТИГЕНОМ	45
---	----

Коненков В.И., Шевченко А.В., Прокофьев В.Ф., Королева Е.Г., Тимофеева Ю.С., Айдагулова С.В., Маринкин И.О.

СИСТЕМНЫЕ ФАКТОРЫ РЕГУЛЯЦИИ АНГИОГЕНЕЗА ПРИ МНОЖЕСТВЕННОЙ МИОМЕ МАТКИ	57
---	----

Ширинкина А.С., Долгих О.В.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ ЭФФЕКТОВ БЕНЗ(А)ПИРЕНА И CHLORELLA GROWTH FACTOR <i>IN VIVO</i> , АССОЦИИРОВАННЫХ С КЛЕТОЧНЫМИ КЛАСТЕРАМИ ВРОЖДЕННОГО И АДАПТИВНОГО ИММУНИТЕТА	69
---	----

Айрапетов М.И., Ереско С.О., Михайлова А.А., Суханова Д.Д., Игнатова П.Д., Лебедев А.А., Бычков Е.Р., Шабанов П.Д.

ВЛИЯНИЕ РИФАМПИЦИНА НА ЭКСПРЕССИЮ ГЕНОВ СИСТЕМЫ Tox1 -ПОДОБНЫХ РЕЦЕПТОРОВ В СТРУКТУРАХ ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫСЫТ С ПРЕНАТАЛЬНЫМ ВОЗДЕЙСТВИЕМ АЛКОГОЛЯ	75
---	----

Романова Е.Л., Шабалдин А.В., Белов Е.Г., Стрига Л.В., Яковлева А.А., Шевченко Е.А., Шабалдина Е.В.

ГЕН-ГЕННЫЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ЦИТОКИНОВ И С-РЕАКТИВНОГО БЕЛКА ПРИ ПСОРИАЗЕ У ЖИТЕЛЕЙ КЕМЕРОВСКОЙ ОБЛАСТИ	87
--	----

Мангазеева Е.Д., Студеникина А.А., Рыжикова С.Л., Аутеншлюс А.И.

СОПРЯЖЕННОСТЬ КЛЕТОЧНОЙ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ ОПУХОЛИ С ЦИТОКИНПРОДУЦИРУЮЩИМ РЕЗЕРВОМ ПРИ ЛЮМИНАЛЬНЫХ И НЕЛЮМИНАЛЬНЫХ ПОДТИПАХ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ	97
---	----

Швыдченко И.Н., Быковская Е.Ю., Голубцов В.В.

ВЛИЯНИЕ МНОГОЭТАПНОЙ ИЗОЛЯЦИИ НЕЙТРОФИЛОВ НА ИХ КОЛИЧЕСТВО И ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ	107
---	-----

Сновская М.А., Семикина Е.Л., Макарова С.Г., Петричук С.В., Курбатова О.В., Жужула А.А., Ерешко О.А., Галимова А.А.

ОСОБЕННОСТИ IgE-ОТВЕТА НА БЕЛОК И ЖЕЛТОК КУРИНОГО ЯЙЦА У ДЕТЕЙ С ПИЩЕВОЙ АЛЛЕРГИЕЙ И АТОПИЧЕСКИМ ДЕРМАТИТОМ	119
---	-----

Иванова А.А., Дмитриева А.А., Денисенко А.Д.

АНТИТЕЛА К ЛИПОПРОТЕИНАМ НИЗКОЙ ПЛОТНОСТИ, МОДИФИЦИРОВАННЫМ МАЛОНЫМ ДИАЛЬДЕГИДОМ: СОДЕРЖАНИЕ В КРОВИ И РОЛЬ В АТЕРОГЕНЕЗЕ	131
---	-----

Балашова Л.М., Кузнецова Ю.Д., Лесовой С.В., Альварес М.А., Балашов А.А., Черкашин Д.Р., Кантаржи Е.П., Быковская С.Н., Салмаси Ж.М.

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ КОЛИЧЕСТВА Т-РЕГУЛЯТОРНЫХ КЛЕТОК ($\text{CD4}^+\text{CD25}^{\text{HIGH}}\text{FoxP3}^+\text{CD127}^{\text{LOW}}$) У ПАЦИЕНТОВ ДО 1 ГОДА С КАТАРАКТОЙ, ГЛАУКОМОЙ И РЕТИНОПАТИЕЙ НЕДОНОШЕННЫХ (ПО ОБЗОРНЫМ ДАННЫМ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ)	143
--	-----

Попова О., Зубкова О.В., Ожаровская Т.А., Зрелкин Д.И., Воронина Д.В., Голдовская П.П., Кан В.Ю., Должикова И.В., Гроусова Д.М., Ковыригина А.В., Ермолова И.А., Щербляков Д.В., Логунов Д.Ю., Гинцбург А.Л.

ИССЛЕДОВАНИЕ ИММУНОЛОГИЧЕСКОЙ ЭФФЕКТИВНОСТИ И БЕЗОПАСНОСТИ КАНДИДАТНОЙ ВАКЦИНЫ ДЛЯ ПРОФИЛАКТИКИ ГЕМОМРАГИЧЕСКОЙ ЛИХОРАДКИ ЛАССА	153
---	-----

Костинов М.П., Настаева Н.Ю., Никитюк Н.Ф., Ахматова Н.К., Альбаханса М.И., Юшкова С.В., Андреева Н.П., Костинова А.М., Линок А.В., Локтионова М.Н., Храпунова И.А.

ВАКЦИНА ПРОТИВ ГРИППА СПОСОБНА ИНДУЦИРОВАТЬ ПОСТИНФЕКЦИОННЫЕ АНТИТЕЛА К SARS-CoV-2 У МЕДИЦИНСКОГО ПЕРСОНАЛА	169
---	-----

Бухтуева Н.Г., Леплина О.Ю., Шевела Е.Я., Тихонова М.А., Пасман Н.М., Останин А.А., Черных Е.Р.

ИЗМЕНЕНИЯ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО ФЕНОТИПА ЦИРКУЛИРУЮЩИХ МОНОЦИТОВ В ДИНАМИКЕ БЕРЕМЕННОСТИ	179
--	-----

Аторин Д.А., Жулай Г.А., Топчиева Л.В., Курбатова И.В., Дуданова О.П.

УРОВЕНЬ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ <i>ENTPD1</i> , <i>NT5E</i> , <i>ADORA2A</i> , <i>FOXP3</i> И <i>RORγ</i> В ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ БОЛЬНЫХ ЯЗВЕННЫМ КОЛИТОМ	197
--	-----

Краткие сообщения

Загаляев Б.Т., Мироманова Н.А., Мироманов А.М.

ВЛИЯНИЕ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНОВ <i>DEFB1-20G>A</i> И <i>DEFB1-52G>A</i> НА УРОВЕНЬ ДЕФЕНЗИНА БЕТА 1 (<i>DEFB1</i>) У ПАЦИЕНТОВ ПРИЗЫВНОГО ВОЗРАСТА С ВНЕБОЛЬНИЧНЫМИ ПНЕВМОНИЯМИ	207
--	-----

Огуркова О.Н., Суслова Т.Е., Лугачева Ю.Г., Драгунова М.А., Ситкова Е.С., Баталов Р.Е.

АНАЛИЗ СОДЕРЖАНИЯ РАСТВОРИМОГО ТРОМБОМОДУЛИНА В СЫВОРОТКЕ КРОВИ У ПАЦИЕНТОВ С ФИБРИЛЛЯЦИЕЙ ПРЕДСЕРДИЙ НЕКЛАПАННОГО ГЕНЕЗА В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ПОЛА	215
---	-----

Елисюткина О.Г., Смольников Е.В., Литовкина А.О., Чернушевич Д.Д., Феденко Е.С.

РОЛЬ СЕНСИБИЛИЗАЦИИ К АЛЛЕРГЕНАМ ПЫЛЬЦЫ БЕРЕЗЫ В РАЗВИТИИ ОБОСТРЕНИЙ АТОПИЧЕСКОГО ДЕРМАТИТА У ПАЦИЕНТОВ, ПРОЖИВАЮЩИХ В МОСКВЕ И МОСКОВСКОЙ ОБЛАСТИ	225
--	-----

Правила для авторов	233
---------------------------	-----

Авторский указатель	236
---------------------------	-----

Предметный указатель	236
----------------------------	-----

CONTENTS

Reviews

Shirinsky I.V., Shirinsky V.S.

AUTOIMMUNE UVEITIS: RISK FACTORS AND ISSUES OF IMMUNOPATHOGENESIS 7

Glazanova T.V., Pavlova I.E., Kuzmich E.V., Bubnova L.N.

SOLUBLE IMMUNE CHECKPOINT MOLECULES: MECHANISM OF FORMATION, FUNCTION, ROLE IN MALIGNANT NEOPLASMS 21

Original articles

Orlova E.S., Chepanov S.V., Zainulina M.S., Selkov S.A.

USE OF PLASMAPHERESIS AND INTRAVENOUS IMMUNOGLOBULINS IN PREGNANT WOMEN WITH ANTIPHOSPHOLIPID SYNDROME 35

Cherepovich B.S., Kudryashova A.M., Pankratieva L.L., Bogoliybova A.V., Manuilov V.A., Gushchin V.A., Pochtovyi A.A., Borisova O.V.,
Svitich O.A.

DETERMINATION OF T CELL IMMUNE RESPONSE TO SARS-CoV-2 CORONAVIRUS BASED ON INDUCED γ -INTERFERON PRODUCTION BY SPECIFIC T CELLS UPON THEIR STIMULATION BY VIRAL ANTIGEN 45

Konenkov V.I., Shevchenko A.V., Prokofiev V.F., Koroleva E.G., Timofeeva Yu.S., Aidagulova S.V., Marinkin I.O.

SYSTEMIC REGULATORY FACTORS OF ANGIOGENESIS IN MULTIPLE UTERINE MYOMA 57

Shirinkina A.S., Dolgikh O.V.

EXPERIMENTAL STUDY OF THE EFFECTS OF BENZ(A)PYRENE AND CHLORELLA GROWTH FACTOR *IN VIVO* ASSOCIATED WITH CELLULAR CLUSTERS OF INNATE AND ADAPTIVE IMMUNITY 69

Airapetov M.I., Eresko S.O., Mikhailova A.A., Sukhanova D.D., Ignatova P.D., Lebedev A.A., Bychkov E.R., Shabanov P.D.

EFFECT OF RIFAMPICIN ON TOLL-LIKE RECEPTOR SYSTEM GENE EXPRESSION IN BRAIN STRUCTURES OF RATS WITH PRENATAL ALCOHOL EXPOSURE 75

Romanova E.L., Shabaldin A.V., Belov E.G., Striga L.V., Yakovleva A.A., Shevchenko E.A., Shabaldina E.V.

GENE-GENE INTERACTIONS OF CYTOKINES AND C-REACTIVE PROTEIN IN PSORIASIS IN RESIDENTS OF KEMEROVO REGION 87

Mangazeeva E.D., Studenikina A.A., Ryzhikova S.L., Autenshlyus A.I.

ASSOCIATION OF TUMOR CELL DIFFERENTIATION WITH CYTOKINE-PRODUCING RESERVE IN LUMINAL AND NONLUMINAL SUBTYPES OF BREAST CANCER 97

Shvydchenko I.N., Bykovskaya E.Yu., Golubtsov V.V.

EFFECT OF MULTISTAGE ISOLATION OF NEUTROPHILS ON THEIR COUNTS AND VIABILITY 107

Snovskaya M.A., Semikina E.L., Makarova S.G., Petrichuk S.V., Kurbatova O.V., Zhuzhula A.A., Ereshko O.A., Galimova A.A.

FEATURES OF THE IgE RESPONSE TO EGG WHITE AND YOLK IN CHILDREN WITH FOOD ALLERGIES AND ATOPIC DERMATITIS 119

Ivanova A.A., Dmitrieva A.A., Denisenko A.D.

ANTIBODIES TO LOW-DENSITY LIPOPROTEINS MODIFIED BY MALONIC DIALDEHYDE: CONTENTS IN BLOOD AND ROLE IN ATHEROGENESIS 131

Balashova L.M., Kuznetsova Yu.D., Lesovoy S.V., Alvarez M.A., Balashov A.A., Cherkashin D.R., Kantarshi E.P., Bykovskaya S.N.,
Salmasi Zh.M.

A COMPARATIVE STUDY OF T REGULATORY CELLS NUMBERS (CD4⁺CD25^{HIGH}FoxP3⁺CD127^{LOW}) IN PATIENTS UNDER 1 YEAR OF AGE WITH CATARACT, GLAUCOMA, AND RETINOPATHY OF PREMATURITY (REVIEW OF THE OWN STUDIES) 143

Popova O., Zubkova O.V., Ozharovskaia T.A., Zrelkin D.I., Voronina D.V., Goldovskaya P.P., Kan V.Yu., Dolzhikova I.V., Grousova D.M.,
Kovyrshina A.V., Ermolova I.A., Shcheblyakov D.V., Logunov D.Yu., Gintsburg A.L.

STUDY OF THE IMMUNOLOGICAL EFFICACY AND SAFETY OF A CANDIDATE VACCINE AGAINST LASSA HEMORRHAGIC FEVER 153

Kostinov M.P., Nastaeva N.Yu., Nikityuk N.F., Akhmatova N.K., Albahansa M.I., Yushkova S.V., Andreeva N.P., Kostinova A.M., Linok A.V.,
Loktionova M.N., Khrapunova I.A.

INFLUENZA VACCINE IS ABLE TO INDUCE POST-INFECTION ANTIBODIES TO SARS-CoV-2 IN MEDICAL STAFF 169

Bukhtueva N.G., Lepina O.Yu., Shevela E.Ya., Tikhonova M.A., Pasman N.M., Ostanin A.A., Chernykh E.R.

CHANGES OF THE FUNCTIONAL PHENOTYPE OF CIRCULATING MONOCYTES DURING PREGNANCY 179

Atorin D.A., Zhulai G.A., Topchieva L.V., Kurbatova I.V., Dudanova O.P.

ENTPD1, NT5E, ADORA2A, FOXP3 AND ROR γ GENE EXPRESSION IN PERIPHERAL BLOOD OF PATIENTS WITH ULCERATIVE COLITIS 197

Short communications

Zagalaev B.T., Miromanova N.A., Miromanov A.M.

EFFECTS OF THE *DEFB1-20G>A* AND *DEFB1-52G>A* GENE POLYMORPHISM ON THE LEVEL OF BETA 1 DEFENSIN (DEFB1) IN YOUNG ADULTS WITH COMMUNITY-ACQUIRED PNEUMONIAS 207

Ogurkova O.N., Suslova T.E., Lugacheva Yu.G., Dragunova M.A., Sitkova E.S., Batalov R.E.

ANALYSIS OF SOLUBLE THROMBOMODULIN CONTENTS IN BLOOD SERUM OF PATIENTS WITH NON-VALVULAR ATRIAL FIBRILLATION: GENDER DEPENDENCE 215

Elisyutina O.G., Smolnikov E.V., Litovkina A.O., Chernuchevich D.D., Fedenko E.S.

THE ROLE OF SENSITIZATION TO BIRCH POLEN ALLERGENS IN THE DEVELOPMENT OF ACUTE ATOPIC DERMATITIS IN PATIENTS LIVING IN MOSCOW AND THE MOSCOW REGION 225

Instructions to Authors 233

Author index 236

Subject index 236

АУТОИММУННЫЙ УВЕИТ: ФАКТОРЫ РИСКА И ПРОБЛЕМЫ ИММУНОПАТОГЕНЕЗА

Ширинский И.В., Ширинский В.С.

Научно-исследовательский институт терапии и профилактической медицины — филиал Федерального исследовательского центра «Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», г. Новосибирск, Россия

Резюме. Представлены последние достижения в понимании механизмов, лежащих в основе предрасположенности к иммуноопосредованному увеиту (ИУ) и его патогенеза. Подробно описаны модели увеита человека на животных, среди которых наиболее охарактеризованными моделями экспериментального переднего увеита являются эндотоксин-индуцированный увеит и экспериментальный аутоиммунный передний увеит. В результате этих исследований были идентифицированы такие факторы транскрипции, как STAT3, Interferon regulatory factor 4, 8, регуляторные белки — Suppressor of cytokine signaling 1, 3 (SOCS1, SOCS3) и пути передачи сигналов цитокинов, которые регулируют развитие ИУ и могут служить потенциальными терапевтическими мишенями для лечения. Охарактеризованы факторы риска окружающей среды, способствующие развитию ИУ. Представлены данные о влиянии физической активности, курения, состояния микробиома кишечника, диеты на частоту возникновения ИУ, описаны известные и предполагаемые механизмы участия факторов риска в инициации и патогенезе болезни. В частности, изложены результаты исследований, свидетельствующих о существовании двух основных механизмов участия микробиома кишечника в развитии ИУ: антигены микробиома кишечника действуют как триггеры активации Т-клеток, специфичных для антигенов сетчатки и микробиом модулирует баланс эффекторных субпопуляций Т-лимфоцитов (Th1 и Th17) и субпопуляций иммунорегуляторных клеток (Treg). Изложены сведения о том, что высокий уровень экспрессии глазных белков (межфоторецепторный ретиноид-связывающий белок — IRBP или S-антиген) в тимусе коррелировал с устойчивостью к развитию ЕАУ, тогда как низкий уровень коррелировал с предрасположенностью к увеиту. Эти основополагающие исследования патогенеза ИУ позволило дать объяснение избирательной восприимчивости к аутоиммунному увеиту и предположить, что резистентность к увеиту регулируется, по крайней мере частично, способностью сохранять центральную толерантность к аутоантигенам сетчатки. Описано, что увеитогенные Т-клетки памяти перемещаются из сетчатки и периферических лимфоидных тканей в костный мозг, находясь там в состоянии покоя до повторной стимуляции, превращаясь в различные субпопуляции эффекторных клеток. Анализ результатов иммунологических исследований на модели увеита у мыши и периферической крови пациентов с увеитом человека выявил патогенетическую роль Th17-лимфоцитов и активатора транскрипции STAT3 в развитии аутоиммунного увеита и сиг-

Адрес для переписки:

Ширинский Иван Валерьевич
Научно-исследовательский институт терапии
и профилактической медицины
630089, Россия, г. Новосибирск,
ул. Бориса Богаткова, 175/1.
Тел.: 8 (913) 018-61-16.
E-mail: ivan.shirinsky@gmail.com

Address for correspondence:

Ivan V. Shirinsky
Research Institute of Internal and Preventive Medicine
175/1 Boris Bogatkov St
Novosibirsk
630089 Russian Federation
Phone: +7 (913) 018-61-16.
E-mail: ivan.shirinsky@gmail.com

Образец цитирования:

И.В. Ширинский, В.С. Ширинский «Аутоиммунный увеит: факторы риска и проблемы иммунопатогенеза» // Медицинская иммунология, 2025. Т. 27, № 1. С. 7–20. doi: 10.15789/1563-0625-AUR-2956

© Ширинский И.В., Ширинский В.С., 2025
Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

I.V. Shirinsky, V.S. Shirinsky "Autoimmune uveitis: risk factors and issues of immunopathogenesis", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2025, Vol. 27, no. 1, pp. 7–20. doi: 10.15789/1563-0625-AUR-2956

© Shirinsky I.V., Shirinsky V.S., 2025
The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License
DOI: 10.15789/1563-0625-AUR-2956

нальный белок STAT3 является потенциальной терапевтической мишенью при неинфекционном увеите.

Ключевые слова: иммуноопосредованный увеит, экспериментальные модели неинфекционного увеита, факторы риска увеита, центральная толерантность, периферическая толерантность, Т-хелперы, Th17-лимфоциты, сигнальный белок STAT3

AUTOIMMUNE UVEITIS: RISK FACTORS AND ISSUES OF IMMUNOPATHOGENESIS

Shirinsky I.V., Shirinsky V.S.

Research Institute of Internal and Preventive Medicine, Branch of the Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russian Federation

Abstract. We present recent advances in studying the mechanisms of susceptibility to immune-mediated uveitis (IM) and its pathogenesis. Animal models of human uveitis are described in details. Those include the best characterized models of experimental anterior uveitis (endotoxin-induced uveitis and experimental autoimmune anterior uveitis). As a result of these studies, some relevant transcription factors were detected, such as STAT3, Interferon regulatory factor 4, 8; regulatory proteins, e.g., suppressors of cytokine signaling 1, 3 (SOCS1, SOCS3) and cytokine signaling pathways that regulate the development of IS and may serve as potential therapeutic targets for treatment. Environmental risk factors contributing to the development of IS are also characterized. The presented data concern the influence of physical activity, smoking, state of intestinal microbiome, and diet on the incidence of IS, as well as known and suspected contribution of the risk factors to the initiation and pathogenesis of the disease. In particular, we present results of studies which suggest two main options of intestinal microbiome involvement in the IS development: intestinal microbiome antigens act as triggers for activation of T cells specific for retinal antigens, and the microbiome modulates the balance of effector subpopulations of T lymphocytes (Th1 and Th17) and immunoregulatory subpopulations cells (Treg). It is reported that high levels of expression of ocular proteins (interphotoreceptor retinoid binding protein – IRBP or S-antigen) in the thymus correlated with resistance to the development of EAU, while low IRBP levels correlated with susceptibility to uveitis. These seminal studies in pathogenesis of IU allowed explanation for selective susceptibility to autoimmune uveitis and suggested regulation tools of resistance to uveitis, at least, in part, due to ability of maintaining central tolerance to retinal autoantigens. Uveitogenic memory T cells have been described to move from retina and peripheral lymphoid tissues to the bone marrow, remaining there in a quiescent state until re-stimulation, then transforming into various subpopulations of effector cells. Analysis of immunological studies in murine models of uveitis and peripheral blood of patients with uveitis had revealed a pathogenetic role of Th17 lymphocytes and a transcription activator STAT3 in development of autoimmune uveitis, with STAT3 signaling protein being a potential therapeutic target for non-infectious uveitis.

Keywords: immune-mediated uveitis, experimental models of non-infectious uveitis, risk factors uveitis, central tolerance, peripheral tolerance, T helper cells, Th17 lymphocytes, STAT3 protein

Финансирование подготовки обзора осуществлялось за счет средств, направленных на выполнение государственного задания НИИТПМ – филиал ИЦиГ, тема FWNR-2024-0002.

Введение

Увеит представляет собой группу внутриглазных заболеваний, характеризующихся воспалением сосудистой оболочки и других тканей глаза, включая сетчатку, кровеносные сосуды сетчатки, стекловидное тело и зрительный нерв. Увеит является ведущей причиной слепоты во

всем мире, на его долю приходится 10-15% случаев потери зрения [22, 31, 47]. Подсчитано, что более 2 миллионов человек страдают от увеита, и это число увеличивается [22, 31]. Увеит этиологически разделяют на инфекционный увеит и иммуноопосредованный увеит (ИУ). Первый, как правило, более распространен в развивающихся странах [52, 74], тогда как второй преобладает в развитых странах [11, 61, 93]. Глюкокортикоиды и другие противовоспалительные препараты являются эффективными средствами лечения ИУ, однако большое число нежелательных явлений,

в том числе серьезных, препятствуют их длительному использованию. Отсюда необходимость разработки новых эффективных и безопасных методов лечения на основе более глубокого понимания патогенеза ИУ. В обзоре будут представлены последние достижения в понимании механизмов, лежащих в основе предрасположенности к увеиту и его иммунопатогенеза.

Строение глаза. Общие сведения

Глаз отделен от периферической иммунной системы и является одним из наиболее анатомически сложных органов у млекопитающих [17]. Он состоит из:

1. Внешней оболочки глаза, состоящей из непрозрачной склеры (внешний белый слой глазного яблока), и прозрачной роговицы, являющейся продолжением склеры.

2. Пигментного эпителия сетчатки (ПЭС), который представляет собой один слой гексагональных пигментированных клеток, лежащих поверх сетчатки и прикрепленных к подлежащей сосудистой оболочке. Он участвует в фагоцитозе мембран наружного сегмента фоторецепторов, поглощении света, эпителиальном транспорте и питании зрительных клеток нейросетчатки.

3. Клеток глии (клетки Мюллера) — специализированный тип глиальных клеток, который поддерживает и снабжает нейроны сетчатки питательными веществами, кислородом и обеспечивает функциональную стабильность этих клеток. Клетки Мюллера изолируют нейроны друг от друга, поглощают нейротрансмиттеры и регулируют внеклеточную среду.

4. Сосудистая оболочка представляет собой пигментированный средний слой глаза под роговицей и склерой и состоит из васкуляризированной сосудистой оболочки, радужной оболочки и цилиарного тела. Он выполняет большинство зрительных функций глаза, включая фокусировку на объектах, находящихся на разном расстоянии от сетчатки, и изменение размера зрачка в ответ на интенсивность света.

5. Нервная часть сетчатки — самый внутренний светочувствительный слой, состоящий из пяти типов нейронов, принимающих фотоны, проходящие через роговицу и хрусталик. Они включают в себя светочувствительные ганглиозные клетки, амакриновые и биполярные клетки, горизонтальные клетки и фоторецепторы (палочки и колбочки). Эти клетки генерируют двухмерное изображение объекта и преобразуют его в электрические сигналы, которые затем передаются в мозг для создания зрительного восприятия. Сетчатка и зрительный нерв эмбриональных позвоночных происходят из промежуточного мозга и считаются частью ЦНС.

Следует напомнить, что, подобно клеткам мозга, сетчатка является иммунопривилегиро-

ванной тканью. Развитие офтальмологической иммунологии привело к пониманию особой взаимосвязи между глазом и иммунной системой, и это фундаментальное исследование легло в основу концепции иммунных привилегий. Сэр Питер Медавар, который разделил Нобелевскую премию по физиологии и медицине 1960 года с сэром Фрэнком Макфарлейном Бернетом, ввел термин «иммунная привилегия» в результате исследований, показывающих, что аллотрансплантат опухоли или кожи при помещении в переднюю камеру глаза не отторгается [58]. Иммунная привилегия тогда рассматривалась как уникальная особенность глаза, а неспособность отторгнуть аллотрансплантат или аллоантиген объяснялась отсутствием кровеносных сосудов в сетчатке [59]. Современное объяснение иммунных привилегий заключается в том, что белки в иммунопривилегированных тканях ЦНС секвестрируются периферической иммунной системой с помощью гематоэнцефалического барьера (ГЭБ) и сосудисто-нервной единицы (СНЕ), которая состоит из перicyтов, периваскулярных макрофагов, нейрональных дендритных и глиальных клеток Мюллера. Этот ансамбль клеток плотно связан эндотелиальными клетками, окружающими СНЕ [21, 62]. Бессосудистая среда сетчатки лишена лимфатического дренажа, содержит резидентные регуляторные клетки, секретирующие нейрпептиды и противовоспалительные цитокины, а также способствует иммунологической секвестрации сетчатки [62]. Кроме того, резидентные клетки сетчатки, которые экспрессируют ингибирующие белки, ассоциированные с клеточной поверхностью (TGF- β , лиганд FAS/FAS, CD46 и CD59), ограничивают воспаление в сетчатке путем инактивации лимфоцитов [44, 109, 110]. Считается, что нормальное развитие кишечного микробиома в раннем детстве играет важную роль в формировании барьеров [3], а исследования на мышах с дефектным кишечным микробиомом установили связь между дисбактериозом и восприимчивостью к воспалительным заболеваниям, включая острый передний увеит [3, 16, 81].

Напомним, что увеит классифицируется как передний, промежуточный, задний или панувеит, в зависимости от анатомической локализации [67]. Передний увеит является наиболее распространенной формой и проявляется как ирит, или иридоциклит, в то время как промежуточный увеит характеризуется витритом и периферическим васкулитом сетчатки. Задний увеит представляет собой заболевание заднего сегмента (сетчатки, сосудистой оболочки и стекловидного тела), симптомы которого включают нечеткость зрения, светобоязнь, неоваскуляризацию сетчатки, отслойку сетчатки и отек желтого пятна. Сле-

дует напомнить, что, помимо идиопатической формы, ИУ часто ассоциируется с саркоидозом, псориатическим артритом, анкилозирующим спондилоартритом, ювенильным ревматоидным артритом (ЮРА), рассеянным склерозом, болезнью Фогта–Коянаги–Харады, болезнью Бехчета, системной красной волчанкой (СКВ) и системными васкулитами [67, 80].

Модели увеита у экспериментальных животных

Модели увеита человека на животных способствуют более глубокому пониманию иммунопатогенеза ИУ. Наиболее охарактеризованными моделями экспериментального переднего увеита являются эндотоксин-индуцированный увеит (EIU) [81] и экспериментальный аутоиммунный передний увеит (ЕААУ), также называемый экспериментальным меланин-индуцированным увеитом (ЕМИУ) [4, 5]. Задний увеит представляет наибольший риск слепоты, и известной моделью заднего увеита является экспериментальный аутоиммунный увеит (ЕАУ) [8, 56, 100]. Изучение ЕАУ с использованием различных генетически модифицированных линий мышей выявило разнообразные внутриклеточные пути, которые опосредуют задний увеит. В этих исследованиях были идентифицированы такие факторы транскрипции, как STAT3 (Signal transducer and activator of transcription 3), Interferon regulatory factor 4, 8 (IRF4, IRF8), регуляторные белки — Suppressor of cytokine signaling 1, 3 (SOCS1, SOCS3) или пути передачи сигналов цитокинов, которые регулируют развитие ЕАУ и могут служить потенциальными терапевтическими мишенями для лечения увеита [17, 45, 51, 69, 70, 106]. Особый интерес представляет линия трансгенных мышей, экспрессирующая TCR, специфичный для фрагмента 161-180 белка IRBP (interphotoreceptor retinoid binding protein), у которых развивается спонтанный ЕАУ. Анализ ЕАУ у этих мышей показал, что антигены кишечных комменсалов могут запускать аутореактивные Т-клетки, специфичные для антигенов сетчатки и инициации увеита [39].

Эндотоксин-индуцированный увеит (EIU) представляет собой модель острого воспаления переднего сегмента у грызунов, вызванную подкожной или внутрибрюшинной инъекцией липополисахарида (LPS), и характеризуется инфильтрацией воспалительных клеток в переднем сегменте глаза [57]. При EIU выявляются иммуногистопатологические признаки переднего увеита человека, продолжительность воспалительной реакции относительно короткая (< 72 часов) и не вызывает стойкого повреждения тканей [57]. У животных с ЕААУ введение белков, связанных с гранулами меланина, вызывает воспаление, более типичное для переднего увеита человека [4, 5, 43]. При ЕААУ регистрируется массивная инфильтра-

ция мононуклеарных и полиморфноядерных клеток в переднюю камеру, сосуды радужки и цилиарного тела с ограниченным поражением заднего сегмента. Следует помнить, что ни одна из описанных моделей не демонстрирует полного спектра клинических и гистопатологических признаков увеита человека, однако каждая из них способствует пониманию отдельных звеньев патологического процесса.

Экспериментальной моделью заднего увеита является экспериментальный аутоиммунный увеит (ЭАУ), при котором клеточный субстрат воспаления представлен Т-клетками. Инициация воспаления вызывается у восприимчивых видов животных активной иммунизацией специфическими для глаза белками или пептидами в эмульсии, содержащей полный адъювант Фрейнда (CFA). Полная картина заболевания развивается при одновременном введении коклюшного токсина и убитых нагреванием туберкулезных бактерий, которые активируют рецепторы распознавания бактериального паттерна на клетках врожденного иммунитета [100]. Белком сетчатки, обычно используемым для индукции ЕАУ у мышей и крыс, является S-антиген (S-Ag или аррестин) и межфоторецепторный ретиноид-связывающий белок (IRBP) [11, 26]. ЕАУ считается адекватной моделью заднего увеита из-за его иммунопатологических особенностей, которые касаются ирита, хориоидита, витрита, васкулита сетчатки, разрушения фоторецепторных клеток и отека сетчатки [69]. Важно отметить, что болезнь передается наивным сингенным животным путем инъекции активированных *in vitro* CD4⁺Т-клеток, специфичных к ретинальным антигенам [8, 56, 100].

Факторы риска развития иммуноопосредованного увеита

Изучению факторов риска окружающей среды при ИУ уделялось ограниченное внимание. Индустриализация значительно улучшила уровень медицины и меры по охране здоровья, что существенно снизило заболеваемость инфекционными заболеваниями и увеличило продолжительность жизни [6, 24]. Индустриализация вызвала радикальные сдвиги в образе жизни, эти изменения связаны с патогенезом многих аутоиммунных заболеваний [24, 60, 71]. Образ жизни, санитария и окружающая среда развитых и развивающихся стран сильно различаются. Одним из объяснений повышения числа случаев ИУ была гипотеза образа жизни. С одной стороны, частота инфекционных увеитов снижается благодаря улучшению санитарии, а с другой стороны — изменение образа жизни значительно повышает заболеваемость ИУ. Неудивительно, что доля ИУ в развитых и развивающихся странах не одинаково-

ва и это связано с рядом факторов, которые мы кратко рассмотрим.

Физическая активность и иммуноопосредованный увеит

Принято считать, что физическая активность играет важную роль в поддержании здоровья. Однако подсчитано, что 31% взрослых физически неактивны, а в развитых странах этот показатель еще выше [32]. Обнаружена связь между отсутствием физической активности и частотой аутоиммунных заболеваний, таких как системная красная волчанка, ревматоидный артрит, рассеянный склероз и воспалительные заболевания кишечника [83].

Данные литературы о влиянии физической активности на риск развития ИУ и его течение единичны. Показано, что регулярная физическая активность снижает уровень активных форм кислорода, которые индуцируются провоспалительными цитокинами и участвуют в повреждении сосудистой оболочки глаза [49]. Группы с низкой физической активностью чаще страдают ожирением, которое может способствовать развитию увеита. В частности, белая жировая ткань действует как важный эндокринный орган, секретирующий адипокины, в том числе классические провоспалительные цитокины IL-6 и TNF α [98]. Ожирение может усугубить тяжесть EAU [64], поскольку у лиц с ожирением регистрируются признаки вялотекущего воспаления. Хотя в этой области нет единого мнения, неоднократно было показано, что регулярная физическая активность улучшает прогноз пациентов с аутоиммунными заболеваниями, в том числе аутоиммунными увеитами.

Курение как фактор риска иммуноопосредованного увеита

Ряд исследований выявили связь между курением и многими аутоиммунными заболеваниями, включая ревматоидный артрит [10], рассеянный склероз [91], системную красную волчанку [87], болезнь Грейвса [72] и тиреоидит Хашимото [60].

В нескольких исследованиях было установлено, что курение табака является фактором риска развития увеита [30, 50, 108]. Согласно исследованию P. Lin и соавт. [50], курение является фактором риска как инфекционного, так и неинфекционного увеита, в то время как другое исследование показало, что курение ассоциировано только с неинфекционным увеитом [108]. В перекрестном исследовании неинфекционного увеита M. Roesel и соавт. [78] выявили, что курение связано с повышенным риском активности увеита в сочетании с потребностью в локальном лечении глюкокортикоидами, риском развития катаракты и макулярного отека. Важно отметить, что курение, по-видимому, не имеет отношения к болезни Бехчета [55], поскольку никотин ис-

пользовался для лечения язв у пациентов с болезнью Бехчета без каких-либо глазных осложнений [28]. Табачный дым содержит множество различных ингредиентов, включая никотин, полициклические ароматические углеводороды и около 4000 известных активных соединений. Хотя никотин оказывает защитное действие при болезни Бехчета, другие ингредиенты оказывают влияние несколькими путями. Экстракт сигаретного дыма может усиливать воспаление посредством активации NF- κ B, GATA, PAX5 (транскрипционный фактор paired box 5) и Smad3/4 (сигнальный трансдуктор для TGF- β 1), что приводит к повышенному высвобождению TNF α , IL-1, IL-6 и IL-8 [66]. Эта активация способствует увеличению содержания воспалительных клеток, циркулирующих в крови, повышает риск воспаления сосудов и аномальных микрососудистых структур, участвует в нарушении гематоретинального барьера [66]. Получены доказательства связи между курением сигарет и повышенным риском воспалительного макулярного отека, что указывает на повреждение гематоретинального барьера [78, 94, 97]. В дополнение к воспалению сосудов, курение и пассивное курение вызывает истончение хориоидеи у взрослых и детей, что было выявлено с помощью оптической когерентной томографии [20, 85, 107]. Кроме того, N. Yuan и соавт. сообщили о дозозависимом эффекте пассивного курения на истончение сосудистой оболочки глаза у детей [107]. Связь между курением и ИУ изучена недостаточно полно, и механизм, с помощью которого курение способствует развитию иммуноопосредованного увеита, неясен, отказ от курения рекомендуется для уменьшения его рецидивов и осложнений.

Изменение структуры микробиома кишечника — риск развития ИА?

Микробиом кишечника состоит из сложных бактериальных и вирусных сообществ, неразрывно связанных с организмом хозяина. Кишечный микробиом сопровождал человека на протяжении длительного периода эволюции, способствуя формированию иммунной и метаболической систем [86]. Микробиом кишечника может быть реконструирован двумя основными путями — изменением в рационе питания и применением антибиотиков. Показано, что нарушения в микробиоме кишечника являются звеном патогенеза аутоиммунных заболеваний как в кишечнике, так и за его пределами [23], включая рассеянный склероз [41], анкилозирующий спондилоартрит [102], ревматоидный [16] и псориаз [12].

Установлены два основных механизма участия микробиома кишечника в развитии ИУ: антигены микробиома кишечника действуют как

триггеры активации Т-клеток, специфичных для антигенов сетчатки, и микробиом кишечника модулирует баланс эффекторных субпопуляций Т-лимфоцитов (Th1 и Th17) и субпопуляций иммунорегуляторных клеток (Treg).

Используя модель мышей R161H, R. Horai и соавт. [37] обнаружили, что увеличение специфичных для антигенов сетчатки Т-клеток происходит еще в доклиническую стадию воспаления глаз и не зависит от эндогенного источника родственного антигена. Более того, активация может стимулироваться богатым бактериями кишечным содержимым *in vitro* и вызывать заболевание у наивных реципиентов дикого типа путем переноса Т-клеток, культивированных с экстрактами кишечного содержимого. Это свидетельствует о том, что антигены кишечного микробиома, вероятно, имитируют антигены сетчатки, которые идентифицируются с помощью IRBP-специфических Т-клеточных рецепторов [37]. Помимо имитации антигенов микробиома кишечника и антигенов сетчатки клетки микробиома, их продукты, выполняют роль адьюванта, поскольку пероральные антибиотики широкого спектра и безмикробные условия снижают тяжесть заболевания [37]. Следовательно, один или несколько микробов определенного вида играют роль в активации, в то время как некоторые другие виды микробов создают провоспалительную среду для этой активации. Две группы исследователей сообщили о модулирующем эффекте кишечного микробиома на модели экспериментального EAU, полученной путем введения эмульсии, содержащей полный адьювант Фрейнда и пептид IRBP [35, 65]. Показано, что пероральные антибиотики, вводимые в течение короткого промежутка времени, уменьшали тяжесть клинических проявлений увеита у мышей линии B10.RIII за счет экспансии Treg в лимфатические узлы дренирующие глаз и кишечник [65]. Антибиотики снижали количество основных бактериальных типов *Firmicutes* и *Bacteroidetes*, а также класс бактерий *Alphaproteobacteria* [65]. Следует отметить, что состав кишечного микробиома значительно различался у иммунизированных и не иммунизированных животных. Разнообразие кишечного микробиома у иммунизированных животных ассоциировалось с выраженными клиническими проявлениями и менее выраженными у не иммунизированных. Это свидетельствует о том, что существуют определенные типы кишечного микробиома обладающие оппозитным действием на развитие увеита: тип защищающий от развития увеита и тип способствующий его формированию [65]. Heissigerova J. и соавт. [35] сообщили, что безмикробные условия в кишечнике мышей C57BL/6J ассоциируются с меньшей инфильтрацией Т-клеток в сетчатку, а также меньшим ко-

личеством Th1 и Th17 в дренирующих глаза лимфатических узлах.

Надо подчеркнуть, что в такой большой популяции микроорганизмов, какой является микробиом кишечника, определить зависимость активации специфичных для сетчатки Т-клеток от одной конкретной последовательности микробного компонента или от метаболитов, синтезируемых различными микробами представляет собой трудную задачу. На основании анализа гена 16S рРНК и метагеномного анализа был описан микробиом кишечника пациентов с несколькими типами увеита, включая острый передний увеит [40, 79], идиопатический увеит [42], болезнь Бехчета [14, 105]. В клиническом исследовании острого переднего увеита Huang X. и соавт. [40] сообщили о значительной разнице в бета-разнообразии кишечного микробиома между пациентами с увеитом и контрольной группой. При исследовании ИУ у пациентов было выявлено несколько патогенных грибов, включая *Malassezia limited*, *Candida albicans*, *Candida glabrata* и *Aspergillus gracilis* [42]. Следует отметить, что количество исследований микробиома кишечника у пациентов с увеитом невелико, а многие подтипы ИУ не изучались. Чтобы понять взаимосвязь между различными фенотипами увеита и микробиомом кишечника, в будущем необходимы дополнительные исследования более высокого качества и на больших выборках.

Диета и иммуноопосредованный увеит

Напомним, что 70% всех лимфоцитов слизистых оболочек приходится на иммунную систему слизистой кишечника [63]. В этом разделе будет обсуждаться связь между западной диетой и ростом числа воспалительных заболеваний, включая увеиты [92]. Пищевые антигены и фармакологическое действие диеты являются двумя основными механизмами, которые определяют связь микробиома кишечника и воспалительными заболеваниями. Существование оси кишечник — глаз было подтверждено при возрастной дегенерации желтого пятна (AMD) [76], синдроме сухого глаза [95], глаукоме [9] и аутоиммунном увеите [37]. Основываясь на существовании этих взаимодействий, в последние годы широко обсуждается роль диеты при глазных заболеваниях. Показано, что прогрессирующая форма возрастной макулярной дегенерации (ВМД) была связана с западной диетой, характеризующейся переработанным и красным мясом, картофелем фри, молочными продуктами с высоким содержанием жира, энергетическими напитками, в то время как восточная диета, состоящая из цельнозерновых продуктов с низким гликемическим индексом, способствовала снижению риска ВМД [13]. Эти данные подтверждаются экспериментальными данными о том, что диета с высоким глике-

мическим индексом, подобная западной диете, вызывает симптомы дегенерации желтого пятна у мышей C57BL/6J дикого типа, которые ассоциируются с накоплением фагосом и липофусцина, атрофии пигментного эпителия сетчатки, фоторецепторных клеток, выпадением и образованием крупных базальных отложений [82]. В многоцентровом, рандомизированном клиническом исследовании фазы III показано, что более высокое потребление антиоксидантных каротиноидов, минералов, омега-3 длинноцепочечных полиненасыщенных жирных кислот (ДЦПНЖК) и витаминов группы В, а также более низкое потребление насыщенных и мононенасыщенных жиров снижает риск дегенерации желтого пятна [1]. Помимо ВМД, также сообщалось о роли диеты в лечении глаукомы [34].

Что касается ИУ, 2 группы исследователей сообщили, что диета играет защитную и усугубляющую роль в модели EAU у мышей [64, 84, 96]. Было показано, что введение в пищевой рацион ω -3 ДЦПНЖК ингибирует воспаление у мышей C57BL/6 с экспериментальным EAU [84, 96]. Установлено, что ω -3 ДЦПНЖК не только снижает продукцию провоспалительных цитокинов IL-1 и IL-17, опосредованную дендритными клетками, но также уменьшает содержание противовоспалительного цитокина IL-10, но в целом противовоспалительный эффект сохраняется. Другая группа исследователей выявила, что диета с высоким содержанием жиров способствовала более тяжелому течению EAU у экспериментальных животных [64]. Следует помнить, что фармакологические эффекты диеты регулируются генетическими факторами, что существенно усложняет проблему. Необходимо отметить, что пищевые антигены, имитирующие аутоантигены сетчатки, являются одним из механизмов развития аутоиммунного увеита. Были описаны два пептида, имитирующие увеитогенный эпитоп ретинального S-Ag: Cas из as2-казеина, обычного компонента коровьего молока, и Rota из поверхностного белка vp4 ротавируса, распространенного желудочно-кишечного патогена [103]. Примечательно, что пероральное введение Cas с нативным холерным токсином индуцировало увеит у крыс, в то время как S-Ag и Rota не вызывали заболевания, хотя ни один из них не переваривался. Итак, небольшое число исследований свидетельствует о том, что пища представляет собой обширный набор аутоантигенов, способных инициировать развитие аутоиммунного заболевания. Использование биоинформатических подходов для поиска диетических аутоиммунных эпитопов необходимо для исключения аутоантигенов из рациона пациентов с увеитом. Немногочисленные данные литературы не позволяют дать однозначный ответ на вопрос, что представляет

собой противовоспалительная диета и дальнейшие исследования в этом направлении следует считать актуальными.

Клеточные и молекулярные механизмы восприимчивости и резистентности к возникновению увеита

В этом разделе обзора будут представлены данные о патогенезе увеита, рассмотрены молекулярные основы предрасположенности к аутоиммунному увеиту, источнику аутореактивных Т-клеток памяти, которые опосредуют ремиттирующее воспаление при хроническом увеите.

Нарушение центрального механизма толерантности и предрасположенность к увеиту

Напомним, что зрелый Т-лимфоцит происходит из гемопоэтических стволовых клеток костного мозга (ГСК) и приобретает способность участвовать в иммунном ответе после созревания в тимусе. На очень ранних стадиях своего развития костномозговые лимфоидно-примированные мультипотентные предшественники (LMPP) и общие лимфоидные предшественники (CLP) попадают в кору тимуса и подвергаются процессам положительного и отрицательного отбора (центральная толерантность), что наделяет развивающуюся Т-клетку способностью различать собственные и не собственные антигены [36, 53]. Т-клетки, которые экспрессируют функциональный TCR и развивают толерантность к аутоантигенам, обнаруженным в тимусе, выходят из тимуса, чтобы попасть во вторичные лимфоидные органы и периферическое кровообращение. Фактор транскрипции AIRE (autoimmune regulator) играет ведущую роль в центральном механизме толерантности, способствуя экспрессии собственных белков на медуллярных эпителиальных клетках тимуса (mTEC), распознаваемые созревающими Т-клетками. Т-клетки с очень высоким сродством к родственному собственному белку элиминируются, потому что они инициируют развитие аутоиммунитета [18, 25]. Однако некоторые аутореактивные Т-клетки, с низким порогом чувствительности, необходимым для индукции толерантности, не элиминируются. Считается, что именно эти аутореактивные Т-клетки являются причиной развития органоспецифических аутоиммунных заболеваний [77]. Потенциально аутореактивные Т-клетки поддерживаются на низком уровне за счет иммуносупрессивной функции специализированных FoxP3⁺Т-клеток — естественными регуляторными Т-клетками (nTregs) [44], которые находятся также в тимусе. Они конститутивно секретируют IL-10 — иммуносупрессивный цитокин, который подавляет аутореактивные Т-клетки и воспаление [48]. Эти nTreg мигрируют из тимуса в пери-

ферические ткани и играют важную роль в периферической толерантности.

Рассмотрим центральный механизм толерантности при экспериментальном аутоиммунном увеите (ЭАУ). Костномозговые примированные мультипотентные предшественники (LMPP) и общие лимфоидные предшественники (CLP) попадают в тимус вблизи кортико-медуллярного соединения. Клетки-предшественники, заселяющие тимус, дифференцируются в ранние Т-клеточные предшественники (ETP), двойные негативные тимоциты-1 (DN1, DN2 и DN3), которые мигрируют в субкапсулярную зону для дальнейшего развития [53]. Тимоциты DN3, экспрессируют функциональный пре-Т-клеточный рецептор и CXCR4 (chemokine receptor type 4), получают сигналы выживания, способствующие пролиферации и, в конечном итоге, дифференцируются в DN4, а затем в двойные положительные (DP) тимоциты. DP тимоциты (CCR9^{hi}), подвергаясь положительному отбору, взаимодействуют с собственным комплексом пептид/антигены МНС на эпителиальных клетках коры тимуса, активируют CCR7 (C – C chemokine receptor type 7) и созревают в супрессорные Т-клетки [53]. Медуллярные эпителиальные клетки тимуса (mTEC) в кооперации с фактором транскрипции AIRE (аутоиммунный регулятор) в мозговом веществе беспорядочно экспрессируют тканерестриктивные антигены основных белков периферических тканей. AIRE также вносит свой вклад в механизм негативного отбора, способствуя устранению аутореактивных Т-клеток, вызывающих аутоиммунные заболевания. Т-клетки, с нормальной или низкой аффинностью/авидностью распознавания собственных антигенов, активируются, экспрессируют сфингозин-1-фосфатный рецептор-1 (S1P1), выходят из тимуса, попадают в кровь и периферические лимфоидные ткани.

Нарушение механизмов периферической толерантности и предрасположенность к увеиту

Механизмы периферической толерантности опосредованные nTreg, делают потенциально аутореактивные Т-клетки анергическими [17]. Наивные Т-клетки, проникающие в циркуляцию или периферические ткани, дифференцируются в различные субпопуляции Т-хелперов в ответ на РАР (патоген-ассоциированные молекулярные паттерны) или включаются в механизм молекулярной мимикрии. При ЕАУ активная иммунизация глазными антигенами (IRBP или S-Ag) индуцирует клональную экспансию Th1 и Th17, что приводит к заболеванию на 14-20-й день с последующим, после индукции болезни, разрешением острого воспалительного ответа между 25-32-м днями. Эти события опосредуются функцией Treg и Vreg. Однако небольшое количество аутореактивных Т-клеток памяти, экспрессирующих

IL-7R α , сохраняется. Они мигрируют в костный мозг (КМ), депонируются и могут быть реактивированы, способствуя развитию рецидивирующего увеита [71]. Ранние события, связанные с потерей иммунных привилегий глаза и индукцией защитного механизма сетчатки в модели увеита у грызунов, можно представить себе следующим образом. Эффекторные молекулы, такие как гранзим В, провоспалительные цитокины, секретируемые клетками Th17, облегчают разрушение гематоэнцефалического барьера, что приводит к миграции других воспалительных клеток – Th1 и Th2-лимфоцитов, моноцитов. Мигрировавшие клетки, попадающие в глаз, сталкиваются с противовоспалительными факторами нейросетчатки, состоящими из противовоспалительных молекул, а также регуляторных Т- и В-клеток, секретирующих IL-10 и/или IL-35 [71]. Современное понимание молекулярных основ резистентности или восприимчивости к органоспецифическим аутоиммунным заболеваниям стало возможным в результате серии исследований ЕАУ, проведенных в конце девяностых годов. Исследования тимуса мышей линий B10R^{III}, B10A, C57BL/6 и BALB/c и крыс линий Lewis и Brown-Norway, различающихся по своей относительной чувствительности к развитию ЕАУ, выявили прямые доказательства того, что белки глаза не секвестрированы и доступны для индукции толерантности в тимусе [19]. Благодаря этим исследованиям установлено, что белки глаза экспрессируются в тимусе, но уровень экспрессии варьировал даже среди животных одного и того же вида, включая мышей, крыс и приматов [19, 33, 88]. Высокий уровень экспрессии глазных белков (межфоторецепторный ретиноид-связывающий белок – IRBP или S-антиген) в тимусе коррелировал с устойчивостью к развитию ЕАУ, тогда как низкий уровень коррелировал с предрасположенностью к увеиту. Это наблюдение впоследствии было подтверждено на модели ЕАЕ у мышей [46] и в исследованиях на людях [73]. Таким образом, эти основополагающие исследования патогенеза ЕАУ позволили дать объяснение избирательной восприимчивости к аутоиммунному увеиту и предположить, что резистентность к увеиту регулируется, по крайней мере частично, способностью сохранять центральную толерантность к аутоантигенам сетчатки [18].

Провоспалительные Т-хелперы опосредуют острый и хронический рецидивирующий – ремиттирующий увеит

Возникновение увеита коррелирует с генами HLA класса I или класса II, при этом HLA-DR4 тесно связан с симпатической офтальмией или ВКГ, тогда как HLA-A29 связан с ретинохориоидопатией [27, 68]. С другой стороны, HLA-B27 ассоциируется с передним увеитом и анкило-

зирующим спондилитом [80, 104]. Как и у людей, восприимчивость мышей к увеиту связана с определенными генетическими локусами с сильной корреляцией с некоторыми гаплотипами МНС класса II [7]. Среди линий мышей наиболее чувствительным является B10.RIII со снижающейся чувствительностью: B10.RIII (H-2r) > B10.BR (H-2k) > C57BL/6 (H-2b) [7]. Семейство цитокинов IL-12 играет критическую роль в презентации Ag и дифференцировки наивных лимфоцитов, интенсивности, продолжительности и характере воспалительной реакции [99]. Семейство состоит из IL-12 (IL-12p35/IL-12p40), IL-23 (IL-23p19/IL-12p40), IL-27 (IL-27p28/Ebi3), IL-35 (IL-12p35/Ebi3) и IL-39 (IL-23p19/Ebi3) [99, 101]. Показано, что IL-12 инициировал развитие увеита по пути Th1ответа, в то время как мыши с дефицитом IL-12p40 оказались резистентными к EAU. Это позволило предположить, что Th1-лимфоциты опосредуют формирование EAU [90]. Последующее открытие IL-23 привело к изучению его роли в развитии ряда аутоиммунных заболеваний и возможного участия в патогенезе сопряженной субпопуляции — Th17-лимфоцитов [19] превентивным действием в отношении развития EAU [90]. Результаты этих исследований дали основания считать, что IL-23, а не IL-12, имеет решающее значение в развитии EAU, индуцированного иммунизацией IRBP в CFA [54]. После открытия субпопуляции Th17-лимфоцитов было установлено их участие в развитии EAU [2]. Показано, что у мутантных мышей с направленной делецией STAT3 в Т-клеточном компартменте CD4 не развивается EAU, поскольку их Т-клетки не могут дифференцироваться в Th17-лимфоциты [51]. У мышей CD4-STAT3KO, устойчивых к возникновению EAU, наблюдалось существенное увеличение Th1-клеток и повышенный уровень IFN γ , что свидетельствует о том, что повышенное содержание Th1 не вызывает EAU [51]. Последующие исследования показали, что экспансия Th1 при EAU приводит к снижению активности Th17-клеток путем IFN γ /STAT1-зависимой экспрессии цитокина IL-27, обладающего иммуносупрессивными свойствами [2]. Примечательно, что участие Th17-клеток в развитии аутоиммунных заболеваний человека впервые было показано при исследовании больных увеитами и склеритами. У пациентов с активным увеитом, склеритом в ПК крови обнаружено повышение содержания Th17-лимфоцитов, ассоциированное с увеличением IL-2 [2].

Органоспецифические аутоиммунные заболевания, такие как увеит и рассеянный склероз, характеризуются циклами ремиссий и обострений. Было неясно, где депонируются аутореактивные Т-клетки памяти, которые инициируют рецидив заболевания. Ситуация прояснилась

после изучения результатов мониторинга IRBP-специфических аутореактивных Т-клеток памяти (IL-7R α ^{High}Ly6C^{High}CD4⁺) в течение 6 месяцев на модели экспериментального хронического увеита. Было показано, что увеитогенные Т-клетки перемещаются из сетчатки и периферических лимфоидных тканей в костный мозг (КМ) [69]. Аутореактивные Т-клетки памяти находились в состоянии покоя в костном мозге и при повторной стимуляции превращались в эффекторные клетки Th1(IL7R α ^{Low}Ly6C^{Low}CD4⁺). Примечательно, что трансплантация клеток ВМ от мышей WT EAU инициировала увеит наивным мышам, тогда как IRBP-специфические аутореактивные Т-клетки памяти мышей CD4-STAT3KO не могли перемещаться в ВМ и введение клеток интактным мышам не приводило к развитию EAU [69]. Эти исследования позволяют считать костный мозг как нишу для IRBP-специфических Т-клеток памяти, которые вызывают рецидивирующий увеит. Можно предполагать, что стромальные клетки ВМ передают сигналы выживания аутореактивным Т-клеткам памяти посредством STAT3-зависимых механизмов [69]. Таким образом, анализ результатов иммунологических исследований на модели увеита у мыши и периферической крови пациентов с увеитом человека выявил патогенетическую роль Th17-лимфоцитов и активатора транскрипции STAT3 в развитии аутоиммунного увеита и сигнальный белок STAT3 является потенциальной терапевтической мишенью при неинфекционном увеите.

Традиционно, после завершения обзора, следовало определить настоящее и будущее в лечении АУ. Однако эта интригующая проблема требует отдельного и более тщательного рассмотрения. Введение в проблему заинтересованный читатель может найти в обзорах [17, 75].

Заключение

Последние достижения в области изучения иммунопатологии заболеваний глаза привели к более глубокому пониманию роли и механизмов влияния образа жизни как факторов риска развития ИУ, роли изменений клеток иммунной системы и их медиаторов, составляющих основу предрасположенности к увеиту и его патогенеза. Исследования факторов образа жизни позволили определить современную стратегию ведения больных с ИУ, включающую отказ от курения, регулярную физическую активность, соблюдение индивидуальной противовоспалительной диеты и оптимизацию функции микробиома кишечника, которая позволяет минимизировать риски развития болезни и ее неблагоприятного течения. Генетически модифицированные линии мышей с целевой делецией или гиперэкспрес-

сией факторов транскрипции, регуляторных белков или цитокинов, которые контролируют развитие или функции лимфоцитов, привели к идентификации ключевых механизмов, регулирующих развитие увеита. Ряд исследований позволяют считать костный мозг как нишу для IRBP-специфических Т-клеток памяти, которые вызывают рецидивирующий увеит. Предполагается, что стромальные клетки костного мозга передают сигналы выживания аутореактивным Т-клеткам памяти посредством STAT3-зависимых механизмов. Таким образом, анализ результатов иммунологических исследований на

модели увеита у мыши и периферической крови пациентов с увеитом человека выявил патогенетическую роль Th17-лимфоцитов и активатора транскрипции STAT3 в развитии аутоиммунного увеита и сигнальный белок STAT3 является потенциальной терапевтической мишенью при неинфекционном увеите. Результаты этих исследований открыли новые возможности для разработки таргетной терапии, доклинические и клинические испытания которой внушают оптимизм в отношении более эффективного лечения этого грозного семейства заболеваний.

Список литературы / References

1. Agron E., Mares J., Clemons T.E., Swaroop A., Chew E.Y., Keenan T.D.L. Dietary nutrient intake and progression to late age-related macular degeneration in the age-related eye disease studies 1 and 2. *Ophthalmology*, 2021, Vol. 128, no. 3, pp. 425-442.
2. Amadi-Obi A., Yu C.R., Liu X., Mahdi R.M., Clarke G.L., Nussenblatt R.B. T(H)17 cells contribute to uveitis and scleritis and are expanded by IL-2 and inhibited by IL-27/STAT1. *Nat. Med.*, 2007, Vol. 13, no. 6, pp. 711-718.
3. Braniste V., Al-Asmakh M., Kowal C., Anuar F., Abbaspour A., Toth M., Korecka A., Bakocovic N., Ng L.G., Kundu P., Gulyás B., Halldin C., Hultenby K., Nilsson H., Hebert H., Volpe B.T., Diamond B., Pettersson S. The gut microbiota influences blood-brain barrier permeability in mice. *Sci. Transl. Med.*, 2014, Vol. 6, no. 263, 263ra158. doi: 10.1126/scitranslmed.3009759.
4. Broekhuysen R.M., Kuhlmann E.D., Winkens H.J. Experimental Autoimmune Anterior Uveitis (EAAU). III. Induction by immunization with purified uveal and skin melanins. *Exp. Eye. Res.*, 1993, Vol. 56, no. 5 pp. 575-583.
5. Broekhuysen R.M., Kuhlmann E.D., Winkens H.J., Van Vugt A.H. Experimental Autoimmune Anterior Uveitis (EAAU), a new form of experimental uveitis. I. Induction by a detergent-insoluble, intrinsic protein fraction of the retinal pigment epithelium. *Exp. Eye. Res.*, 1991, Vol. 52, no. 4, pp. 465-474.
6. Carrera-Bastos P., O'Keefe F., Lindeberg C. The western diet and lifestyle and diseases of civilization. *Res. Rep. Clin. Cardiol.*, 2011, Vol. 2011, no. 2, pp. 15-35.
7. Caspi R.R., Grubbs B.G., Chan C.C., Chader G.J., Wiggert B. Genetic control of susceptibility to experimental autoimmune uveoretinitis in the mouse model. Concomitant regulation by MHC and non-MHC Genes. *J. Immunol.*, 1992, Vol. 148, no. 8, pp. 2384-2389.
8. Caspi R.R., Roberge F.G., Chan C.C., Wiggert B., Chader G.J., Rozenszajn L.A., Lando Z., Nussenblatt R.B. A new model of autoimmune disease. Experimental autoimmune uveoretinitis induced in mice with two different retinal antigens. *J. Immunol.*, 1988, Vol. 140, no. 5, pp. 1490-1495.
9. Chaiwang N., Poyomtip T. Microbial dysbiosis and microbiota-gut-retina axis: the lesson from brain neurodegenerative diseases to primary open-angle glaucoma pathogenesis of autoimmunity. *Acta. Microbiol. Immunol. Hung.*, 2019, Vol. 66, no. 4, pp. 541-558.
10. Chang K., Yang S.M., Kim S.H., Han K.H., Park S.J., Shin J.I. Smoking and rheumatoid arthritis. *Int. J. Mol. Sci.*, 2014, Vol. 15, no. 12, pp. 22279-22295.
11. Chen E.J., Bin Ismail M.A., Mi H., Ho S.L., Lim W.K., Teoh S.C. Ocular autoimmune systemic inflammatory infectious study (OASIS) – report 1: epidemiology and classification. *Ocul. Immunol. Inflamm.*, 2018, Vol. 26, no. 5, pp. 732-746.
12. Chimenti M.S., Perricone C., Novelli L., Caso F., Costa L., Bogdanos D. Interaction between microbiome and host genetics in psoriatic arthritis. *Autoimmun. Rev.*, 2018, Vol. 17, no. 3, pp. 276-283.
13. Chiu C.J., Chang M.L., Zhang F.F., Li T., Gensler G., Schleicher M. The relationship of major American dietary patterns to age-related macular degeneration. *Am. J. Ophthalmol.*, 2014, Vol. 158, no. 1, pp. 118-127.e1.
14. Consolandi C., Turroni S., Emmi G., Severgnini M., Fiori J., Peano C. Behçet's syndrome patients exhibit specific microbiome signature. *Autoimmun. Rev.*, 2015, Vol. 14, no. 4, pp. 269-276.
15. Cua D.J., Sherlock J., Chen Y., Murphy C.A., Joyce B., Seymour B. Interleukin-23 Rather Than interleukin-12 is the Critical Cytokine for Autoimmune Inflammation of the Brain. *Nature*, 2003, Vol. 421, no. 6924, pp. 744-748.
16. du Teil Espina M., Gabarrini G., Harmsen H.J.M., Westra J., van Winkelhoff A.J., van Dijk J.M. Talk to your gut: the oral-gut microbiome axis and its immunomodulatory role in the etiology of rheumatoid arthritis. *FEMS Microbiol. Rev.*, 2019, Vol. 43, no. 1, pp. 1-18.
17. Ekwuagu C.E., Alhakeem S.A., Mbanefo E.C. Uveitis: molecular pathogenesis and emerging therapies. *Front. Immunol.*, 2021, Vol. 12, 623725. doi: 10.3389/fimmu.2021.623725.

18. Egwuagu C.E., Charukamnoetkanok P., Gery I. Thymic expression of autoantigens correlates with resistance to autoimmune disease. *J. Immunol.*, 1997, Vol. 159, no. 7, pp. 3109-3112.
19. Egwuagu C.E., Szein J., Mahdi R.M., Li W., Chan C.C., Smith J.A., Chepelinsky A.B. IFN-gamma increases the severity and accelerates the onset of experimental autoimmune uveitis in transgenic rats. *J. Immunol.*, 1999, Vol. 162, no. 5, pp. 10-17.
20. Eriş E., Aydın E., Özçift S.G. The effect of the smoking on choroidal thickness, central macular vascular and optic disc perfusion. *Photodiagnosis Photodyn. Ther.*, 2019, Vol. 28, pp. 142-145.
21. Forrester J.V., McMenamin P.G., Dando S.J. CNS infection and immune privilege. *Nat. Rev. Neurosci.*, 2018, Vol. 19, no. 11, pp. 655-671.
22. Foster C.S., Kothari S., Anesi S.D., Vitale A.T., Chu D., Metzinger J.L. The ocular immunology and uveitis foundation preferred practice patterns of uveitis management. *Surv. Ophthalmol.*, 2016, Vol. 61, no. 1, pp. 1-17.
23. Franzosa E. A., Sirota-Madi A., Avila-Pacheco J., Fornelos N., Haiser H.J., Reinker S. Gut microbiome structure and metabolic activity in inflammatory bowel disease. *Nat. Microbiol.*, 2018, Vol. 4, no. 2, pp. 293-305.
24. Furman D., Campisi J., Verdin E., Carrera-Bastos P., Targ S., Franceschi C. Chronic inflammation in the etiology of disease across the life span. *Nat. Med.*, 2019, Vol. 25, no. 12, pp. 1822-1832.
25. Gery I., Egwuagu C.E. Central tolerance mechanisms in control of susceptibility to autoimmune uveitic disease. *Int. Rev. Immunol.*, 2002, Vol. 21, no. 2-3, pp. 89-100.
26. Gery I., Wiggert B., Redmond T. M., Kuwabara T., Crawford M.A., Vistica B.P. Uveoretinitis and pinealitis induced by immunization with interphotoreceptor retinoid-binding protein. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 1986, Vol. 27, no. 8, pp. 1296-1300.
27. Gocho K., Kondo I., Yamaki K. Identification of autoreactive T cells in vogt-koyanagi-harada disease. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 2001, Vol. 42, no. 9, pp. 2004-2009.
28. Gomes J.P., Watad A., Shoenfeld Y. Nicotine and autoimmunity: the lotus' flower in tobacco. *Pharmacol. Res.*, 2018, Vol. 128, pp. 101-109.
29. Goncalves R.B., Coletta R.D., Silverio K.G., Benevides L., Casati M.Z., da Silva J.S. Impact of smoking on inflammation: overview of molecular mechanisms. *Inflamm. Res.*, 2011, Vol. 60, no. 5, pp. 409-424.
30. González M.M., Solano M.M., Porco T.C., Oldenburg C.E., Acharya N.R., Lin S.C. Epidemiology of uveitis in a US population-based study. *J. Ophthalmic. Inflamm. Infect.*, 2018, Vol. 8, no. 1, 6. doi: 10.1186/s12348-018-0148-5.
31. Gritz D.C., Wong I.G. Incidence and prevalence of uveitis in Northern California; the Northern California epidemiology of uveitis study. *Ophthalmology*, 2004, Vol. 111, no. 3, pp. 491-500.
32. Hallal P.C., Andersen L.B., Bull F.C., Guthold R., Haskell W., Ekelund U. Global physical activity levels: surveillance progress, pitfalls, and prospects. *Lancet*, 2012, Vol. 380, no. 9838, pp. 247-257.
33. Ham D.I., Fujimoto C., Gentleman S., Chan C.C., Yu C.R., Yu S. The level of thymic expression of RPE65 inversely correlates with its capacity to induce Experimental Autoimmune Uveitis (EAU) in different rodent strains. *Exp. Eye Res.*, 2006, Vol. 83, pp. 897-902.
34. Hanyuda A., Rosner B.A., Wiggs J.L., Willett W.C., Tsubota K., Pasquale L.R., Kang J.H. Low-carbohydrate-diet scores and the risk of primary open-angle glaucoma: data from three US cohorts. *Eye*, 2020, Vol. 34, no. 8, pp. 1465-1475.
35. Heissigerova J., Seidler Stangova P., Klimova A., Svozilkova P., Hrnčíř T., Stepankova R. The microbiota determines susceptibility to experimental autoimmune uveoretinitis. *J. Immunol. Res.*, 2016, Vol. 2016, 5065703. doi: 10.1155/2016/5065703.
36. Hogquist K.A., Baldwin T.A., Jameson S.C. Central tolerance: learning self-control in the thymus. *Nat. Rev. Immunol.*, 2005, Vol. 5, no. 10, pp. 772-782.
37. Horai R., Caspi R.R. Microbiome and autoimmune uveitis. *Front. Immunol.*, 2019, Vol. 10, 232. doi: 10.3389/fimmu.2019.00232.
38. Horai R., Silver P.B., Chen J., Agarwal R.K., Chong W.P., Jittayasothorn Y. Breakdown of immune privilege and spontaneous autoimmunity in mice expressing a transgenic T cell receptor specific for a retinal autoantigen. *J. Autoimmun.*, 2013, Vol. 44, pp. 21-33.
39. Horai R., Zárate-Bladés C.R., Dillenburg-Pilla P., Chen J., Kielczewski J.L., Silver P.B. Microbiota-dependent activation of an autoreactive T cell receptor provokes autoimmunity in an immunologically privileged site. *Immunity*, 2015, Vol. 43, no. 2, pp. 343-353.
40. Huang X., Ye Z., Cao Q., Su G., Wang Q., Deng J., Zhou C., Kijlstra A., Yang P. Gut microbiota composition and fecal metabolic phenotype in patients with acute anterior uveitis. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 2018, Vol. 59, no. 3, pp. 1523-1531.
41. Jangi S., Gandhi R., Cox L.M., Li N., von Glehn F., Yan R., Patel B., Mazzola M.A., Liu S., Glanz B.L., Cook S., Tankou S., Stuart F., Melo K., Nejad P., Smith K., Topçuoğlu B.D., Holden J., Kivisäkk P., Chitnis T., de Jager P.L., Quintana FJ, Gerber G.K., Bry L., Weiner H.L. Alterations of the human gut microbiome in multiple sclerosis. *Nat. Commun.*, 2016, Vol. 7, no. 1, 12015. doi: 10.1038/ncomms12015.
42. Jayasudha R., Kalyana Chakravarthy S., Sai Prashanthi G., Sharma S., Tyagi M., Shivaji S.. Implicating dysbiosis of the gut fungal microbiome in uveitis, an inflammatory disease of the eye. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 2019, Vol. 60, no. 5, pp. 1384-1393.

43. Jha P., Sohn J.H., Xu Q., Nishihori H., Wang Y., Nishihori S. The complement system plays a critical role in the development of experimental autoimmune anterior uveitis. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 2006, Vol. 47, no. 3, pp. 1030-1038.
44. Kawazoe Y., Sugita S., Keino H., Yamada Y., Imai A., Horie S. Retinoic acid from retinal pigment epithelium induces T regulatory cells. *Exp. Eye. Res.*, 2012, Vol. 94, no. 1, pp. 32-40.
45. Kim S.H., Burton J., Yu C.R., Sun L., He C., Wang H., Morse H.C., Egwuagu C.E. Dual function of the IRF8 transcription factor in autoimmune uveitis: loss of IRF8 in T cells exacerbates uveitis, whereas irf8 deletion in the retina confers protection. *J. Immunol.*, 2015, Vol. 195, no. 4, pp. 1480-1488.
46. Klein L., Klugmann M., Nave K.A., Tuohy V.K., Kyewski B. Shaping of the autoreactive T-cell Repertoire by a splice variant of self protein expressed in thymic epithelial cells. *Nat. Med.*, 2000, Vol. 6, no. 1, pp. 56-61.
47. Krishna U., Ajanaku D., Denniston A.K., Gkika T. Uveitis: a sight-threatening disease which can impact all systems. *Postgrad. Med. J.*, 2017, Vol. 93, no. 1106, pp. 766-773.
48. Kronenberg M., Rudensky A. Regulation of immunity by self-reactive T cells. *Nature*, 2005, Vol. 435, no. 7042, pp. 598-604.
49. Kruk J., Kubasik-Kladna K., Aboul-Enein Y.H. The role oxidative stress in the pathogenesis of eye diseases: current status and a dual role of physical activity. *Mini Rev. Med. Chem.*, 2015, Vol. 16, no. 3, pp. 241-257.
50. Lin P., Loh A.R., Margolis T.P., Acharya N.R. Cigarette smoking as a risk factor for uveitis. *Ophthalmology*, 2010, Vol. 117, no. 3, pp. 585-590.
51. Liu X., Lee Y.S., Yu C.R., Egwuagu C.E. Loss of STAT3 in CD4⁺ T cells prevents development of experimental autoimmune diseases. *J. Immunol.*, 2008, Vol. 180, no. 9, pp. 6070-6076.
52. London N.J.S., Rathinam S.R., Cunningham E.T. The epidemiology of uveitis in developing countries. *Int. Ophthalmol. Clin.*, 2010, Vol. 50, no. 2, 1-17.
53. Love P.E., Bhandoola A. Signal integration and crosstalk during thymocyte migration and emigration. *Nat. Rev. Immunol.*, 2011, Vol. 11, no. 7, pp. 69-77.
54. Luger D., Caspi R.R. New perspectives on effector mechanisms in uveitis. *Semin. Immunopathol.*, 2008, Vol. 30, pp. 135-143.
55. Malek Mahdavi A., Khabbazi A., Yaaghoobian B., Ghojzadeh M., Agamohammadi R., Kheyrollahiyan A. Cigarette smoking and risk of Behcet's disease: a propensity score matching analysis. *Mod. Rheumatol.*, 2019, Vol. 29, no. 4, pp. 633-639.
56. McAllister C.G., Wiggert B., Chader G.J., Kuwabara T., Gery I. Uveitogenic potential of lymphocytes sensitized to interphotoreceptor retinoid-binding protein. *J. Immunol.*, 1987, Vol. 138, no. 5, pp. 1416-1420.
57. McMenamin P.G., Crewe J. Endotoxin-induced uveitis. Kinetics and phenotype of the inflammatory cell infiltrate and the response of the resident tissue macrophages and dendritic cells in the iris and ciliary body. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 1995, Vol. 36, no. 10, pp. 1949-1959.
58. Medawar P.B. Immunity to homologous grafted skin; the fate of skin homografts transplanted to the brain, to subcutaneous tissue, and to the anterior chamber of the eye. *Br. J. Exp. Pathol.*, 1948, Vol. 29, no. 1, pp. 58-69.
59. Medawar P.B. Immunological Tolerance. *Science*, 1961, Vol. 133, no. 3449, pp. 303-306.
60. Miller F.W., Alfredsson L., Costenbader K.H., Kamen D.L., Nelson L.M., Norris J.M. Epidemiology of environmental exposures and human autoimmune diseases: findings from a national institute of environmental health sciences expert panel workshop. *J. Autoimmun.*, 2012, Vol. 39, no. 4, pp. 259-271.
61. Miserocchi E., Fogliato G., Modorati G., Bandello F. Review on the worldwide epidemiology of uveitis. *Eur. J. Ophthalmol.*, 2013, Vol. 23, no. 5, pp. 705-717.
62. Mölzer C., Heissigerova J., Wilson H.M., Kuffova L., Forrester J.V. Immune Privilege: The Microbiome and Uveitis. *Front. Immunol.*, 2020, Vol. 11, 608377. doi: 10.3389/fimmu.2020.608377.
63. Mueller C., Macpherson A.J. Layers of mutualism with commensal bacteria protect us from intestinal inflammation. *Gut*, 2006, Vol. 55, no. 2, pp. 276-284.
64. Muhammad F.Y., Peters K., Wang D., Lee D.J. Exacerbation of autoimmune uveitis by obesity occurs through the melanocortin 5 receptor. *J. Leukoc. Biol.*, 2019, Vol. 106, no. 4, pp. 879-887.
65. Nakamura Y.K., Metea C., Kars J., Jansson J.K., Rosenbaum J.T., Lin P. Gut microbial alterations associated with protection from autoimmune uveitis. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 2016, Vol. 57, no. 8, pp. 3747-3758.
66. Nita M., Grzybowski A. Smoking and eye pathologies. a systemic review. Part. I., Anterior eye segment pathologies. *Curr. Pharma. Des.*, 2017, Vol. 23, no. 4, 629-638.
67. Nussenblatt R.B. The Natural History of Uveitis. *Int. Ophthalmol.*, 1990, Vol. 14, no. 5-6, pp. 303-308.
68. Nussenblatt R.B., Mittal K.K., Ryan S., Green W.R., Maumenee A.E. Birdshot Retinochoroidopathy Associated With HLA-A29 Antigen and Immune Responsiveness to Retinal s-Antigen. *Am. J. Ophthalmol.*, 1982, Vol. 94, no. 2, pp. 147-158.
69. Oh H.M., Yu C.R., Lee Y., Chan C.C., Maminishkis A., Egwuagu C.E. Autoreactive memory CD4⁺ T lymphocytes that mediate chronic uveitis reside in the bone marrow through STAT3-dependent mechanisms. *J. Immunol.*, 2011, Vol. 187, no. 6, pp. 3338-3346.
70. Oladipupo F.O., Yu C.R., Olumuyide E., Jittaysothorn Y., Choi J.K., Egwuagu C.E. STAT3 Deficiency in B Cells Exacerbates Uveitis by Promoting Expansion of Pathogenic Lymphocytes and Suppressing Regulatory B Cells (Bregs) and Tregs. *Sci. Rep.*, 2020, Vol. 10, no. 1, 16188. doi: 10.1038/s41598-020-73093-1.

71. Parks C.G., Miller F.W., Pollard K.M., Selmi C., Germolec D., Joyce K., Expert panel workshop consensus statement on the role of the environment in the development of autoimmune disease. *Int. J. Mol. Sci.*, 2014, Vol. 15, no. 8, pp. 14269-1497.
72. Prummel M.F., Wiersinga W.M. Smoking and risk of Graves' disease. *JAMA*, 1993, Vol. 269, no. 4, pp. 479-482.
73. Pugliese A., Zeller M., Fernandez A. Jr., Zalcberg L.J., Bartlett R.J., Ricordi C., Pietropaolo M., Eisenbarth G.S., Bennett S.T., Patel D.D. The insulin gene is transcribed in the human thymus and transcription levels correlated with allelic variation at the INS Vntr-IDDM2 susceptibility locus for type 1 diabetes. *Nat. Genet.*, 1997, Vol. 15, no. 3, pp. 293-297.
74. Rathinam S.R., Krishnadas R., Ramakrishnan R., Thulasiraj R.D., Tielsch J.M., Katz J. Population-based prevalence of uveitis in Southern India. *Br. J. Ophthalmol.*, 2011, Vol. 95, no. 4, pp. 463-467.
75. Reddy A., Muhammad F., Lee D.J. Biological Therapies that Target Inflammatory Cytokines to Treat Uveitis. In: Rodriguez-Garcia A., Stephen Foster C. (eds.). *Advances in the Diagnosis and Management of Uveitis*. IntechOpen; 2019. Available at: <https://www.intechopen.com/chapters/64592>.
76. Rinninella E., Mele M.C., Merendino N., Cintoni H., Anselmi G., Caporossi A. The role of diet, micronutrients and the gut microbiota in age-related macular degeneration: new perspectives from the gut(-) retina axis. *Nutrients*, 2018, Vol. 10, no. 11, 1677. doi: 10.3390/nu10111677.
77. Roep B.O. Autoreactive T cells in endocrine/organ-specific autoimmunity: why has progress been so slow? *Springer Semin. Immunopathol.*, 2002, Vol. 24, no. 3, pp. 261-271.
78. Roesel M., Rüttig A., Schumacher C., Heinz C., Heiligenhaus A. Smoking complicates the course of non-infectious uveitis. *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.*, 2011, Vol. 249, no. 6, pp. 903-907.
79. Rosenbaum J.T., Asquith M. The microbiome and HLA-B27-associated acute anterior uveitis. *Nat. Rev. Rheumatol.*, 2018, Vol. 14, no. 12, pp. 704-713.
80. Rosenbaum J.T. New developments in uveitis associated with HLA B27. *Curr. Opin. Rheumatol.*, 2017, Vol. 29, no. 4, pp. 298-303.
81. Rosenbaum J.T., McDevitt H.O., Guss R.B., Egbert P.R. Endotoxin-induced uveitis in rats as a model for human disease. *Nature*, 1980, Vol. 286, no. 5773, pp. 611-613.
82. Rowan S., Jiang S., Korem T., Szymanski J., Chang M.L., Szelog J., Cassalman C., Dasuri K., McGuire C., Nagai R., Du X.L., Brownlee M., Rabbani N., Thornalley P.J., Baleja J.D., Deik A.A., Pierce K.A., Scott J.M., Clish C.B., Smith D.E., Weinberger A., Avnit-Sagi T., Lotan-Pompan M., Segal E., Taylor A. Involvement of a gut-retina axis in protection against dietary glycemia-induced age-related macular degeneration. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 2017, Vol. 114, no. 22, pp. E4472-E4481.
83. Sharif K., Watad A., Bragazzi N.L., Lichtbroun M., Amital H., Shoenfeld Y. Physical activity and autoimmune diseases: get moving and manage the disease. *Autoimmun. Rev.*, 2018, Vol. 17, no. 1, pp. 53-72.
84. Shoda H., Yanai R., Yoshimura T., Nagai T., Kimura K., Sobrin L. Dietary omega-3 fatty acids suppress experimental autoimmune uveitis in association with inhibition of Th1 and Th17 cell function. *PLoS One*, 2015, Vol. 10, no. 9, e0138241. doi: 10.1371/journal.pone.0138241.
85. Sizmaz S., Küçükerdönmez C., Pinarci E.Y., Karalezli A., Canan H., Yilmaz G. The effect of smoking on choroidal thickness measured by optical coherence tomography. *Br. J. Ophthalmol.*, 2013, Vol. 97, no. 5, pp. 601-604.
86. Spencer S.P., Fragiadakis G.K., Sonnenburg J.L. Pursuing human-relevant gut microbiota immune interactions. *Immunity*, 2019, Vol. 51, no. 2, pp. 225-239.
87. Speyer C.B., Costenbader K.H. Cigarette smoking and the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Expert Rev. Clin. Immunol.*, 2018, Vol. 14, no. 6, pp. 481-487.
88. Takase H., Yu C.R., Mahdi R.M., Douek D.C., Dirusso G.B., Midgley F.M. Thymic expression of peripheral tissue antigens in humans: a remarkable variability among individuals. *Int. Immunol.* 2005, Vol. 17, no. 8, pp. 1131-1140.
89. Tarrant T.K., Silver P.B., Chan C.C., Wiggert B., Caspi R.R. Endogenous IL-12 is required for induction and expression of experimental autoimmune uveitis. *J. Immunol.*, 1998, Vol. 161, no. 1, pp. 122-127.
90. Tarrant T.K., Silver P.B., Wahlsten J.L., Rizzo L.V., Chan C.C., Wiggert B. Interleukin 12 protects from a T Helper Type 1-mediated autoimmune disease, experimental autoimmune uveitis, through a mechanism involving interferon gamma, nitric oxide, and apoptosis. *J. Exp. Med.*, 1999, Vol. 189, no. 2, pp. 219-230.
91. Thompson A.J., Baranzini S.E., Geurts J., Hemmer B., Ciccarelli O. Multiple sclerosis. *Lancet*, 2018, Vol. 391, no. 10130, pp. 1622-1636.
92. Thornburn A.N., Macia L., Mackay C.R. Diet, metabolites, and "western-lifestyle" inflammatory diseases. *Immunity*, 2014, Vol. 40, no. 6, pp. 833-842.
93. Thorne J.E., Daniel E., Jabs D.A., Kedhar S.R., Peters G.B., Dunn J.P. Smoking as a risk factor for cystoid macular edema complicating intermediate uveitis. *Am. J. Ophthalmol.*, 2008, Vol. 145, no. 5, pp. 841-846.
94. Thorne J.E., Suhler E., Skup M., Tari S., Macaulay D., Chao J. Prevalence of noninfectious uveitis in the United States: a claims-based analysis. *JAMA Ophthalmol.*, 2016, Vol. 134, no. 11, pp. 1237-1245.
95. Trujillo-Vargas C.M., Schaefer L., Alam J., Pflugfelder S.C., Britton R.A., de Paiva C.S. The gut-eye-lacrimal gland-microbiome axis in Sjögren Syndrome. *Ocul. Surf.*, 2020, Vol. 18, no. 2, pp. 335-344.

96. Uchi S.H., Yanai R., Kobayashi M., Hatano M., Kobayashi Y., Yamashiro C. Dendritic cells mediate the anti inflammatory action of omega-3 long-chain polyunsaturated fatty acids in experimental autoimmune uveitis. *PLoS One*, 2019, Vol. 14, no. 7, e0219405. doi: 10.1371/journal.pone.0219405.
97. van Kooij B., Probst K., Fijnheer R., Roest M., deLoos W., Rothova A. Risk factors for cystoid macular oedema in patients with uveitis. *Eye*, 2008, Vol. 22, no. 2, pp. 256-260.
98. Versini M, Jeandel P.Y., Rosenthal E, Shoenfeld Y. Obesity in autoimmune diseases: not a passive bystander. *Autoimmun. Rev.*, 2014, Vol. 13, no. 9, pp. 981-1000.
99. Vignali D.A., Kuchroo V.K. IL-12 family cytokines: immunological playmakers. *Nat. Immunol.*, 2012, Vol. 13, no. 8, pp. 722-728.
100. Wacker W.B., Donoso L.A., Kalsow C.M., Yankeelov J.A. Jr., Organisciak D.T. Experimental allergic uveitis. Isolation, characterization, and localization of a soluble uveitopathogenic antigen from bovine retina. *J. Immunol.*, 1977, Vol. 119, no. 6, pp. 1949-1958.
101. Wang X., Wei Y., Xiao H., Liu X., Zhang Y., Han G., Chen G., Hou C., Ma N., Shen B., Li Y., Egwuagu C.E., Wang R.A. A Novel IL-23p19/Ebi3 (IL-39) cytokine mediates inflammation in lupus-like mice. *Eur. J. Immunol.*, 2016, Vol. 46, no. 6, pp. 1343-1350.
102. Wen C., Zheng Z., Shao T., Liu L., Xie Z., Le Chatelier E. Quantitative metagenomics reveals unique gut microbiome biomarkers in ankylosing spondylitis. *Genome Biol.*, 2017, Vol. 18, no. 1, 142. doi: 10.1186/s13059-017-1271-6.
103. Wildner G., Diedrichs-Möhring M. Autoimmune uveitis and antigenic mimicry of environmental antigens. *Autoimmun. Rev.*, 2004, Vol. 3, no. 5, pp. 383-387.
104. Yang P., Wan W., Du L., Zhou Q., Qi J., Liang L., Wang C., Wu L., Kijlstra A. Clinical Features of HLA-B27-positive acute anterior uveitis with or without ankylosing spondylitis in a chinese cohort. *Br. J. Ophthalmol.*, 2018, Vol. 102, no. 2, pp. 215-219.
105. Ye Z., Zhang N., Wu C., Zhang X., Wang Q., Huang X., Du L., Cao Q., Tang J., Zhou C., Hou S., He Y., Xu Q., Xiong X., Kijlstra A., Qin N., Yang P. A metagenomic study of the gut microbiome in Behcet's disease. *Microbiome*, 2018, Vol. 6, no. 1, 135. doi: 10.1186/s40168-018-0520-6.
106. Yu C.R., Hayashi K., Lee Y.S., Mahdi R.M., Shen de F., Chan C.C., Egwuagu C.E. Suppressor of Cytokine Signaling 1 (SOCS1) mitigates anterior uveitis and confers protection against ocular HSV-1 Infection. *Inflammation*, 2015, Vol. 38, no. 2, pp. 555-565.
107. Yuan N., Li J., Tang S., Li F.F., Lee C.O., Cheung C.Y., Tham C.C., Pang C.P., Chen L.J., Yam J.C. Association of secondhand smoking exposure with choroidal thinning in children aged 6 to 8 years: the hong kong children eye study. *JAMA Ophthalmol.*, 2019, Vol. 137, no. 12, pp. 1406-1414.
108. Yuen B.G., Tham V.M., Browne E.N., Weinrib R., Borkar D.S., Parker J.V., Uchida A., Vinoya A.C., Acharya N.R. Association between smoking and uveitis: results from the pacific ocular inflammation study. *Ophthalmology*, 2015, Vol. 122, no. 6, pp. 1257-1261.
109. Zamiri P., Masli S., Kitaichi N., Taylor A.W., Streilein J.W. Thrombospondin plays a vital role in the immune privilege of the eye. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 2005, Vol. 46, no. 3, pp. 908-919.
110. Zamiri P., Masli S., Streilein J.W., Taylor A.W. Pigment epithelial growth factor suppresses inflammation by modulating macrophage activation. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 2006, Vol. 47, no. 9, pp. 3912-3918.
111. Zigler J.S. Jr., Mochizuki M., Kuwabara T., Gery I. Purification of retinal s-antigen to homogeneity by the criterion of gel electrophoresis silver staining. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 1984, Vol. 25, no. 8, pp. 977-980.

Авторы:

Ширинский И.В. — д.м.н., ведущий научный сотрудник, заведующий лабораторией изучения мультиморбидности ревматических заболеваний, Научно-исследовательский институт терапии и профилактической медицины — филиал Федерального исследовательского центра «Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», г. Новосибирск, Россия

Ширинский В.С. — д.м.н., профессор, ведущий научный сотрудник лаборатории изучения мультиморбидности ревматических заболеваний, Научно-исследовательский институт терапии и профилактической медицины — филиал Федерального исследовательского центра «Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», г. Новосибирск, Россия

Authors:

Shirinsky I.V., PhD, MD (Medicine), Leading Research Associate, Head, Laboratory for Studying Multimorbidity of Rheumatic Diseases, Research Institute of Internal and Preventive Medicine, Branch of the Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russian Federation

Shirinsky V.S., PhD, MD (Medicine), Professor, Leading Research Associate, Laboratory for Studying Multimorbidity of Rheumatic Diseases, Research Institute of Internal and Preventive Medicine, Branch of the Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russian Federation

Поступила 30.01.2024
Принята к печати 17.03.2024

Received 30.01.2024
Accepted 17.03.2024

РАСТВОРИМЫЕ МОЛЕКУЛЫ ИММУННЫХ КОНТРОЛЬНЫХ ТОЧЕК: МЕХАНИЗМЫ ОБРАЗОВАНИЯ, ФУНКЦИИ, РОЛЬ ПРИ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ НОВООБРАЗОВАНИЯХ

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

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

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

Резюме. Иммунные контрольные точки (ИКТ) — это обширный комплекс стимулирующих и ингибирующих сигнальных путей, играющих важную роль в точной регуляции иммунных реакций. Традиционно ИКТ считались исключительно связанными с клеточной мембраной системами рецепторов и лигандов, способными запускать или блокировать функционирование иммунных клеток, однако за последнее десятилетие доказано их существование в виде растворимых форм (растворимые молекулы иммунных контрольных точек, или sИКТ). sИКТ — биологически активные регуляторы, участвующие в паракринной и системной модуляции иммунных реакций, подобно цитокинам. В периферической крови здоровых людей присутствуют sИКТ, обладающие свойствами как стимуляторов, так и ингибиторов иммунной системы, и их баланс может нарушаться при многих онкологических заболеваниях, COVID-19, ВИЧ-инфекции. Имеется много данных о связи наличия sИКТ с различными заболеваниями, однако ряд ключевых аспектов их биологии до конца не уточнен. Наиболее широко изучаемыми являются молекулы PD-1 (programmed death receptor-1) и его лиганды PD-L1 и PD-L2, а также CTLA-4 (cytotoxic T lymphocyte antigen-4), TIM-3 (T cell immunoglobulin and mucin-domain containing-3), VISTA (V-domain Ig-containing suppressor of T cell activation). Механизмы образования растворимых форм сложны и разнообразны и включают альтернативный сплайсинг, отщепление мембранных эктодоменов, протеолитическое расщепление. Среди молекулярных механизмов, лежащих в основе синтеза и высвобождения sPD-1 и sPD-L1, наиболее важными являются альтернативный сплайсинг мРНК и трансляция изоформ, лишенных трансмембранных доменов, а образование растворимой формы TIM-3 происходит путем разрезания внеклеточных участков трансмембранных белков посредством протеазы ADAM10. В обзорной статье приведены данные об основных sИКТ, включая sPD-1, sPD-L1, экзосомальный sPD-L1, sCTLA-4 и ряд других. Описаны молекулярные механизмы их образования, биологические функции в поддержании иммунного гомеостаза, а также прогностическое значение изменения их содержания у больных злокачественными новообра-

Адрес для переписки:

Глазанова Татьяна Валентиновна
ФГБУ «Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии Федерального медико-биологического агентства»
191024, Россия, Санкт-Петербург,
ул. 2-я Советская, 16.
Тел.: 8 (812) 309-79-81.
E-mail: tatyana-glazanova@yandex.ru

Address for correspondence:

Tatiana V. Glazanova
Russian Research Institute of Haematology
and Transfusiology
16 2nd Sovetskaya St
St. Petersburg
191024 Russian Federation
Phone: +7 (812) 309-79-81.
E-mail: tatyana-glazanova@yandex.ru

Образец цитирования:

Т.В. Глазанова, И.Е. Павлова, Е.В. Кузьмич, Л.Н. Бубнова «Растворимые молекулы иммунных контрольных точек: механизмы образования, функции, роль при злокачественных новообразованиях» // Медицинская иммунология, 2025. Т. 27, № 1. С. 21-34. doi: 10.15789/1563-0625-SIC-2965

© Глазанова Т.В. и соавт., 2025

Эта статья распространяется по лицензии Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

T.V. Glazanova, I.E. Pavlova, E.V. Kuzmich, L.N. Bubnova "Soluble immune checkpoint molecules: mechanism of formation, function, role in malignant neoplasms", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2025, Vol. 27, no. 1, pp. 21-34. doi: 10.15789/1563-0625-SIC-2965

© Glazanova T.V. et al., 2025

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

DOI: 10.15789/1563-0625-SIC-2965

зованиями (включая немелкоклеточный рак легкого, гепатоцеллюлярный рак, рак молочной железы, рак почки, рак кожи, рак желудка и ряд других), а также при злокачественных заболеваниях системы крови (включая лимфомы, хронический лимфолейкоз, острый миелобластный лейкоз, множественную миелому).

Ключевые слова: растворимые молекулы иммунных контрольных точек, механизм образования, sPD-1, sPD-L1, злокачественные новообразования, злокачественные заболевания системы крови

SOLUBLE IMMUNE CHECKPOINT MOLECULES: MECHANISM OF FORMATION, FUNCTION, ROLE IN MALIGNANT NEOPLASMS

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

^a Russian Research Institute of Haematology and Transfusiology, Federal Medical and Biological Agency, St. Petersburg, Russian Federation

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

Abstract. Immune checkpoints (ICs) represent a broad set of stimulatory and inhibitory signaling pathways playing an important role in regulation of immune responses. Initially, ICs have been considered solely as cell membrane-bound receptor and ligand systems, triggering or blocking immune cell function. Over the past decade they have been proven to exist in soluble forms (sICs). sICs are biologically active regulators involved in paracrine and systemic modulation of immune responses, similar to cytokines. Normally, sICs exert both stimulatory and inhibitory effects on the immune system, and their balance may be disturbed in many malignant neoplasms, COVID-19, HIV infection. There is a lot of data on the connection between sICs and various diseases, but a number of key aspects of their biology have not been fully clarified. The most widely studied are PD-1 (programmed death receptor-1) and its ligands PD-L1 and PD-L2, CTLA-4 (cytotoxic T lymphocyte antigen-4), TIM-3 (T cell immunoglobulin and mucin-domain containing-3), VISTA (V-domain Ig-containing suppressor of T cell activation). The mechanisms of soluble form formation are complex and diverse and include alternative splicing, cleavage of membrane ectodomains, and proteolytic cleavage. The most important molecular mechanisms underlying the synthesis and release of sPD-1 and sPD-L1 are alternative splicing of mRNA and translation of isoforms lacking transmembrane domains, while the formation of sTIM-3 occurs by cleaving the extracellular regions of transmembrane proteins by protease ADAM10. The review article provides data on the main sICs, including sPD-1, sPD-L1, exosomal sPD-L1, sCTLA-4, and several others. The molecular mechanisms of their formation, biological functions in maintaining immune homeostasis, prognostic significance of changes in their content are described in patients with solid malignant tumors (non-small cell lung cancer, hepatocellular cancer, breast cancer, kidney cancer, skin cancer, gastric cancer, etc.), as well as for hematologic malignancies (lymphoma, chronic lymphocytic leukemia, acute myeloblastic leukemia, multiple myeloma).

Keywords: immune checkpoint molecules, soluble, formation mechanism, sPD-1, sPD-L1, malignant neoplasms, hematological malignancies

Иммунные контрольные точки (ИКТ) представляют собой обширный и разнообразный комплекс стимулирующих и ингибирующих сигнальных путей, которые осуществляют точную регулировку иммунных реакций. Молекулы PD-1, CTLA-4 и их лиганды давно привлекли внимание в качестве мишеней противоопухолевой иммунотерапии, другие сигнальные пути контрольных точек также вовлечены в иммунопатогенез заболеваний человека [42, 61, 76].

Традиционно ИКТ считались исключительно связанными с клеточной мембраной системами рецепторов и лигандов, способными запускать или блокировать функционирование иммунных клеток, но за последние годы доказано их существование в виде растворимых форм (растворимые молекулы иммунных контрольных точек или sИКТ). Эти растворимые молекулы являются не просто побочными продуктами протеолитической деградации, но и биологически активными

регуляторами, участвующими в паракринной и системной модуляции иммунных реакций, подобно цитокинам.

Появляется все больше доказательств биологических функций sИКТ, включая регуляцию антибактериального иммунитета, взаимодействие с соответствующими мембранными ИКТ (mИКТ) для регуляции иммунного ответа и конкуренцию с mИКТ за связывание с блокирующими ИКТ антителами, что приводит к снижению эффекта терапии. В периферической крови здоровых людей присутствуют sИКТ, являющиеся как стимуляторами, так и ингибиторами, и их баланс может нарушаться при онкологических заболеваниях, COVID-19, ВИЧ-инфекции, злоупотреблении алкоголем.

Накоплено большое количество данных в пользу наличия связи между sИКТ и различными заболеваниями, при этом ряд ключевых аспектов биологии растворимых контрольных точек до конца не уточнен, в том числе:

- молекулярный механизм, ответственный за их образование (альтернативный сплайсинг, отщепление мембранных эктодоменов, протеолитическое расщепление);
- существование различных изоформ и возможность их обнаружения по отдельности;
- баланс между различными изоформами в норме и при заболеваниях, и специфичность профилей sИКТ для отдельных заболеваний;
- биологическая активность и ее соотношение с активностью соответствующей мембраносвязанной формы;
- молекулярный механизм (механизмы) действия (пути связывания, передача сигнала, образование растворимых комплексов растворимого рецептора с растворимыми лигандами, молекулярные ловушки и т. д.);
- иммуномодулирующие функции рекомбинантных sИКТ.

Изучение этих вопросов важно для уточнения патофизиологических механизмов и последующей разработки терапевтических средств на основе sИКТ.

Работы последних лет по изучению профиля sИКТ у пациентов с хроническим лимфолейкозом (ХЛЛ) [30], немелкоклеточным раком легкого (НМРЛ) [79], алкогольным поражением печени [60, 62], COVID-19 и ВИЧ-инфицированных, людей, страдающих алкоголизмом [35], и при ряде других заболеваний проливают свет на роль и функцию этих молекул.

Наиболее широко известными и изучаемыми являются такие молекулы ИКТ, как PD-1 (programmed death receptor-1) и его лиганды PD-L1 и PD-L2, а также CTLA-4 (cytotoxic T lymphocyte antigen-4), TIM-3 (T cell immunoglobulin and

mucin-domain containing-3), VISTA (V-domain Ig-containing suppressor of T cell activation).

Молекулярные механизмы образования ряда sИКТ в настоящее время широко изучаются, включая данные о генерации различных изоформ. Растворимые изоформы могут иметь разные белковые домены, которые влияют на биологическую активность, т. е. способность связывать соответствующие лиганды или рецепторы. Таким образом, молекулярное разнообразие системы sИКТ дополняется ее функциональным разнообразием. Существование различных изоформ для каждого вида sИКТ, а также растворимых комплексов рецептор-лиганд осложняет интерпретацию результатов их количественного определения. В настоящее время неизвестно, являются ли определяемые молекулярные типы индивидуальными или совокупными изоформами одной и той же sИКТ, или же молекулярными комплексами, образуемыми между растворимыми рецептором и лигандом [63].

Среди молекулярных механизмов, лежащих в основе синтеза и высвобождения sPD-1 и sPD-L1, наиболее важными являются альтернативный сплайсинг мРНК и трансляция изоформ, лишенных трансмембранных доменов, тогда как образование растворимой формы TIM-3 происходит путем разрезания внеклеточных участков трансмембранных белков посредством протеазы (шеддазы) ADAM10. Рядом исследователей показано, что sPD-1 может действовать как иммуностимулятор, в отличие от связанного с мембраной PD-1, тогда как sPD-L1 сохраняет супрессорную активность. Возможность sPD-1 и sPD-L1 действовать в качестве ловушек для терапевтических блокирующих антител имеет значимые последствия в плане устойчивости к иммунотерапии и прогрессирования заболевания. Также описана активная экзосомальная форма PD-L1, играющая роль в иммуносупрессии, и есть вероятность существования других sИКТ в виде внеклеточных везикул, что стирает грань между мембраносвязанными и полностью внеклеточными растворимыми изоформами [50].

Результаты определения с помощью мультиплексного анализа содержания в плазме здоровых доноров крови 16 различных видов sИКТ, показали, что большинство исследованных факторов, в том числе sPD-1, sPD-L1, sCTLA-4, sTIM-3, в каком-либо количестве выявлялись у всех здоровых доноров [8]. В плазме больных онкологическими и рядом других заболеваний также присутствуют растворимые формы многих иммунорегуляторных молекул [13, 19]. В общих чертах, определяющей функцией sИКТ является подавление Т-клеточного ответа [49, 54].

Молекула PD-1 представляет собой трансмембранный гликопротеин I типа, кодируемый геном *Pdcd1* на хромосоме 2 человека. Ген *Pdcd1* содержит пять экзонов (экзоны 1-5), кодирующих короткую сигнальную последовательность, домен иммуноглобулина (Ig), стволовой и трансмембранный домен, короткую последовательность из 12 аминокислот, которая маркирует начало цитоплазматического домена, С-концевые внутриклеточные остатки и длинный сегмент 3'UTR соответственно [28]. Помимо полноразмерного PD-1 (fPD-1), из мононуклеарных клеток периферической крови человека (МПК) клонировано четыре варианта сплайсинга мРНК PD-1: PD-1Deltaex2, PD-1Deltaex3, PD-1Deltaex2/3 и PD-1Deltaex2/3/4. У PD-1Deltaex2 отсутствует экзон 2, кодирующий внеклеточный домен; у PD-1Deltaex2/3 отсутствуют экзоны 2 и 3, кодирующие внеклеточный и трансмембранный домены; у PD-1Deltaex2/3/4 отсутствуют экзоны 2, 3 и 4 и имеется преждевременный стоп-кодон в экзоне 5. Все они не способны связываться с лигандом PD-L1 и передавать ингибирующие сигналы, однако лишь PD-1Deltaex3, у которого отсутствует экзон 3, соответствующий трансмембранному региону PD-1, сохраняет внеклеточный домен Ig и может транслироваться с образованием sPD-1 [49].

PD-L1 представляет собой трансмембранный гликопротеин I типа, кодируемый у человека геном *CD274* на хромосоме 9, включающим семь экзонов [64]. В результате транскрипции этого гена может продуцироваться несколько вариантов сплайсинга PD-L1, включая изоформы сплайсинга длинных некодирующих РНК (lncРНК) PD-L1 и укороченный PD-L1 [21, 58]. Было показано, что sPD-L1 продуцируется в основном за счет экзаципации интронного эндогенного ретротранспозона *LINE-2A* (*L2A*) в гене *CD274*, в результате чего sPD-L1, кодируемый *CD274-L2A*, обладает рецепторно-антагонистическим эффектом [48]. Кроме того, варианты, обогащенные экзоном 4, при различных видах злокачественных новообразований способны продуцировать секретлируемую форму PD-L1, которая связывается с PD-1 и осуществляет негативную регуляцию функций Т-клеток [21]. При этом один из вариантов сплайсинга не включает сплайсинг трансмембранного домена, но секретирует PD-L1 с уникальным «хвостом» из 18 аминокислот. Этот вариант способен превратиться в гомодимер и более эффективно угнетать функцию лимфоцитов [40]. В МПК человека был обнаружен вариант без экзона 2, который кодирует домен IgV, он не был способен связывать PD-1 и генерировать sPD-L1 [22].

sPD-L1 образуется в результате протеолитического расщепления mPD-L1 эндогенными матриксными металлопротеиназами (ММП) [11, 23]. PD-L1/PD-L2, экспрессируемые на фибробластах, могут расщепляться под действием ММП-9 и ММП-13, что приводит к отсутствию PD-1-связывающего домена, тем самым делая обратимым истощение Т-клеток и ограничивая их иммуносупрессорную активность [11]. Члены семейства дезинтегринов и металлопротеиназ (ADAM) также участвуют в отщеплении внеклеточных доменов мембранных молекул [3]. Так, обнаружено, что ADAM10 и ADAM17 отщепляют mPD-L1 на опухолевых клетках и внеклеточных везикулах [65]. В этих процессах могут участвовать и другие ферменты. Различия в механизмах, регулирующих продукцию mPD-L1 и sPD-L1, подтверждаются сведения об образовании и высвобождении sPD-L1 из опухолевых клеток и зрелых ДК, но не из незрелых ДК, Т-клеток, макрофагов и моноцитов, хотя повышенный уровень mPD-L1 отмечен как на миелоидных клетках, так и активированных Т-лимфоцитах [16].

sPD-1 способен угнетать все три вида взаимодействий молекулы PD-1 с лигандами: PD-L1/CD80, PD-L1/PD-1 и PDL2/PD-1 [69]. Ингибция опухолевого роста после переноса гена sPD-1 в места инокуляции опухоли может происходить за счет блокирования процессов взаимодействия PD-L1/PD-1 под действием sPD-1. В одном из исследований, посвященных sPD-1, показано, что его присутствие в опухолевой ткани способствует формированию опухолеспецифического иммунитета. Так, у иммунокомпетентных мышей выраженная инфильтрация опухоли иммунными клетками PD-1⁺, предположительно, была связана с более продолжительной выживаемостью [14].

При комбинировании sPD-1 с другими методами лечения было продемонстрировано усиление противоопухолевого эффекта. Так, результаты исследований при онкологических заболеваниях с использованием комбинации вакцины HSP70 и sPD-1 показали, что sPD-1 может не только блокировать PD-L1, но и снижать экспрессию гена IL-10, являющегося негативным регулятором иммунных процессов [18]. У мышей sPD-1 в комбинации с 4-1BBL (представителем суперсемейства лигандов TNF) снижал экспрессию IL-10 и TGF-β, индуцируя таким образом экспрессию IL-2 и IFNγ и аккумуляцию CD8⁺Т-клеток в тканях опухолевого микроокружения [57].

У пациентов с распространенным раком поджелудочной железы и повышенным уровнем маркера системного воспаления, С-реактивного белка (CRP), наблюдалось повышение уровня sPD-1, однако его связи с худшей общей выжи-

ваемостью (ОВ) не отмечено [29]. В другом же исследовании у пациентов с аденокарциномой поджелудочной железы была показана связь повышения уровня sPD-1 со снижением ОВ [5]. У пациентов с вирусным гепатитом В (ВГВ) более высокое содержание sPD-1 свидетельствовало о вирусной активности ВГВ и риске развития гепатоцеллюлярного рака (ГЦР) [8]. При ГЦР, ассоциированном с ВГВ, отмечались более высокие уровни sPD-1 по сравнению с другими клиническими формами ВГВ, а также низкая ОВ [34]. В ретроспективном анализе пациентов с ГЦР, перенесших радикальную резекцию опухоли, более высокий уровень sPD-1 был связан с улучшением выживаемости без прогрессирования (ВБП) и ОВ [6]. У пациентов с диффузной В-клеточной крупноклеточной лимфомой (ДВККЛ) повышение sPD-1 до начала лечения было связано с худшими прогностическими показателями, такими как возраст (≥ 60 лет), клиническая стадия диссеминации, общий статус (ECOG ≥ 2), повышенный уровень ЛДГ в плазме и наличие ≥ 1 экстранодального очага [46]. Также обнаружена связь повышения sPD-1 с определенным генотипом или фенотипом заболевания. Пациенты с ВГВ с генотипом С и ДВККЛ с фенотипом популяции GCB характеризовались более высокими уровнями sPD-1 [8, 46].

У пациентов с ХЛЛ в присутствии sPD-L1 продукция IFN γ Т-лимфоцитами значительно снижалась. Напротив, лечение антителами против PD-L1 приводит к значительному увеличению выработки IFN γ [36], а совместная инкубация CD4 $^{+}$ или CD8 $^{+}$ Т-клеток с происходящими из ДК клетками-продуцентами sPD-L1, и sPD-L1 запускает апоптоз в Т-клетках [16]. По мере того, как sPD-L1 распространяется по организму с кровью и лимфой, взаимодействуя с мембраносвязанным PD-1, он оказывает выраженный ингибирующий эффект [36].

Как известно, полноценная активация Т-клеток обусловлена специфическим связыванием Т-клеточного рецептора (TCR) с молекулами главного комплекса гистосовместимости (МНС) и взаимодействием CD28 на мембране Т-клеток с костимулирующими молекулами CD80/CD86 на антигенпрезентирующих клетках (АПС). Процесс передачи сигналов PD-1/PD-L1 включает рекрутирование домена гомологии Src 2, содержащего фосфатазы 2 (SHP2), в цитоплазматический домен PD-1, который дефосфорилирует сигнальные молекулы путей PI3K-АКТ и MAPK, тем самым ограничивая Т-клеточную пролиферацию, активацию и выживание. При этом sPD-1 подавляет взаимодействие PD-1 с PD-L1 и PD-L2 и взаимодействие PD-L1 с CD80, однако возможно и обратное сигнальное воздей-

ствие на АПС через путь PD-L1/PD-L2 с угнетением функции Т-клеток. sPD-L1, как и mPD-L1, связывается с PD-1 для передачи негативных регуляторных сигналов [50].

Показано, что димерная форма sPD-L1 обладает более высокой иммуносупрессорной активностью по сравнению с мономерной [40]. Однако влияние sPD-L1 на функцию иммунных клеток может также зависеть от степени родства между sPD-L1 и PD-1. Так, обнаружено, что нативный sPD-L1 угнетает активированные Т-клетки, а клонированные варианты растворимого PD-L1, имеющие более высокое (в 20 и более раз) родство к PD-1 по сравнению с нативным sPD-L1, оказались способны ослаблять ингибирующее влияние оси PD-1 на пролиферацию МПК и продукцию IFN γ [36]. Исследования у беременных показали, что на протяжении всего срока развития плода уровень sPD-L1 в материнской крови повышается, возвращаясь к исходным значениям после родов [15]. В процессе плацентарного развития усиленная продукция sPD-L1 трофобластами может приводить к поляризации макрофагов в сторону фенотипа M2, уменьшая тем самым воспаление. Это может по крайней мере частично подавлять материнский иммунитет и играть роль в иммунной толерантности, что имеет решающее значение для развития плода [53].

Прогностическое значение sPD-1

У 34% пациентов с НМРЛ в процессе лечения ингибитором тирозинкиназы эрлотинибом наблюдалось повышение уровня в сыворотке sPD-1, при этом у таких пациентов отмечалась пролонгированная ВБП и ОВ по сравнению с пациентами без повышения уровня sPD-1 [70]. У пациентов с карциномой носоглотки после лучевой терапии с модулированной интенсивностью уровень sPD-1 также был значительно повышен, при этом у пациентов с высоким уровнем sPD-1 ОВ была больше. Лучевая терапия может усиливать процессы презентации антигена, что увеличивает количество опухолеспецифических Т-лимфоцитов и продукцию sPD-1. Кроме того, экспрессия sPD-1 была значительно выше у пациентов со стадией TNM I/II, чем у пациентов с TNM III/IV [67]. У пациентов с НМРЛ с повышенным или стабильным уровнем sPD-1 после терапии анти-PD-1 антителами также наблюдалась тенденция к благоприятным исходам [43]. Ретроспективное исследование у пациентов с ГЦР, перенесших радикальную резекцию, также показало, что усиление выработки sPD-1 было связано с более длительной ОВ [6]. Механизмы, с помощью которых повышается уровень sPD-1 и улучшается ОВ пациентов после специфического лечения, например, таргетной терапии, луче-

вой терапии и иммунотерапии, до конца не изучены. Возможно, это обусловлено увеличением презентации антигена, восстановлением активности опухолеспецифических цитотоксических Т-клеток и усилением противоопухолевого иммунитета на фоне лечения [71, 72].

При этом существуют данные о том, что повышенный уровень sPD-1 у нелеченых онкологических больных может являться предиктором неблагоприятных исходов в отношении ОВ. Так, показано, что у пациентов с впервые диагностированной аденокарциномой протоков поджелудочной железы концентрация sPD-1 в плазме > 8,6 нг/мл была связана с низкой ОВ (< 6 месяцев) [5]. У пациентов с ДВККЛ уровни sPD-1 до лечения могут являться предикторами неблагоприятных исходов после высокодозной иммуно/химиотерапии и позволяют прогнозировать риск прогрессирования заболевания [66].

У пациентов с ГЦР уменьшение объема опухоли приводило к снижению уровня sPD-1, это предполагает, что первичная опухоль и опухолеспецифические Т-клетки являются основным источником циркулирующего sPD-1 [34]. У пациентов с первичной меланомой низкие уровни sPD-1 в плазме были ассоциированы с высокой активностью инфильтрирующих опухоль лимфоцитов (TIL), средние уровни — с низкой активностью TIL, а высокие уровни — с отсутствием TIL. Это показывает, что вовлеченные в противоопухолевый процесс Т-клетки могут продуцировать больше mPD-1, но низкорастворимые формы и периферические опухолеспецифические Т-клетки могут быть основным источником повышенного содержания sPD-1 [25].

Результаты исследования обширной когорты пациентов с ВГВ показали, что более высокий уровень sPD-1 был предположительно связан с повышенным риском возникновения гепатоцеллюлярного рака [8].

sPD-L1

В целом повышенное содержание sPD-L1 у онкологических больных может свидетельствовать о плохом прогнозе или резистентности к лечению [47, 55]. Так, высокие исходные показатели sPD-L1 были связаны с более низкой ВБП и ОВ у пациентов с раком легкого, получавших ингибиторы ИКТ [9], пациентов с глиомой, получавших лучевую терапию [12], пациентов с местнораспространенным или метастатическим плоскоклеточным раком пищевода, получающих цитотоксическую химиотерапию [17].

Исходно высокий уровень sPD-L1 был связан с повышенной вероятностью прогрессирования заболевания у пациентов со злокачественной меланомой [84], саркомой мягких тканей [1], у пациентов с инвазивным раком мочевого пузы-

ря [75], светлоклеточным почечно-клеточным раком [31], у пациентов с ГЦР, проходящих радикальное лечение [44].

Результаты французского многоцентрового рандомизированного клинического исследования III фазы показали, что у пациентов с ДВККЛ, получавших высокодозную химиотерапию и ритуксимаб, при уровне sPD-L1 выше установленного порогового уровня 1,52 нг/мл прогноз был хуже: 3-летняя ОВ составила 76% по сравнению с 89% у лиц с sPD-L1 ниже порогового значения. При достижении полной ремиссии уровни sPD-L1 возвращались к норме [66]. По данным клинического исследования при злокачественной меланоме ранние изменения уровня sPD-L1 после терапии блокаторами контрольных точек не коррелировали с получаемым клиническим эффектом. Однако возрастание sPD-L1 через 5 месяцев лечения коррелировало с частичным ответом у пациентов, получавших ипилимумаб [87]. Нарастание концентрации sPD-L1 после лечения пембролизумабом также коррелировало с частичным ответом, а высокие уровни до начала лечения — с прогрессированием заболевания. При этом у пациентов с НМРЛ, получавших ниволумаб, более низкие исходные уровни sPD-L1 в плазме были ассоциированы с лучшим клиническим эффектом [52].

У пациентов с гепатоцеллюлярным раком, связанным с ВГВ, экспрессия sPD-L1 была тесно связана с экспрессией PD-L1 на клетках опухоли, а экспрессия PD-1/PD-L1 — с размером опухоли, инвазией кровеносных сосудов и стадией по BCLC (Барселонская система стадирования рака печени) [84]. В исследовании при лимфоме из естественных киллерных клеток/Т-клеточной лимфоме пациенты с высокой концентрацией sPD-L1 в сыворотке ($\geq 3,4$ нг/мл) или с высоким процентом экспрессии mPD-L1 в образцах опухоли ($\geq 38\%$) показали плохой ответ на лечение и худшую ОВ, чем пациенты с более низкой концентрацией или процентом экспрессии этого фактора. По мнению авторов, повышенные концентрация sPD-L1 в сыворотке и экспрессия mPD-L1 в ткани опухоли могут быть независимыми неблагоприятными прогностическими факторами у пациентов с I-II стадией НК/Т-клеточной лимфомы [4]. У пациентов с множественной миеломой (ММ) и низким уровнем sPD-L1 общая частота ответа на терапию была выше, чем у пациентов с высоким уровнем этого маркера ($> 2,78$ нг/мл), что свидетельствует о худшем прогнозе у пациентов с повышением sPD-L1 [24, 78]. Связь повышенного содержания sPD-L1 с плохим прогнозом также продемонстрирована при плоскоклеточном раке полости рта [85], а при лимфоме Ходжкина уровни sPD-L1 положитель-

но коррелировали с клинической стадией [20]. Однако при распространенной аденокарциноме желудка получены результаты о том, что у пациентов с более высокой экспрессией sPD-L1 наблюдался гораздо лучший прогноз и меньшее метастазирование в лимфатические узлы, чем у пациентов с низкой его экспрессией [86].

При почечно-клеточном раке уровень sPD-L1 в крови не коррелировал ни с экспрессией, ни с мРНК PD-L1 в опухолевой ткани, при этом он значительно возрастал после резекции опухоли. Кроме того, уровень sPD-L1 значимо коррелировал с маркером воспаления — CRP и с уровнем мРНК PD-L1 в крови. Эти результаты показывают, что основным источником sPD-L1 могут быть клетки периферической крови, а не mPD-L1 ткани опухоли. При этом наблюдалось возрастание уровня sPD-L1 после резекции опухоли, по сравнению с исходным состоянием: 76 ± 32 пг/мл и 107 ± 32 пг/мл до и после резекции соответственно, $p < 0,0001$, и, напротив, различий в уровнях sPD-1 не было: 1027 ± 1922 пг/мл и 1097 ± 1849 пг/мл до и после резекции соответственно [27].

Кроме того, положительная корреляция между уровнями sPD-1 и sPD-L1 при распространенном раке поджелудочной железы [5] и ГЦР [13] может свидетельствовать об общем происхождении и одновременном высвобождении этих молекул.

экзоPD-L1

Существует также экзосомальная форма внеклеточного PD-L1, экзоPD-L1 [83]. Экзосомы образуются путем двойной инвагинации клеточной мембраны и секретируются во внеклеточное пространство и микроокружение путем экзоцитоза [26], опосредуя межклеточную передачу сигналов и иммунную регуляцию, так как в состав их содержимого входят нуклеиновые кислоты, липиды и белки, которые таким образом транспортируются к клеткам-мишеням [56]. Экзосомы опухолевого происхождения, несущие PD-L1, обладают иммуносупрессорными свойствами, поскольку способны угнетать активацию Т-лимфоцитов, связываясь с PD-1 на мембране Т-клеток [10]. Также экзосомы могут экспрессировать другие ключевые белки, например, молекулы главного комплекса гистосовместимости, которые взаимодействуют с TCR, передают активационные сигналы и таким образом могут опосредовать более сильные иммуносупрессорные эффекты, чем свободные sPD-L1 [82].

Высокие уровни экзоPD-L1 у пациентов с НМРЛ коррелировали с большим размером опухоли ($> 2,5$ см), поздней стадией, метастазами в лимфатические узлы и отдаленными метастазами [32]. Возрастание уровня экзоPD-L1 у пациен-

тов с аденокарциномой протоков поджелудочной железы также коррелировало с плохим прогнозом [37]. Продемонстрирована большая вероятность успешного ответа на лечение у пациентов с метастатической меланомой, у которых наблюдалось более чем 2,5-кратное изменение уровня экзоPD-L1 в процессе иммунотерапии [7]. Считается, что повышение содержания экзоPD-L1 на фоне лечения препаратами, направленными против PD-1, происходит в результате стимуляции вырабатываемого активированными $CD8^+$ Т-клетками $IFN\gamma$ [45]. У пациентов с меланомой положительный ответ на противоопухолевую терапию был ассоциирован со снижением уровня циркулирующего экзоPD-L1, и, напротив, прогрессия заболевания сопровождалась возрастанием уровня экзоPD-L1 [7]. Выявление экзоPD-L1 в сыворотке больных остеосаркомой позволило прогнозировать прогрессирование легочных метастазов [77], а значительно повышенный уровень экзоPD-L1 в плазме может быть биомаркером прогноза исходов выживания у пациентов с ДВККЛ [33].

При распространенном раке желудка до начала первой линии химиотерапии у пациентов с низким уровнем sPD-L1 ($< 9,32$ пг/мл) наблюдалась значительно более высокая ОБ и ВБП, чем у пациентов с высоким уровнем sPD-L1 ($\geq 9,32$ пг/мл). В группе с низким экзоPD-L1 ($< 10,21$ пг/мл) наблюдалась тенденция к более длительной ВБП, чем в группе с высоким экзоPD-L1 ($\geq 10,21$ пг/мл). Таким образом, при раке желудка уровень сывороточного экзоPD-L1 может отражать состояние иммуносупрессии у пациентов с распространенным заболеванием, а содержание sPD-L1 в плазме до начала лечения можно использовать в качестве прогностического маркера для пациентов, получающих цитотоксическую химиотерапию [68].

Другие растворимые молекулы ИКТ: образование и прогностическое значение

CTLA-4 — цитотоксический белок-4, ассоциированный с Т-лимфоцитами, который наряду с PD-1 принадлежит подсемейству CD28/CTLA-4 суперсемейства иммуноглобулинов, является одним из ключевых регуляторов Т-клеточного иммунного ответа. Основным источником sCTLA-4 считаются Т-регуляторные клетки [39]. Подобно поверхностной молекуле CTLA-4, молекулы sCTLA-4 способны связываться с костимулирующими лигандами на антиген-презентирующих клетках, предотвращая соединение с рецептором CD28 на Т-лимфоцитах и подавляя иммунный ответ. Селективная блокада sCTLA-4 активирует пролиферацию периферических $CD8^+$ и $CD4^+$ Т-клеток и способствует увеличению выработки цитокинов, особенно $IFN\gamma$, что в свою очередь

приводит к усилению противоопухолевого эффекта препаратов на основе анти-CTLA-4 моноклональных антител [80].

TIM-3 как ингибиторная контрольная точка, экспрессируемая различными типами иммунных клеток, активно исследуется в (до)клинической разработке в качестве противоопухолевой мишени с множеством моноклональных антител. Растворимая форма, sTIM-3 обнаружена в плазме больных злокачественными новообразованиями и при ряде других заболеваний. Этот циркулирующий белок образуется в результате протеолитического расщепления двумя ADAM металлопротеазами мембранного рецептора, общего для опухолевых и неопухолевых клеток, а также внеклеточных везикул. Причем в отличие от sPD-L1, который образуется при помощи различных протеаз, а также путем альтернативного сплайсинга, sTIM-3 образуется только при ADAM-зависимом отщеплении, являясь таким образом более гомогенной молекулярной единицей и, возможно, более надежным молекулярным маркером [2]. При большинстве видов злокачественных опухолей гиперэкспрессия TIM-3 на клеточной мембране сопровождается высоким уровнем sTIM-3. Повышенные уровни sTIM-3 обнаружены при хронических аутоиммунных заболеваниях, воспалительных заболеваниях желудочно-кишечного тракта, некоторых вирусных и паразитарных заболеваниях, а также после трансплантации органов и при патологических состояниях, связанных с беременностью.

Недавно было показано, что Ig-содержащий V-домен супрессор активации Т-клеток (VISTA), белок, экспрессируемый Т-клетками, распознает галектин-9, секретируемый клетками ОМЛ, в качестве лиганда. Важно отметить, что секретируемый клетками ОМЛ sVISTA усиливает иммуносупрессорный эффект галектина-9, скорее всего, за счет образования мультибелковых комплексов на поверхности Т-клеток и, возможно, создания молекулярного барьера. Эти события вызывают изменения потенциала плазматической мембраны Т-клеток, приводя к активации гранзима В внутри цитотоксических Т-клеток, что в свою очередь приводит к апоптозу [81].

Периферические моноциты человека постоянно выделяют sVISTA, который регулируется матриксными металлопротеиназами, однако стимуляция моноцитов цитокинами, которые индуцируют дифференцировку макрофагов, такими как гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF) и макрофагальный колониестимулирующий фактор (M-CSF), существенно снижает высвобождение sVISTA. На высвобождение sVISTA также влияли различные про- и противовоспалительные

стимулы, которые приводили к поляризации макрофагов, при этом активированные макрофаги M1 обычно высвобождали больше sVISTA, чем макрофаги M2. Кроме того, стимуляция активированных макрофагов липополисахаридом Toll-подобного рецептора 4 приводила к дальнейшему снижению высвобождения sVISTA. Обнаружено, что sVISTA снижает цитотоксическую активность Т-клеток, не вызывая их апоптоза, он также подавляет продукцию IL-2 CD4⁺Т-клетками. Белок VISTA постоянно вырабатывается и выходит в периферическую кровь, где может способствовать формированию периферической толерантности [51].

Результаты комплексной оценки изменений уровня 16 растворимых белков ИКТ у пациентов с ГЦР в процессе лечения сорафенибом (на 1-й, 2-й и 4-й неделе) показали корреляцию между повышенными уровнями sCTLA-4 и sPD-1 [13]. У пациентов с впервые выявленным неметастатическим РМЖ наблюдались подавление как стимулирующих, так и ингибирующих путей действия sИКТ и генерализованная иммуносупрессия, не зависящая от подтипа и распространенности опухоли [59]. У пациентов с НМРЛ на фоне таргетной терапии ингибиторами PD-1/PD-L1 наблюдалась достоверная связь между исходными уровнями sИКТ и клиническими исходами, носящая для различных sИКТ разнонаправленный характер [73].

В другом исследовании у больных НМРЛ с использованием мультиплексного анализа Lumiplex показано, что уровни sPDL2 были достоверно выше при инвазивной аденокарциноме по сравнению с аденокарциномой *in situ*, при этом уровни sPDL1 и sPDL2 достоверно увеличены в общей группе НМРЛ по сравнению с контрольной группой и повышение sPDL2 значимо коррелировало с риском инвазирования заболевания [79].

Результаты изучения содержания sPD1, sPDL1 и sTIM3 методом ИФА у пациентов с меланомой в процессе лечения ингибиторами sИКТ показали корреляцию уровней изученных показателей с ответом на терапию и ВБП, а резистентность к ипилимумабу (анти-CTLA4) в сочетании с ниволумабом была связана с высокими исходными уровнями sPD1, но не sPDL1 или sTIM3. Обе схемы лечения были ассоциированы со значительным повышением уровня sPD1 в сыворотке крови на фоне лечения [38].

В когорте пациентов с базальноклеточной карциномой, наиболее инвазивным и резистентным к лечению вариантом рака кожи, уровни sCTLA-4, sPD-1/sPD-L1 и sTIM-3 были значительно выше нормальных значений, что свидетельствует о наличии значительной системной

иммуносупрессии, при этом наблюдалась выраженная корреляция между sCTLA-4 и sPD-1 [41].

Таким образом, хотя традиционно молекулы иммунных контрольных точек исследовались как связанные с клеточной мембраной системы рецепторов и лигандов, способные запускать или блокировать функционирование иммунных клеток, на настоящий момент накоплено достаточно сведений о том, что они широко представлены в

растворимых формах (сИКТ), и молекулы сИКТ являются биологически активными регуляторами, участвующими в системной модуляции иммунных реакций. Уровень сИКТ в сыворотке крови пациентов с различными злокачественными новообразованиями, в том числе с заболеваниями системы крови, может иметь важное прогностическое значение.

Список литературы / References

1. Asanuma K., Nakamura T., Hayashi A., Okamoto T., Iino T., Asanuma Y., Hagi T., Kita K., Nakamura K., Sudo A. Soluble programmed death-ligand 1 rather than PD-L1 on tumor cells effectively predicts metastasis and prognosis in soft tissue sarcomas. *Sci. Rep.*, 2020, Vol. 10, no. 1, 9077. doi: 10.1038/s41598-020-65895-0.
2. Bailly C., Thuru X., Goossens L., Goossens J.F. Biochemical soluble TIM-3 as a biomarker of progression and therapeutic response in cancers and other of human diseases. *Pharmacology*, 2023, Vol. 209, 115445. doi: 10.1016/j.bcp.2023.115445.
3. Bailly C., Thuru X., Quesnel B. Soluble programmed death ligand-1 (sPD-L1): A pool of circulating proteins implicated in health and diseases. *Cancers (Basel)*, 2021, Vol. 13, no. 12, 3034. doi: 10.3390/cancers13123034.
4. Bi X., Wang H., Zhang W., Wang J., Liu W., Xia Z., Huang H., Jiang W., Zhang Y., Wang L. PD-L1 is upregulated by EBV-driven LMP1 through NF-kappaB pathway and correlates with poor prognosis in natural killer/T-cell lymphoma. *J. Hematol. Oncol.*, 2016, Vol. 9, no. 1, 109. doi: 10.1186/s13045-016-0341-7.
5. Bian B., Fanale D., Dusetti N., Roque J., Pastor S., Chretien A.S., Incorvaia L., Russo A., Olive D., Iovanna J. Prognostic significance of circulating PD-1, PD-L1, pan-BTN3As, BTN3A1 and BTLA in patients with pancreatic adenocarcinoma. *OncolImmunology*, 2019, Vol. 8, no. 4, e1561120. doi: 10.1080/2162402x.2018.1561120.
6. Chang B., Huang T., Wei H., Shen L., Zhu D., He W., Chen Q., Zhang H., Li Y., Huang R., Li W., Wu P. The correlation and prognostic value of serum levels of soluble programmed death protein 1 (sPD-1) and soluble programmed death-ligand 1 (sPD-L1) in patients with hepatocellular carcinoma. *Cancer Immunol. Immunother.*, 2019, Vol. 68, no. 3, pp. 353-363.
7. Chen G., Huang A.C., Zhang W., Zhang G., Wu M., Xu W., Yu Z., Yang J., Wang B., Sun H., Xia H., Man Q., Zhong W., Antelo L.F., Wu B., Xiong X., Liu X., Guan L., Li T., Liu S., Yang R., Lu Y., Dong L., McGettigan S., Somasundaram R., Radhakrishnan R., Mills G., Lu Y., Kim J., Chen Y.H., Dong H., Zhao Y., Karakousis G.C., Mitchell T.C., Schuchter L.M., Herlyn M., Wherry E.J., Xu X., Guo W. Exosomal PD-L1 contributes to immunosuppression and is associated with anti-PD-1 response. *Nature*, 2018, Vol. 560, no. 7718, pp. 382-386.
8. Cheng H., Kang P.J., Chuang Y., Wang Y., Jan M., Wu C., Lin C., Liu C., Liaw Y., Lin S., Chen P., Lee S., Yu M. Circulating programmed death-1 as a marker for sustained high hepatitis B viral load and risk of hepatocellular carcinoma. *PLoS One*, 2014, Vol. 9, no. 11, e95870. doi: 10.1371/journal.pone.0095870.
9. Cheng Y., Wang C., Wang Y., Dai L. Soluble PD-L1 as a predictive biomarker in lung cancer: A systematic review and meta-analysis. *Future Oncol.*, 2022, Vol. 18, no. 2, pp. 261-273.
10. Cordonnier M., Nardin C., Chanteloup G., Derangere V., Algros M.P., Arnould L., Garrido C., Aubin F., Gobbo J. Tracking the evolution of circulating exosomal-pd-l1 to monitor melanoma patients. *J. Extracell. Vesicles*, 2020, Vol. 9, no. 1, 1710899. doi: 10.1080/20013078.2019.1710899.
11. Dezutter-Dambuyant C., Durand I., Alberti L., Bendriss-Vermare N., Valladeau-Guilemond J., Duc A., Magron A., Morel A.-P., Sisirak V., Rodriguez C., Cox D., Olive D., Caux D. A novel regulation of PD-1 ligands on mesenchymal stromal cells through MMP-mediated proteolytic cleavage. *Oncoimmunology*, 2016, Vol. 5, no. 3, e1091146. doi: 10.1080/2162402x.2015.1091146.
12. Ding X., Wang L., Zhu Y., Li Y., Nie S., Yang J., Liang H., Weichselbaum R., Yu J., Hu M. The Change of soluble programmed cell death-ligand 1 in glioma patients receiving radiotherapy and its impact on clinical outcomes. *Front. Immunol.*, 2020, Vol. 11, 580335. doi: 10.3389/fimmu.2020.580335.
13. Dong M., Enomoto M., Le T., Hai H., Hieu V., Hoang D., Iida-Ueno A., Odagiri N., Amano-Teranishi Y., Hagihara A., Fujii H., Uchida-Kobayashi S., Tamori A., Kawada N. Clinical significance of circulating soluble immune checkpoint proteins in sorafenib-treated patients with advanced hepatocellular carcinoma. *Sci. Rep.*, 2020, Vol. 10, no. 1, 3392. doi: 10.1038/s41598-020-60440-5.
14. Elhag O., Hu X.J., Wen-Ying Z., Li X., Yuan Y.Z., Deng L.F., Liu D.L., Liu Y.L., Hui G. Reconstructed adeno-associated virus with the extracellular domain of murine PD-1 induces antitumor immunity. *Asian Pac. J. Cancer Prev.*, 2012, Vol. 13, no. 8, pp. 4031-4036.
15. Enninga E., Harrington S., Creedon D., Ruano R., Markovic S., Dong H., Dronca R. Immune checkpoint molecules soluble program death ligand 1 and galectin-9 are increased in pregnancy. *Am. J. Reprod. Immunol.*, 2018, Vol. 79, no. 2, e12795. doi: 10.1111/aji.12795.
16. Frigola X., Inman B., Krco C.J., Liu X., Harrington S., Bulur P., Dietz A., Dong H., Kwon E. Soluble B7-H1: differences in production between dendritic cells and T cells. *Immunol. Lett.*, 2012, Vol. 142, no. 1-2, pp. 78-82.

17. Fu R., Jing C., Li X., Tan Z., Li H. Prognostic significance of serum PD-L1 level in patients with locally advanced or metastatic esophageal squamous cell carcinoma treated with combination cytotoxic chemotherapy. *Cancer Manag. Res.*, 2021, Vol. 13, pp. 4935-4946.
18. Geng H., Zhang G.M., Xiao H., Yuan Y., Li D., Zhang H., Qiu H., He Y.F., Feng Z.H. HSP70 vaccine in combination with gene therapy with plasmid DNA encoding sPD-1 overcomes immune resistance and suppresses the progression of pulmonary metastatic melanoma. *Int. J. Cancer.*, 2006, Vol. 118, no. 11, pp. 2657-2664.
19. Gu D., Ao X., Yang Y., Chen Z., Xu X. Soluble immune checkpoints in cancer: production, function and biological significance. *J. Immunother. Cancer*, 2018, Vol. 6, no. 1, 132. doi: 10.1186/s40425-018-0449-0
20. Guo X., Wang J., Jin J., Chen H., Zhen Z., Jiang W., Lin T., Huang H., Xia Z., Sun X. High serum level of soluble programmed death ligand 1 is associated with a poor prognosis in Hodgkin lymphoma. *Transl. Oncol.*, 2018, Vol. 11, no. 3, pp. 779-785.
21. Hassounah N., Malladi V.S., Huang Y., Freeman S.S., Beauchamp E.M., Koyama S., Souders N., Martin S., Dranoff G., Wong K.-K., Pedomallu C.S., Hammerman P.S. Identification and characterization of an alternative cancer-derived PD-L1 splice variant. *Cancer Immunol. Immunother.*, 2019, Vol. 68, no. 3, pp. 407-420.
22. He X., Xu L.H., Liu Y. Identification of a novel splice variant of human PD-L1 mRNA encoding an isoform-lacking Igv-like domain. *Acta Pharmacol. Sin.*, 2005, Vol. 26, no. 4, pp. 462-468.
23. Hira-Miyazawa M., Nakamura H., Hirai M., Kobayashi Y., Kitahara H., Bou-Gharios G., Kawashiri S.. Regulation of programmed-death ligand in the human head and neck squamous cell carcinoma microenvironment is mediated through matrix metalloproteinase-mediated proteolytic cleavage. *Int. J. Oncol.*, 2018, Vol. 52, no. 2, pp. 379-388.
24. Huang S., Lin H., Lin C.-W., Li C., Yao M., Tang J., Hou H., Tsay W., Chou S., Cheng C., Tien H. Soluble PD-L1: a biomarker to predict progression of autologous transplantation in patients with multiple myeloma. *Oncotarget*, 2016, Vol. 7, no. 38, pp. 62490-62502.
25. Incorvaia L., Badalamenti G., Rinaldi G., Iovanna J.L., Olive D., Swayden M., Terruso L., Vincenzi B., Fulfarò F., Bazan V., Russo A., Fanale D. Can the plasma PD-1 levels predict the presence and efficiency of tumor-infiltrating lymphocytes in patients with metastatic melanoma? *Ther. Adv. Med. Oncol.*, 2019, Vol. 11, 1758835919848872. doi: 10.1177/1758835919848872.
26. Kalluri R., LeBleu V.S. The Biology, function, and biomedical applications of exosomes. *Science*, 2020, Vol. 367, no. 6478, eaau6977. doi: 10.1126/science.aau6977.
27. Keber C., Derigs M., Schultz C., Wegner M., Lingelbach S., Wischmann V., Hofmann R., Denkert C., Hegele A., Hânze J. Cellular and soluble immune checkpoint signaling forms PD-L1 and PD-1 in renal tumor tissue and in blood. *Cancer Immunol. Immunother.*, 2022, Vol. 71, no. 10, pp. 2381-2389.
28. Keir M., Butte MJ, Freeman GJ, Sharpe AH. PD-1 and its ligands in tolerance and immunity. *Annu. Rev. Immunol.*, 2008, Vol. 26, pp. 677-704.
29. Kruger S., Legenstein M.L., Rösger V., Haas M., Modest D.P., Westphalen C.B., Ormanns S., Kirchner T., Heinemann V., Holdenrieder S., Boeck S. Serum levels of soluble programmed death protein 1 (sPD-1) and soluble programmed death ligand 1 (sPD-L1) in advanced pancreatic cancer. *OncolImmunology*, 2017, Vol. 6, no. 5, e1310358. doi: 10.1080/2162402X.2017.1310358.
30. Landeira-Viñuela A., Arias-Hidalgo C., Juanes-Velasco P., Alcoceba M., Navarro-Bailón A., Pedreira C., Lecrevisse Q., Díaz-Muñoz L., Sánchez-Santos J., Hernández A., García-Vaquero M., Góngora R., De Las Rivas J., González M., Orfao A., Fuentes M. Unravelling soluble immune checkpoints in chronic lymphocytic leukemia: Physiological immunomodulators or immune dysfunction. *Front. Immunol.*, 2022, Vol. 13, 965905. doi: 10.3389/fimmu.2022.965905.
31. Larrinaga G., Solano-Iturri J., Errarte P., Unda M., Loizaga-Iriarte A., Pérez-Fernández A., Echevarría E., Asumendi A., Manini C., Angulo J.C., López J.I. Soluble PD-L1 is an independent prognostic factor in clear cell renal cell carcinoma. *Cancers (Basel)*, 2021, Vol. 13, no. 4, 667. doi: 10.3390/cancers13040667.
32. Li C., Li C., Zhi C., Liang W., Wang X., Chen X., Lv T., Shen Q., Song Y., Lin D., Liu H. Clinical significance of PD-L1 expression in serum-derived exosomes in NSCLC patients. *J. Transl. Med.*, 2019, Vol. 17, no. 1, 355. doi: 10.1186/s12967-019-2101-2.
33. Li J., Shi D., Wan X.C., Hu J., Su Y., Zeng Y., Hu Z., Yu B., Zhang Q., Wei P., Zhou X. Universal extracellular vesicles and PD-L1⁺ extracellular vesicles detected by single molecule array technology as circulating biomarkers for diffuse large B cell lymphoma. *OncolImmunology*, 2021, Vol. 10, no. 1, 1995166. doi: 10.1080/2162402x.2021.1995166.
34. Li N., Zhou Z., Li F., Sang J., Han Q., Lv Y., Zhao W., Li C., Liu Z. Circulating soluble programmed death-1 levels may differentiate immune-tolerant phase from other phases and hepatocellular carcinoma from other clinical diseases in chronic hepatitis B virus infection. *Oncotarget*, 2017, Vol. 8, no. 28, pp. 46020-46033.
35. Li W., Syed F., Yu R., Yang R., Xia Y., Relich R., Russell P., Zhang S., Khalili M., Huang L., Kacena M., Zheng X., Yu Q. Soluble immune checkpoints are dysregulated in COVID-19 and heavy alcohol users with HIV infection. *Front. Immunol.*, 2022, Vol. 13, 833310. doi: 10.3389/fimmu.2022.833310.
36. Li Y., Xiao Y., Su M., Zhang R., Ding J., Hao X., Ma Y. Role of soluble programmed death-1 (sPD-1) and sPD-ligand 1 in patients with cystic echinococcosis. *Exp. Ther. Med.*, 2016, Vol. 11, no. 1, pp. 251-256.
37. Lux A., Kahlert C., Grützmann R., Pilarsky C. C-Met and PD-L1 on circulating exosomes as diagnostic and prognostic markers for pancreatic cancer. *Int. J. Mol. Sci.*, 2019, Vol. 20, no. 13, 3305. doi: 10.3390/ijms20133305.

38. Machiraju D., Wiecken M., Lang N., Hülsmeier I., Roth J., Schank T., Eurich R., Halama N., Enk A., Hassel J.C. Soluble immune checkpoints and T-cell subsets in blood as biomarkers for resistance to immunotherapy in melanoma patients. *OncoImmunology*, 2021, Vol. 10, no. 1, 1926762. doi: 10.1080/2162402X.2021.1926762.
39. Magistrelli G., Jeannin P., Herbault N., Benoit De Coignac A., Gauchat J.F., Bonnefoy J.Y., Delneste Y. A soluble form of CTLA-4 generated by alternative splicing is expressed by nonstimulated human T cells. *Eur. J. Immunol.*, 1999, Vol. 29, no. 11, pp. 3596-3602.
40. Mahoney K., Shukla S.A., Patsoukis N., Chaudhri A., Browne E.P., Arazi A., Eisenhaure T., Pendergraft 3rd W.F., Hua P., Pham H.C., Bu X., Zhu B., Hacohen N., Fritsch E.F., Boussiotis V.A., Wu C.J., Freeman G.J. A secreted PD-L1 splice variant that covalently dimerizes and mediates immunosuppression. *Cancer Immunol. Immunother.*, 2019, Vol. 68, no. 3, pp. 421-432.
41. Malinga N., Siwele S., Steel H., Kwofie L., Meyer P., Smit T., Anderson R., Rapoport B., Kgekoko M. Systemic levels of the soluble co-inhibitory immune checkpoints, CTLA-4, LAG-3, PD-1/PD-L1 and TIM-3 are markedly increased in basal cell carcinoma. *Transl. Oncol.*, 2022, Vol. 19, 101384. doi: 10.1016/j.tranon.2022.101384.
42. Mazzarella L., Duso B.A., Trapani D., Belli C., D'Amico P., Ferraro E., Viale G., Curigliano G. The evolving landscape of 'next-generation' immune checkpoint inhibitors: A review. *Eur. J. Cancer*, 2019, Vol. 117, pp. 14-31.
43. Meyo T., Jouinot A., Giroux-Leprieur E., Fabre E., Wislez M., Alifano M., Leroy K., Boudou-Rouquette P., Tlemsani C., Khoudour N., Arrondeau J., Thomas-Schoemann A., Blons H., Mansuet-Lupo A., Damotte D., Vidal M., Goldwasser F., Alexandre J., Blanchet B. Predictive value of soluble PD-1, PD-L1, VEGFA, CD40 ligand and CD44 for nivolumab therapy in advanced non-small cell lung cancer: A case-control study. *Cancers (Basel)*, 2020, Vol. 12, no. 2, 473. doi: 10.3390/cancers12020473.
44. Mocan T., Iliu M., Nenu I., Craciun R., Horhat A., Susa R., Minciuna I., Rusu I., Mocan L.P., Seicean A., Iuga C., Hajjar N., Sparchez M., Leucuta D., Sparchez Z. Serum levels of soluble programmed death-ligand 1 (sPD-L1): A possible biomarker in predicting post-treatment outcomes in patients with early hepatocellular carcinoma. *Int. Immunopharmacol.*, 2021, Vol. 94, 107467. doi: 10.1016/j.intimp.2021.107467.
45. Morrissey S., Yan J. Exosomal PD-L1: Roles in tumor progression and immunotherapy. *Trends Cancer*, 2020, Vol. 6, no. 7, pp. 550-558.
46. Mortensen J., Hansen I.M., Clausen M.R., Bjerre M., Amore F. Elevated pre-therapeutic serum levels of soluble programmed death 1 protein (sPD-1) identify DLBCL patients with adverse prognostic features. *Blood*, 2017, Vol. 130, Suppl 1, 4148. doi: 10.1182/blood.V130.Suppl_1.4148.4148.
47. Murakami S., Shibaki R., Matsumoto Y., Yoshida T., Goto Y., Kanda S., Horinouchi H., Fujiwara Y., Yamamoto N., Ohe Y. Association between serum level soluble programmed cell death ligand 1 and prognosis in patients with non-small cell lung cancer treated with anti-PD-1 antibody. *Thorac. Cancer*, 2020, Vol. 11, no. 12, pp. 3585-3595.
48. Ng K., Attig J., Young G.R., Ottina E., Papamichos S.I., Kotsianidis I., Kassiotis G. Soluble PD-L1 generated by endogenous retroelement exaptation is a receptor antagonist. *eLife*, 2019, Vol. 8, e50256. doi: 10.7554/eLife.50256.
49. Nielsen C., Ohm-Laursen L., Barington T., Husby S., Lillevang S.T. Alternative splice variants of the human PD-1 gene. *Cell. Immunol.*, 2005, Vol. 235, no. 2, pp. 109-116.
50. Niu M., Liu Y., Yi M., Jiao D., Wu K. Biological characteristics and clinical significance of soluble PD-1/PD-L1 and exosomal PD-L1 in cancer. *Front. Immunol.*, 2022, Vol. 13, 827921. doi: 10.3389/fimmu.2022.827921.
51. Noubissi Nzeteu G., Schlichtner S., David S., Ruppenstein A., Fasler-Kan E., Raap U., Sumbayev V., Gibbs B., Meyer H. Macrophage differentiation and polarization regulate the release of the immune checkpoint protein V-Domain Ig suppressor of T Cell activation. *Front. Immunol.*, 2022, Vol. 13, 837097. doi: 10.3389/fimmu.2022.837097.
52. Okuma Y., Wakui H., Utsumi H., Sagawa Y., Hosomi Y., Kuwano K., Homma S. Soluble programmed cell death ligand 1 as a novel biomarker for Nivolumab therapy for non-small-cell lung cancer. *Clin. Lung Cancer*, 2018, Vol. 19, no. 5, pp. 410-477.e1.
53. Okuyama M., Mezawa H., Kawai T., Urashima M. Elevated soluble PD-L1 in pregnant women's serum suppresses the immune reaction. *Front. Immunol.*, 2019, Vol. 10, 86. doi: 10.3389/fimmu.2019.00086.
54. Ostrand-Rosenberg S., Horn L.A., Alvarez J.A. Novel strategies for inhibiting PD-1 pathway-mediated immune suppression while simultaneously delivering activating signals to tumor-reactive T cells. *Cancer Immunol. Immunother.*, 2015, Vol. 64, no. 10, pp. 1287-1293.
55. Pawłowska A., Kwiatkowska A., Suszczyk D., Chudzik A., Tarkowski R., Barczyński B., Kotarski J., Wertel I. Clinical and prognostic value of antigen-presenting cells with PD-L1/PD-L2 expression in ovarian cancer patients. *Int. J. Mol. Sci.*, 2021, Vol. 22, no. 21, 11563. doi: 10.3390/ijms222111563.
56. Pegtel D., Gould S.J. Exosomes. *Annu. Rev. Biochem.*, 2019, Vol. 88, pp. 487-514.
57. Qiu H., Liu S., Xie C., Long J., Feng Z. Regulating immunity and inhibiting tumor growth by the recombinant peptide sPD-1-CH50. *Anticancer Res.*, 2009, Vol. 29, no. 12, pp. 5089-5094.
58. Qu S., Jiao Z., Lu G., Yao B., Wang T., Rong W., Xu J., Fan T., Sun X., Yang R., Wang J., Yao Y., Xu G., Yan X., Wang T., Liang H., Zen K. PD-L1 lncRNA splice isoform promotes lung adenocarcinoma progression via enhancing c-Myc activity. *Genome Biol.*, 2021, Vol. 22, no. 1, 104. doi: 10.1186/s13059-021-02331-0.
59. Rapoport B., Steel H., Smit T., Heyman L., Theron A., Hlatswayo N., Kwofie L., Jooste L., Benn C., Nayler S., Anderson R. Dysregulation of soluble immune checkpoint proteins in newly diagnosed early breast cancer patients. *Ann. Oncol.*, 2020, Vol. 31, Suppl. 5, 1228. doi: 10.1016/j.annonc.2020.08.2196.

60. Riva A., Adams H., Patel V., Azarian S., Wright G., Tarff S., Katzarov K., Simonova M., Hadzhiolova T., Pavlova S., Williams R., Evans A., Chokshi S. The TIM3-Gal9 immune checkpoint axis is inter-linked with severity of alcoholic liver disease. *J. Hepatol.*, 2018, Vol. 68, pp. S810-S811.
61. Riva A., Chokshi S. Immune checkpoint receptors: homeostatic regulators of immunity. *Hepatol. Int.*, 2018, Vol. 12, no 3, pp. 223-236.
62. Riva A., Palma E., Devshi D., Corrigall D., Adams H., Heaton N., Menon K., Preziosi M., Zamalloa A., Mique R., Ryan J., Wright G., Fairclough S., Evans A., Shawcross D., Schierwagen R., Klein S., Uschner F., Praktijnjo M., Katzarov K., Hadzhiolova T., Pavlova S., Simonova M., Trebicka J., Williams R., Chokshi S. Soluble TIM3 and its ligands galectin-9 and CEACAM1 are in disequilibrium during alcohol-related liver disease and promote impairment of anti-bacterial immunity. *Front. Physiol.*, 2021, Vol. 12, 632502. doi: 10.3389/fphys.2021.632502.
63. Riva A. Editorial: Soluble immune checkpoints: Novel physiological immunomodulators. *Front. Immunol.*, 2023, Vol. 14, 1178541. doi: 10.3389/fimmu.2023.1178541.
64. Roemer M., Redd R.A., Cader F.Z., Pak C.J., Abdelrahman S., Ouyang J., Sasse S., Younes A., Fanale M., Santoro A., Zinzani P.L., Timmerman J., Collins G.P., Ramchandren R., Cohen J.B., De Boer J.P., Kuruvilla J., Savage K., Trneny M., Ansell S., Kato K., Farsaci B., Sumbul A., Armand P., Neuberg D., Pinkus G.S., Ligon A.H., Rodig S.J., Shipp M.A. Major histocompatibility complex class II and programmed death ligand 1 expression predict outcome after programmed death 1 blockade in classic Hodgkin lymphoma. *J. Clin. Oncol.*, 2018, Vol. 36, no. 10, pp. 942-950.
65. Romero Y., Wise R., Zolkiewska A. Proteolytic processing of PD-L1 by ADAM proteases in breast cancer cells. *Cancer Immunol. Immunother.*, 2020, Vol. 69, no. 1, pp. 43-55.
66. Rossille D., Gressier M., Damotte D., Maucourt-Boulch D., Pangault C., Semana G., Le Gouill S., Haioun C., Tarte K., Lamy T., Milpied N., Fest T. High level of soluble programmed cell death ligand 1 in blood impacts overall survival in aggressive diffuse large B-cell lymphoma: results from a French multicenter clinical trial. *Leukemia*, 2014, Vol. 28, no. 12, pp. 2367-2375.
67. Ruan Y., Hu W., Li W., Lu H., Gu H., Zhang Y., Zhu S., Chen Q. Analysis of plasma EBV-DNA and soluble checkpoint proteins in nasopharyngeal carcinoma patients after definitive intensity-modulated radiotherapy. *Biomed Res. Int.*, 2019, Vol. 2019, 3939720. doi: 10.1155/2019/3939720
68. Shin K., Kim J., Park S., Lee M., Park J., Choi M., Kang D., Song K., Seo H., Lee S., Kim B., Kim O., Park J., Kang N., Kim I. Prognostic value of soluble PD-L1 and exosomal PD-L1 in advanced gastric cancer patients receiving systemic chemotherapy. *Sci. Rep.* 2023, Vol. 13, no. 1, 6952. doi: 10.1038/s41598-023-33128-9.
69. Song M., Park S., Nam H., Choi D., Sung Y. Enhancement of vaccine-induced primary and memory CD8(+) T-cell responses by soluble PD-1. *J. Immunother.*, 2011, Vol. 34, no. 3, pp. 297-306.
70. Sorensen S., Demuth C., Weber B., Sorensen B.S., Meldgaard P. Increase in soluble PD-1 is associated with prolonged survival in patients with advanced EGFR-mutated non-small cell lung cancer treated with erlotinib. *Lung Cancer*, 2016, Vol. 100, pp. 77-84.
71. Spiotto M., Fu Y.X., Weichselbaum R.R. The intersection of radiotherapy and immunotherapy: mechanisms and clinical implications. *Sci. Immunol.*, 2016, Vol. 1, no. 3, EAAG1266. doi: 10.1126/sciimmunol.aag1266.
72. Srivastava R., Trivedi S., Concha-Benavente F., Hyun-Bae J., Wang L., Seethala R.R., Branstetter 4th B.F., Ferrone S., Ferris R.L. STAT1-induced HLA class I upregulation enhances immunogenicity and clinical response to anti-EGFR mAb cetuximab therapy in HNC patients. *Cancer Immunol. Res.*, 2015, Vol. 3, no. 8, pp. 936-945.
73. Tarhoni I., Fhied C., Gerard D., Borgia J. Multiplexed evaluation of soluble immune-checkpoint molecules in sera from metastatic NSCLC patients receiving immunotherapy. Available at: <https://www.oxfordglobal.co.uk/wp-content/uploads/2023/03/Merck-Millipore-Multiplexed-Evaluation-of-Soluble-Immune-Checkpoint-Molecules>.
74. Vajavaara H., Mortensen J., Leivonen S., Hansen I., Ludvigsen M., Holte H., Jørgensen J., Bjerre M., d'Amore F., Leppä S. Soluble PD-1 but not PD-L1 levels predict poor outcome in patients with high-risk diffuse large B-cell lymphoma. *Cancers (Basel)*, 2021, Vol. 13, no. 3, 398. doi: 10.3390/cancers13030398.
75. Vikerfors A., Davidsson S., Frey J., Jerlström T., Carlsson J. Soluble PD-L1 in serum and urine in urinary bladder cancer patients. *Cancers (Basel)*, 2021, Vol. 13, no. 22, 5841. doi: 10.3390/cancers13225841.
76. Vivarelli S., Falzone L., Torino F., Scandurra G., Russo G., Bordonaro R., Russo G., Bordonaro R., Pappalardo F., Spandidos D., Raciti G., Libra M. Immune-checkpoint inhibitors from cancer to COVID-19: A promising avenue for the treatment of patients with COVID-19 (Review). *Int. J. Oncol.*, 2021, Vol. 58, no. 2, pp. 145-157.
77. Wang J., Zhang H., Sun X., Wang X., Ren T., Huang Y., Zhang R., Zheng B., Guo W. Exosomal PD-L1 and N-cadherin predict pulmonary metastasis progression for osteosarcoma patients. *J. Nanobiotechnol.*, 2020, Vol. 18, no. 1, 151. doi: 10.1186/s12951-020-00710-6.
78. Wang L., Wang H., Chen H., Wang W., Chen X., Geng Q., Xia Z., Lu Y. Serum levels of soluble programmed death ligand 1 predict treatment response and progression free survival in multiple myeloma. *Oncotarget*, 2015, Vol. 6, no. 38, pp. 41228-41236.
79. Wang Q., He1 Y., Li W., Xu X., Hu Q., Bian Z., Xu A., Tu H., Wu M., Wu X. Soluble immune checkpoint-related proteins in blood are associated with invasion and progression in non-small cell lung cancer. *Front. Immunol.*, 2022, Vol. 13, 887916. doi: 10.3389/fimmu.2022.887916.
80. Ward F., Dahal L., Khanolkar R., Shankar S., Barker R. Targeting the alternatively spliced soluble isoform of CTLA-4: prospects for immunotherapy? *Immunotherapy*, 2014, Vol. 6, no. 10, pp. 1073-1084. doi: 10.2217/imt.14.73.

81. Yasinska I., Meyer H., Schlichtner S., Hussain R., Siligardi G., Casely-Hayford M., Fiedler W., Wellbrock J., Desmet C., Calzolari L., Varani L., Berger S., Raap U., Gibbs B., Fasler-Kan E., Sumbayev E. Ligand-receptor interactions of Galectin-9 and VISTA suppress human T lymphocyte cytotoxic activity. *Front. Immunol.*, 2020, Vol. 11, 580557. doi: 10.3389/fimmu.2020.580557.
82. Yin Z., Yu M., Ma T., Zhang C., Huang S., Karimzadeh M.R., Momtazi-Borojeni A.A., Chen S. Mechanisms underlying low-clinical responses to PD-1/PD-L1 blocking antibodies in immunotherapy of cancer: A key role of exosomal PD-L1. *J. Immunother. Cancer*, 2021, Vol. 9, no. 1, e001698. doi: 10.1136/jitc-2020-001698
83. Ying H., Zhang X., Duan Y., Lao M., Xu J., Yang H., Liang T., Bai X. Non-cytomembrane PD-L1: an atypical target for cancer. *Pharmacol. Res.*, 2021, Vol. 170, 105741. doi: 10.1016/j.phrs.2021.105741.
84. Zeng Z., Shi F., Zhou L., Zhang M., Chen Y., Chang X., Lu Y., Bai W., Qu J., Wang C., Wang H., Lou M., Wang F., Lv J., Yang Y. Upregulation of circulating PD-L1/PD-1 is associated with poor post-cryoablation prognosis in patients with HBV-related hepatocellular carcinoma. *PLoS One*, 2011, Vol. 6, no. 9, e23621. doi: 10.1371/journal.pone.0023621.
85. Zhang P., Ouyang S., Wang J., Huang Z., Wang J., Liao L. Levels of programmed death-1 and programmed death ligand-1 in the peripheral blood of patients with oral squamous cell carcinoma and its clinical implications. *West China J. Stomatology*, 2015, Vol. 33, no. 5, pp. 529-533.
86. Zheng Z., Bu Z., Liu X., Zhang L., Li Z., Wu A., Wu X., Cheng X., Xing X., Du H., Wang X., Hu Y., Ji J. Level of circulating PD-L1 expression in patients with advanced gastric cancer and its clinical implications. *Chin. J. Cancer Res.*, 2014, Vol. 26, no. 1, pp. 104-111.
87. Zhou J., Mahoney K., Giobbie-Hurder A., Zhao F., Lee S., Liao X., Rodig S., Li J., Wu X., Butterfield L., Piesche M., Manos M., Eastman L., Dranoff G., Freeman G., Hodi F. Soluble PD-L1 as a biomarker in malignant melanoma treated with checkpoint blockade. *Cancer Immunol. Res.*, 2017, Vol. 5, no. 6, pp. 480-492.

Авторы:

Глазанова Т.В. — д.м.н., главный научный сотрудник научно-исследовательской лаборатории иммунологии ФГБУ «Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии Федерального медико-биологического агентства», Санкт-Петербург, Россия

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

Authors:

Glazanova T.V., PhD, MD (Medicine), Chief Research Associate, Laboratory of Immunology, Russian Research Institute of Haematology and Transfusiology, Federal Medical and Biological Agency, St. Petersburg, Russian Federation

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

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

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

Kuzmich E.V., PhD (Medicine), Leading Research Associate, Laboratory of Immunology, Russian Research Institute of Haematology and Transfusiology, Federal Medical and Biological Agency, St. Petersburg, Russian Federation

Bubnova L.N., PhD, MD (Medicine), Professor, Honored Scientist of the Russian Federation, Chief Research Associate, Laboratory of Immunology, Russian Research Institute of Haematology and Transfusiology, Federal Medical and Biological Agency; Professor, Department of Immunology, First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Поступила 29.02.2024
Принята к печати 17.03.2024

Received 29.02.2024
Accepted 17.03.2024

КЛИНИКО-ИММУНОЛОГИЧЕСКОЕ ОБОСНОВАНИЕ ПРОТОКОЛА ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ПЛАЗМАФЕРЕЗА И ВНУТРИВЕННЫХ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ У БЕРЕМЕННЫХ С АНТИФОСФОЛИПИДНЫМ СИНДРОМОМ

Орлова Е.С.¹, Чепанов С.В.¹, Зайнулина М.С.^{2,3}, Сельков С.А.¹

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

² СПб ГБУЗ «Родильный дом № 6 имени профессора В.Ф. Снегирева», Санкт-Петербург, Россия

³ ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Резюме. Цель работы — обосновать эффективность терапии антифосфолипидного синдрома (АФС) у беременных с использованием плазмафереза и иммуноглобулинов для внутривенного введения.

Обследованы 92 женщины с диагностированным АФС и 47 женщин без АФС с физиологически протекающей беременностью. АФС был установлен в соответствии с Сиднейскими диагностическими критериями (2006). Пациентки с АФС были разделены на группы в зависимости от применяемого способа лечения: только стандартная терапия, плазмаферез в дополнение к стандартной терапии, иммуноглобулины для внутривенного введения (ВВИГ) в дополнение к стандартной терапии, и комплексное лечение — плазмаферез и ВВИГ в дополнение к стандартной терапии. В сыворотках и плазме периферической крови определяли содержание суммарных антифосфолипидных антител и параметров гемостаза, а также Р-селектина, до и после лечения.

Установлено, что достоверно более высокая частота благоприятных исходов беременности — 96,3% (срочные роды) — была в группе пациенток с АФС, получавших сочетанную терапию. Частота недоношенности и гипотрофии плода была достоверно ниже в группе пациенток с АФС, получавшим сочетанную терапию. Установлено, что наиболее значимое снижение уровня антифосфолипидных антител наблюдалось в группе с сочетанным применением плазмафереза и ВВИГ на фоне традиционной терапии. У женщин с физиологически протекающей беременностью без антифосфолипидных антител экспрессия Р-селектина была достоверно ниже по сравнению с беременными с АФС.

Применение комплексного подхода с использованием плазмафереза, иммуноглобулинов для внутривенного введения на фоне стандартной терапии является наиболее эффективным методом лечения невынашивания беременности, связанного с АФС. Использование данного метода позволило

Адрес для переписки:

Орлова Екатерина Сергеевна
ФГБНУ «Научно-исследовательский институт
акушерства, гинекологии и репродуктологии
имени Д.О. Отта»
199034, Россия, Санкт-Петербург,
Менделеевская линия, 3.
Тел.: 8 (812) 328-98-40.
E-mail: kate-obstetrician@yandex.ru

Address for correspondence:

Ekaterina S. Orlova
D. Ott Research Institute of Obstetrics,
Gynecology and Reproductology
3 Mendeleev Line
St. Petersburg
199034 Russian Federation
Phone: +7 (812) 328-98-40.
E-mail: kate-obstetrician@yandex.ru

Образец цитирования:

Е.С. Орлова, С.В. Чепанов, М.С. Зайнулина,
С.А. Сельков «Клинико-иммунологическое
обоснование протокола использования плазмафереза
и внутривенных иммуноглобулинов у беременных
с антифосфолипидным синдромом» // Медицинская
иммунология, 2025. Т. 27, № 1. С. 35-44.
doi: 10.15789/1563-0625-UOP-2893

© Орлова Е.С. и соавт., 2025

Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

E.S. Orlova, S.V. Chepanov, M.S. Zainulina, S.A. Selkov
“Use of plasmapheresis and intravenous immunoglobulins in
pregnant women with antiphospholipid syndrome”, *Medical
Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2025,
Vol. 27, no. 1, pp. 35-44.
doi: 10.15789/1563-0625-UOP-2893

© Orlova E.S. et al., 2025

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

DOI: 10.15789/1563-0625-UOP-2893

добиться сокращения частоты акушерских осложнений и улучшить исходы беременности за счет увеличения частоты срочных родов, а также наиболее низких показателей патологии новорожденного. Определение уровня Р-селектина до и после лечения позволяет оценить уровень активации тромбоцитов, эффективность проводимых методов терапии и обосновывает необходимость медикаментозной коррекции неблагоприятных показателей тромбоцитарного звена гемостаза в ходе терапии.

Ключевые слова: антифосфолипидный синдром, антифосфолипидные антитела, эндотелиальная дисфункция, Р-селектин, привычное невынашивание беременности, иммуноглобулины для внутривенного введения

USE OF PLASMAPHERESIS AND INTRAVENOUS IMMUNOGLOBULINS IN PREGNANT WOMEN WITH ANTIPHOSPHOLIPID SYNDROME

Orlova E.S.^a, Chepanov S.V.^a, Zainulina M.S.^{b, c}, Selkov S.A.^a

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

^b V. Snegirev Maternity Hospital No. 6, St. Petersburg, Russian Federation

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

Abstract. Our objective was to demonstrate the efficiency of therapy for antiphospholipid syndrome (APS) in pregnant women using plasmapheresis and intravenous immunoglobulins.

92 women with diagnosed APS and 47 APS-free women with physiological pregnancy were under study. APS was diagnosed in accordance with Sydney Consensus Workshop (2006). Patients with APS were divided into groups depending on the method of treatment used: conventional therapy, plasmapheresis in addition to standard therapy, intravenous immunoglobulins (IVIG) in addition to standard therapy, and complex treatment, i.e., plasmapheresis and IVIG added to standard therapy. The levels of antiphospholipid antibodies, hemostasis parameters, P-selectin were measured in blood serum and plasma before and after treatment.

Higher frequency of favorable pregnancy outcomes was shown in the group of patients with APS who were treated with combined therapy, i.e. in 96.3% of cases (term birth). Frequency of prematurity and fetal hypotrophy was significantly lower in the group of patients with APS treated with combined therapy. The most significant decrease in the level of antiphospholipid antibodies was observed in the group treated by plasmapheresis, IVIG and conventional therapy. Expression of P-selectin in the women with normal pregnancy without antiphospholipid antibodies, was significantly lower compared to pregnant women with APS.

Usage of integrated approach using plasmapheresis, intravenous immunoglobulins and standard therapy is the most effective treatment for APS-related miscarriage. Implication of this strategy has reduced the incidence of obstetric complications and improved pregnancy outcomes due to increased frequency of term births, as well as lowest indices of pathology in the newborns. Analysis of P-selectin levels before and after treatment enables determination of the platelet activation levels, efficiency of therapeutic approaches, as well as medical drug correction of unfavorable platelet hemostasis during therapy.

Keywords: antiphospholipid syndrome, antiphospholipid antibodies, endothelial dysfunction, P-selectin, miscarriage, intravenous immunoglobulin

Статья подготовлена в рамках выполнения ПНИ № 1022040700798-6-3.2.2-1-9 «Разработка лабораторных модулей иммунологического обследования пациенток с целью прогнозирования различных форм акушерской и репродуктивной патологии».

Введение

Проблема невынашивания беременности в акушерстве не теряет актуальности и не име-

ет существенной тенденции к сокращению частоты, несмотря на развитие диагностических и терапевтических возможностей. Наиболее значимым иммунологическим фактором невынашивания беременности является антифосфолипидный синдром (АФС). Антифосфолипидный синдром – системная аутоиммунная патология, характеризующаяся повышенным риском развития сосудистого тромбоза и репродуктивными нарушениями, связанная с персистенцией анти-

фосфолипидных антител (АФА) [13]. Сиднейские диагностические критерии АФС, принятые в 2006 году, включают клинические синдромы — сосудистые тромбозы и осложнения беременности и лабораторные параметры — АФА в сыворотке крови [12].

АФА являются основным диагностическим критерием АФС и играют ключевую роль в его патогенезе, в том числе в формировании репродуктивной патологии [1].

Развитие эндотелиальной дисфункции играет важную роль в патогенезе АФС. Реализация клинических симптомов АФС обусловлена внутрисосудистым тромбозом в маточно-плацентарном кровотоке, который возникает вследствие повышения адгезии и агрегации тромбоцитов в результате дисбаланса эндотелиальных медиаторов. В свою очередь активация коагуляционного каскада, нарушение микроциркуляции, формирование тромбоцитарных микрочастиц и другие события определяют повышение экспрессии клеточных молекул адгезии и увеличение выброса вазоконстрикторов, что приводит к дисбалансу эндотелиальных медиаторов [2].

Согласно существующим международным рекомендациям, профилактика акушерских и тромбоэмболических осложнений у женщин в период беременности подразумевает применение низкомолекулярных гепаринов (НМГ) и низких доз аспирина [4, 7]. Тем не менее при проведении такой терапии в 20–30% случаев наблюдается повторное развитие акушерских осложнений и потеря беременности [11].

Использование внутривенных иммуноглобулинов (ВВИГ) при АФС в настоящее время вошло в перечень видов высокотехнологичной помощи, оказываемой пациенткам с привычным невынашиванием беременности, в том числе связанным с АФС (постановление правительства РФ от 29.12.2022 № 2497), однако в инструкции к препарату ВВИГ АФС не входит в список показаний к применению. Опыт применения ВВИГ появился в результате предпринимаемых попыток дополнения традиционной терапии АФС с целью преодоления потерь беременности в рефрактерных случаях. Ряд авторов сообщают об эффективности данного метода при привычном невынашивании у женщин с АФС [3, 15], однако некоторые исследователи подвергают сомнению целесообразность использования ВВИГ [8, 16].

В недавних научных исследованиях [6, 9, 17] иммунокорректирующая и эфферентная терапия рассматриваются в качестве перспективных методов лечения группы пациенток с рефрактерным АФС с целью снижения концентрации АФА

за счет неселективной элиминации, но эффективность этих методов оценивается неоднозначно [8].

Таким образом, целью настоящего исследования явилось клинко-иммунологическое обоснование и оценка эффективности применения плазмафереза и иммуноглобулинов для внутривенного введения у беременных, а также сочетания этих методов в комплексной терапии антифосфолипидного синдрома.

Материалы и методы

Проведено обследование 139 женщин репродуктивного возраста, получавших медицинскую помощь в отделе акушерства и перинатологии ФГБНУ «НИИ акушерства, гинекологии и репродуктологии им. Д.О. Отта». В основную группу вошли 73 пациентки с АФС, включенные в следующие подгруппы: 1а — беременные, получавшие только иммунотерапию ВВИГ (n = 31); 1б — беременные, которым проводился только плазмаферез (n = 15); 1в — беременные, получавшие сочетанную терапию (плазмаферез + ВВИГ (n = 27)). Группу сравнения составили 19 беременных с АФС, получавшие только традиционную терапию НМГ и низкими дозами ацетилсалициловой кислоты. Группу контроля составили 47 женщин с физиологически протекающей беременностью, без антифосфолипидных антител.

Для групп пациенток с диагнозом АФС были установлены следующие критерии исключения: возраст менее 18 и более 42 лет; многоплодная беременность; наличие тяжелой сопутствующей соматической патологии, в том числе с аутоиммунным компонентом (сахарный диабет 1-го типа и 2-го типа на инсулинотерапии, хронический гломерулонефрит, бронхиальная астма, ревматоидный артрит, системная красная волчанка); гомозиготная мутация фактора V Leiden, гомозиготная мутация в гене протромбина, сочетание гетерозиготных мутаций по указанным генам; наличие генетических, инфекционных, эндокринных и/или анатомических факторов невынашивания, отказ от участия в исследовании. Исследование одобрено на заседании Этического комитета ФГБНУ «НИИ АГ им. Д.О. Отта» (протокол № 67 от 23.10.2014 г.). Получено письменное информированное согласие пациенток на участие в исследовании, обезличенный анализ полученных данных и их публикацию в общедоступных изданиях.

АФС диагностировали в соответствии с Международными лабораторными критериями [12]. В дальнейшем для контроля течения беременно-

сти и эффективности терапии мы использовали тест-системы для определения всех антифосфолипидных антител, включая как критериальные, так и некритериальные, учитывая несомненную практическую значимость последних в прогнозировании и развитии тромбофилических осложнений.

Пациентки обращались в клинику НИИ АГиР с репродуктивными неудачами в анамнезе (привычное невынашивание беременности, необъяснимая гибель морфологически нормального плода) с целью ведения уже наступившей беременности с установленным диагнозом АФС. Все пациентки из основной группы и группы сравнения получали в качестве традиционной терапии НМГ в соответствии с весом беременной и низкие дозы аспирина (75-100 мг). Лабораторное обследование женщин с целью оценки гемостазиологического профиля и динамики титра суммарных антифосфолипидных антител проводилось до лечения, после его окончания и далее с кратностью 1 раз в 3-4 недели.

Плазмаферез осуществлялся на аппаратах Haemonetics MCS (США) и «Гемма» (Санкт-Петербург) с плазматическим фильтром ПФМ-800 на основе плоской трековой мембраны с диаметром пор 400 нм. Курс плазмафереза включал 3-4 сеанса с частотой 1 раз в 5-7 дней в конце I триместра, чаще всего во II триместре беременности (в период с 11-й по 24-ю неделю). За цикл из 3-4 сеансов удалялось 70-80% объема циркулирующей плазмы (ОЦП). Иммуномодулирующая терапия проводилась в виде курса препарата человеческого иммуноглобулина G для внутривенного использования в курсовой дозе 300 мл (15 г) по 100 мл (5 г) с интервалом между инфузиями в 6-7 дней в I и II триместрах беременности. В случаях комплексного лечения инфузии начинали проводить на следующий день после окончания цикла плазмафереза.

Определение концентраций суммарных аутоантител (к кардиолипину, фосфатидилсерину, фосфатидилинозитолу, фосфатидиловой кислоте, антител к 2-гликопротеину, аннексину-5) в сыворотке периферической крови определяли методом твердофазного иммуноферментного анализа с использованием коммерческих тест-систем TromboCombo, Anti-AnnexinV (Orgentec Diagnostika GmbH, Германия). Антитела к протромбин-серину определяли с помощью тест-систем Serin-Protrombin (IBL International GmbH, Германия). Проводилось ранжирование суммарных АФА по титрам: низкий уровень — 10-20 МЕ/мл, средний — 20-40 МЕ/мл, высокий — более 40 МЕ/мл. «Волчаночный антико-

агулянт» определяли на коагулометре ACL-200 (Instrumentation Laboratory, Испания) с использованием реактивов фирмы Siemens (Германия).

Определение функциональной активности тромбоцитов (CD62P-селектин) проводили на проточном цитофлуориметре FACS Canto II (Becton Dickinson, США) с использованием коммерческих наборов, содержащих моноклональные антитела, конъюгированные с флуорохромами CD62PFITC (Becton Dickinson, США) и CD41aAPC (Becton Dickinson, США).

Гистологическое исследование последов было проведено в патологоанатомическом отделении ФГБНУ «НИИ АГиР им Д.О. Отта» (зав. отд. к.м.н. Т.Г. Траль). Фрагменты плаценты (5 кусочков — краевая зона, парацентральная зона и перипуповинная зона) фиксировали в 10%-ном нейтральном забуференном формалине. При световой микроскопии на микроскопе Olympus CX41 при увеличении $\times 100$ и $\times 400$ оценивали степень инволютивно-дистрофических изменений, циркуляторные нарушения.

Статистическая обработка полученных данных выполнена на ПК при помощи пакета программ STATISTICA for Windows 7.0. Для сравнения групп применяли непараметрический критерий Краскела—Уоллиса. Достоверность различий между качественными показателями сравниваемых групп определяли с помощью критерия χ^2 (хи-квадрат) с учетом поправки Фишера. Полученные результаты считали достоверными при уровне достоверности нулевой статистической гипотезы менее 0,05.

Результаты

Частота осложнений настоящей беременности

Частота угрозы прерывания беременности была достоверно выше в группе беременных с АФС, после получения только традиционной терапии (89,5%), по сравнению с группой с сочетанной терапией (70,3%).

Преэклампсия, как осложнение беременности, встречалась во всех обследованных группах, в основном умеренной степени выраженности. Срок гестации, при котором был установлен данный диагноз варьировал от 33 до 37 недель, достоверных межгрупповых различий не было выявлено.

Плацентарная недостаточность в обследованных группах была установлена при выявлении признаков замедленного роста плода (ЗРП). Отмечено, что у беременных с АФС все представленные случаи ЗРП имели ранний фенотип и достоверно не различались. Выявлена достоверно

более высокая частота плацентарной недостаточности в группе беременных с АФС, получавших только традиционную терапию (26,3%, $p = 0,03$) по сравнению с комплексным подходом (рис. 1, см. 3-ю стр. обложки).

Оценка исходов беременности у исследуемых групп

В результате проведенного анализа установлено, что достоверно более высокая частота благоприятных исходов беременности — 96,3% (срочные роды) — была в группе пациенток с АФС, получавших сочетанную терапию, и была сопоставима с контрольной группой (97,8%). Наименьшая частота срочных родов оказалась в группе беременных с АФС со стандартной терапией (52,6%).

Достоверно более высокая частота преждевременных родов оказалась в группе беременных с АФС, получавших только стандартную терапию (31,6%). Наименьшее количество преждевременных родов выявлено в контрольной группе (2,1%) и в группе беременных с АФС, получавших сочетанную терапию (3,7%). При этом срок гестации, при котором произошли преждевременные роды, варьировал от 32 до 36 недель, достоверных межгрупповых различий не выявлено.

Случаи самопроизвольного выкидыша отмечены только в группах беременных с АФС, получавших эфферентную терапию (6,7%) и стандартную терапию (5,3%). В группе беременных, получавших сочетанную терапию, так же как и в контрольной группе, самопроизвольных выкидышей не было.

Неразвивающаяся беременность зарегистрирована в группе беременных с АФС, получавших ВВИГ (9,7%), получавших эфферентную терапию (6,7%), и в группе со стандартной терапией (10,5%) и достоверно в этих группах не отличалась. В контрольной группе и в группе беременных с АФС, получавших сочетанную терапию, случаев неразвивающейся беременности выявлено не было (рис. 2, см. 3-ю стр. обложки).

В группах беременных с АФС по сравнению с группой контроля чаще родоразрешение происходило путем кесарева сечения ($p < 0,05$), по большей части в экстренном порядке. Достоверных межгрупповых различий по способу родоразрешения у пациенток с АФС не установлено. При оценке обоснования оперативного родоразрешения пациенток установлено, что наиболее частым показанием к операции кесарева сечения является дистресс плода, достоверных различий между обследованными группами не установлено. Объем кровопотери у пациенток во время

кесарева сечения составил $647,37 \pm 77,23$ мл, достоверных различий не было выявлено, обследованные группы сопоставимы по данному показателю.

Анализируя состояние новорожденных, в группе контроля патологии не выявлено в 91,5% случаев, что достоверно выше по сравнению с группой пациенток с АФС, получавших в дополнение к стандартной терапии эфферентную и с группой только со стандартной терапией ($p < 0,001$). Частота асфиксии легкой степени достоверно не различалась в группах беременных с АФС и была достоверно ниже в группе контроля. Достоверно более низкая частота недоношенности новорожденных оказалась в группе беременных с АФС, получавших сочетанную терапию (3,7%) по сравнению со стандартной терапией ($p = 0,007$) и в контрольной группе (2,1%). Замедленный рост плода (ЗРП) достоверно выше выявлен в группах беременных с АФС с эфферентной терапией (38,5%) по сравнению с группой контроля ($p = 0,001$) и в группе со стандартной терапией (31,3%) по сравнению с комплексным подходом ($p = 0,02$) и с группой контроля ($p = 0,003$).

Уровни суммарных антифосфолипидных антител

Исходные уровни суммарных антифосфолипидных антител в исследуемых группах до лечения не имели существенных различий, группы были сопоставимы. Наиболее значимое снижение уровня суммарных антифосфолипидных антител после лечения наблюдалось в группе с сочетанным применением плазмафереза и ВВИГ ($p < 0,001$) (рис. 3). Оценка значений волчаночного антикоагулянта после лечения внутри группы показала достоверное его снижение в группе с терапией ВВИГ, сочетанной терапией и эфферентной терапией, достоверных межгрупповых различий не выявлено. В то же время в группе со стандартной терапией значения ВА после лечения значимо не снизились.

Показатели тромбоцитарного звена гемостаза

Исследование уровня экспрессии Р-селектина (CD62p⁺ или активированных тромбоцитов) выполнено у пациенток с АФС и у пациенток группы контроля с целью оценки влияния антифосфолипидных антител на тромбоцитарное звено гемостаза. Установлено, что на начальном этапе, до применения какого-либо метода терапии, уровень Р-селектина был достоверно выше у пациенток с наличием АФА по сравнению с группой контроля (без АФА) (рис. 4).

При оценке количества тромбоцитов было установлено, что до лечения сравниваемые па-

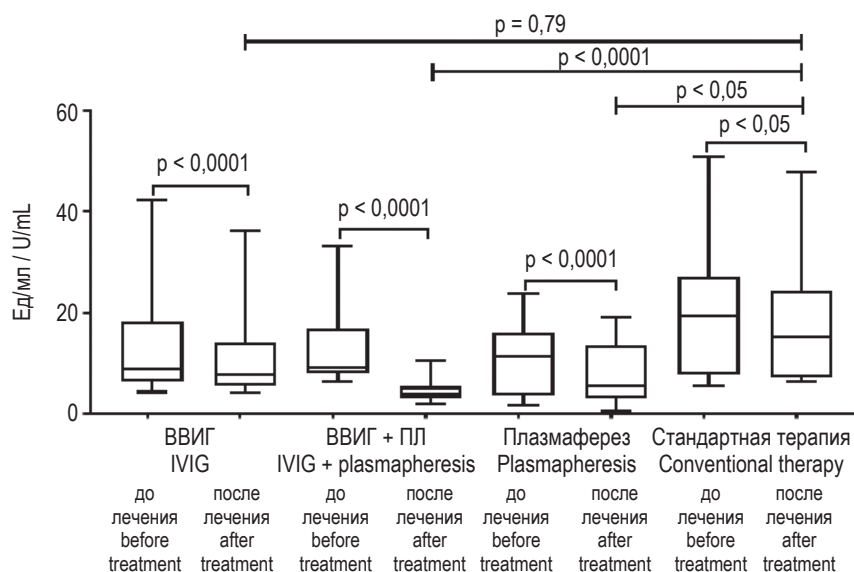


Рисунок 3. Динамика уровня суммарных АФА до и после терапии в исследуемых группах

Figure 3. Dynamics of the level of total APA before and after therapy in the study groups

параметры не имели статистически значимых различий между группами с различными подходами к терапии АФС. После лечения отмечалось некоторое снижение уровня тромбоцитов во всех группах, однако эти данные не выходили за рамки физиологических колебаний и достоверно не отличались при сравнении групп.

При оценке степени индуцированной агрегации тромбоцитов выявлено, что до лечения она была достоверно выше у беременных с АФС по сравнению с группой контроля ($p < 0,05$). В груп-

пах беременных с АФС до лечения достоверных различий не было.

После лечения степень агрегации тромбоцитов снизилась в группах с применением ВВИГ, эфферентной и сочетанной терапией по сравнению с группой со стандартной терапией (рис. 5). В группе с применением только стандартной терапии значимого снижения степени агрегации тромбоцитов после лечения не отмечено.

Показатели коагуляционного звена гемостаза

В нашем исследовании параметры стандартной коагулограммы оказались непоказательными для оценки различных методов лечения в группах беременных с АФС, поскольку оценка параметров коагуляционного звена гемостаза выявила разнонаправленные изменения, которые при этом существенно не различались в исследуемых группах и укладывались в рамки физиологических значений для соответствующего триместра беременности.

Гистологическое исследование плаценты

В большинстве случаев в группе беременных с комплексной терапией АФС строение плаценты соответствовало сроку гестации (85,2%). Диссоциированная форма хронической плацентарной недостаточности в субкомпенсированной стадии с выраженными циркуляторными нарушениями достоверно реже встречалась в группе беременных с АФС, получавших сочетанную терапию (25%), по сравнению только со стандартной терапией (75%, $p < 0,05$).



Рисунок 4. Уровень Р-селектина в обследованных группах

Figure 4. Level of P-selectin in the examined groups

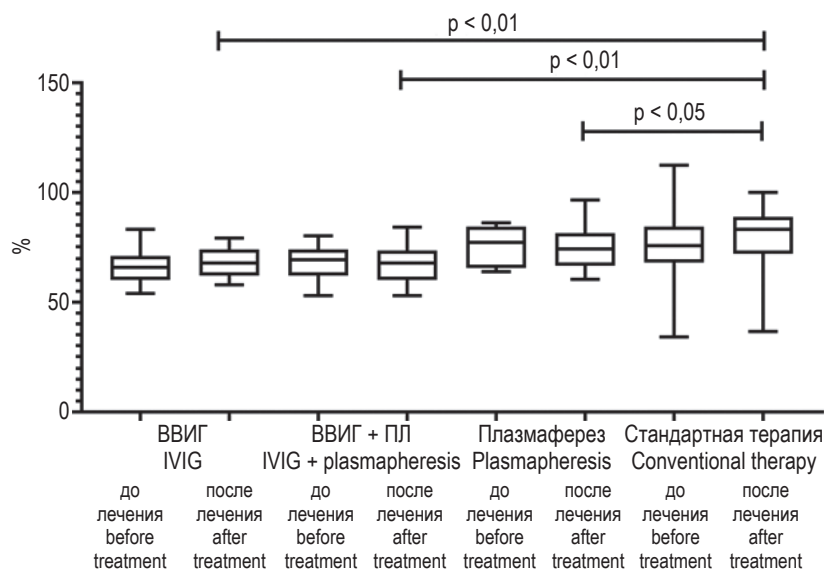


Рисунок 5. Динамика степени агрегации тромбоцитов до и после терапии в исследуемых группах

Figure 5. Dynamics of the degree of platelet aggregation before and after therapy in the study groups

Обсуждение

Исследования в отношении этиологии, патогенеза, клиники и лечения антифосфолипидного синдрома постоянно проводятся уже более 30 лет, и, несмотря на это, в настоящее время остаются нерешенными вопросы поиска оптимального подхода к терапии пациенток с АФС. Решение проблемы лечения пациентов с акушерским антифосфолипидным синдромом, в том числе резистентных к стандартной терапии, которые составляют по данным литературы около 30%, является актуальной и важной задачей в акушерстве [11].

Проведенный в нашем исследовании анализ течения настоящей беременности у пациенток с АФС показал, что частота угрозы прерывания беременности была достоверно выше ($p = 0,03$) в группе беременных с АФС, получавших только традиционную терапию (89,5%), по сравнению с группой с сочетанной терапией (70,3%). Случаи плацентарной недостаточности были диагностированы на основании фиксации при ультразвуковом исследовании плода признаков замедленного роста плода (ЗРП) согласно международным критериям [10, 14]. Выявлена достоверно более высокая частота плацентарной недостаточности в группе беременных с АФС, получавших только традиционную терапию (26,3%), по сравнению с комбинированным лечением (3,7%, $p = 0,03$). Применение сочетанной схемы терапии оказало выраженный клинический эффект, снижая

частоту возникновения осложнений настоящей беременности у пациенток с АФС, в частности угрозы прерывания беременности, плацентарной недостаточности и ЗРП.

По нашим данным было установлено, что достоверно более высокая частота благоприятных исходов беременности — 96,3% (срочные роды) — была в группе пациенток с АФС, получавших сочетанную терапию, по сравнению с только стандартной терапией АФС ($p = 0,014$), и была сопоставима с контрольной группой (97,8%). Показатели состояния новорожденного соответствуют данным по исходам беременности: в группе беременных с АФС, получавших сочетанную терапию, частота недоношенности и гипотрофии плода достоверно ниже по сравнению с группами беременных с АФС, получавших только стандартную терапию и плазмаферез в дополнение к стандартной терапии, и была сопоставима с группой контроля ($p < 0,001$).

В нашем исследовании использование сочетанной терапии у женщин с антифосфолипидным синдромом, включавшей плазмаферез и иммунотерапию иммуноглобулинами для внутривенного введения, приводило к наиболее эффективному снижению титра антифосфолипидных антител (на 58,4%) по сравнению со стандартным лечением ($p < 0,001$) за счет неселективного удаления их из плазмы крови при плазмаферезе, а также за счет возможного подавления синтеза антифосфолипидных антител В-клетками при исполь-

зовании иммуноглобулинов для внутривенного введения.

В проведенном нами исследовании содержание активированных тромбоцитов, экспрессирующих Р-селектин (CD62p), у пациенток с антифосфолипидным синдромом было достоверно выше по сравнению с беременными без антифосфолипидных антител ($p < 0,0029$). Данный факт указывает на активацию тромбоцитарного звена гемостаза антифосфолипидными антителами и подтверждает их роль в патогенезе акушерских осложнений антифосфолипидного синдрома, а также обосновывает необходимость терапевтической коррекции с момента регистрации, в том числе в первом триместре беременности, учитывая данные из инструкции к применению АСК в Российской Федерации и международный опыт применения АСК в ранние сроки беременности [5, 7].

Данные гистологического исследования плаценты в нашем исследовании согласуются с клиническими данными и показывают наибольшую

эффективность сочетанной терапии по сравнению с другими методами лечения АФС.

Полученные нами данные свидетельствуют о положительном влиянии суммирования эффектов от различных видов терапии, что, возможно, позволяет воздействовать на большее количество звеньев патогенеза акушерских осложнений при АФС.

Заключение

Таким образом, комбинированный терапевтический подход позволяет добиться максимальной частоты срочных родов, а также наиболее низких показателей патологии новорожденного в группе беременных с АФС, сопоставимых с показателями в контрольной группе. Требуются дальнейшие исследования терапевтических возможностей комбинированного лечения у пациенток с различными формами репродуктивной патологии с иммунологическими причинами, сопровождающиеся появлением аутоантител различных специфичностей.

Список литературы / References

1. Аржанова О.Н., Сельков С.А., Савичева А.М., Комаров Е.А., Беспалова О.Н., Плужникова Т.А., Капустин Р.В., Корнюшина Е.А. Невынашивание беременности : профилактика и лечение: методические рекомендации. 3-е изд. СПб.: Эко-Вектор, 2019. 94 с. [Arzhanova O.N., Selkov S.A., Savicheva A.M., Komarov E.A., Bepalova O.N., Pluzhnikova T.A., Kapustin R.V., Korniyushina E.A. Miscarriage: prevention and treatment: guidelines. 3rd ed]. St. Petersburg: Eko-Vektor, 2019. 94 p.
2. Сельков С.А., Соколов Д.И., Чепанов С.В. Иммунорегуляторные эффекты иммуноглобулинов для внутривенного введения // Медицинская иммунология, 2013. Т. 15, № 1. С. 5-12. [Selkov S.A., Sokolov D.I., Chepanov S.V. Immunoregulatory effects of intravenous immunoglobulins. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2013, Vol. 15, no. 1, pp. 5-12. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2013-1-5-12.
3. Чепанов С.В., Соколов Д.И., Шляхтенко Т.Н., Капустин Р.В., Окорокова Л.А., Белякова К.Л., Сельков С.А. Экспериментальное обоснование эндотелиопротективного эффекта иммуноглобулинов для внутривенного введения при акушерской патологии // Акушерство и Гинекология, 2016. № 5. С. 82-89. [Chepanov S.V., Sokolov D.I., Shlyakhtenko T.N., Kapustin R.V., Okorokova L.S., Belyakova K.L., Selkov S.A. Experimental rationale for the endothelial protective effect of intravenous immunoglobulins in obstetric disease. *Akusherstvo i ginekologiya = Obstetrics and Gynecology*, 2016, no. 5, pp. 82-88. (In Russ.)]
4. Привычный выкидыш: клинические рекомендации / Российское общество акушеров-гинекологов. М., 2022. 52 с. Режим доступа: https://roag-portal.ru/recommendations_obstetrics. [Miscarriage. Clinical recommendations / Russian Society of Obstetricians and Gynecologists]. Moscow, 2022. 52 p. Available at: https://roag-portal.ru/recommendations_obstetrics.
5. Andreoli L., Bertias G.K., Agmon-Levin N., Brown S., Cervera R., Costedoat-Chalumeau N., Doria A., Fischer-Betz R., Forger F., Moraes-Fontes M.F., Khamashta M., King J., Lojcono A., Marchiori F., Meroni P.L., Mosca M., Motta M., Ostensen M., Pamfil C., Tincani A. EULAR recommendations for women's health and the management of family planning, assisted reproduction, pregnancy and menopause in patients with systemic lupus erythematosus and/or antiphospholipid syndrome. *Ann. Rheum. Dis.*, 2017, Vol. 3, no. 76, pp. 476-485.
6. Arachchillage D.R.J., Laffan M. Pathogenesis and management of antiphospholipid syndrome. *Br. J. Haematol.*, 2017, Vol. 2, no. 178, pp. 181-195.

7. Bender Atik R., Christiansen O.B., Elson J., Kolte A.M., Lewis S., Middeldorp S., Mcheik S., Peramo B., Quenby S., Nielsen H.S., van der Hoorn M.-L., Vermeulen N., Goddijn M. ESHRE guideline: recurrent pregnancy loss: an update in 2022. *Hum. Reprod. Open*, 2023, Vol. 2023, no. 1, hoad002. doi: 10.1093/hropen/hoad002.
8. Capecchi M., Abbattista M., Ciavarella A., Uhr M., Novembrino C., Martinelli I. Anticoagulant therapy in patients with antiphospholipid syndrome. *J. Clin. Med.*, 2022, Vol. 23, no. 11, 6954. doi: 10.3390/jcm11236984.
9. Hoxha A., Tormene D., Campello E., Simioni P. Treatment of refractory/high-risk pregnancies with antiphospholipid syndrome: a systematic review of the literature. *Front. Pharmacol.*, 2022, Vol. 19, no. 13, 849692. doi: 10.3389/fphar.2022.849692.
10. Kiserud T., Benachi A., Hecher K., Perez R.G., Carvalho J., Piaggio G., Platt L.D.P. The World Health Organization fetal growth charts: concept, findings, interpretation, and application. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 2018, Vol. 218, no. 2S, pp. S619-S629.
11. Latino J.O., Udry S., Aranda F.M., Perés Wingeyer S.D.A., Fernández Romero D.S., de Larrañaga G.F. Pregnancy failure in patients with obstetric antiphospholipid syndrome with conventional treatment: the influence of a triple positive antibody profile. *Lupus*, 2017, Vol. 26, no. 9, pp. 983-988.
12. Miyakis S., Lockshin M.D., Atsumi T., Branch D.W., Brey R.L., Cervera R., Derkesen R.H.W.M., de Groot P.G., Koike T., Meroni P.L., Reber G., Shoenfeld Y., Tincani A., Vlachoyiannopoulos P.G., Krilis S.A. International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome (APS). *J. Thromb. Haemost.*, 2006, Vol. 4, no. 2, pp. 295-306.
13. Mormile I., Granata F., Punziano A., de Paulis A., Rossi F.W. Immunosuppressive treatment in antiphospholipid syndrome: is it worth it? *Biomedicines*, 2021, Vol. 9, no. 2, 132. doi: 10.3390/biomedicines9020132.
14. Papageorgiou A.T., Ohuma E.O., Altman D.G., Todros T., Ismail L.C., Lambert A., Jaffer Y.A., Bertino E., Gravett M.G., Purwar M., Noble J.A., Pang R., Victora C.G., Barros F.C., Carvalho M., Salomon L.J., Bhutta Z.A., Kennedy S.H., Villar J. International standards for fetal growth based on serial ultrasound measurements: the Fetal Growth Longitudinal Study of the INTERGROWTH-21st Project. *Lancet*, 2014, Vol. 384, no. 9946, pp. 869-879.
15. Stephenson M.D., Kutteh W.H., Purkiss S., Librach C., Schultz P., Houlihan E., Liao C. Intravenous immunoglobulin and idiopathic secondary recurrent miscarriage: a multicentered randomized placebo-controlled trial. *Hum. Reprod.*, 2010, Vol. 25, no. 9, pp. 2203-2209.
16. Tenti S., Chesi S., Guidelli G.M., Galeazzi M., Fioravanti A. Intravenous immunoglobulins and antiphospholipid syndrome: How, when and why? A review of the literature. *Autoimmun. Rev.*, 2016, Vol. 15, no. 3, pp. 226-235.
17. Yang X., Meng T. Is there a role of intravenous immunoglobulin in immunologic recurrent pregnancy loss? *J. Immunol. Res.*, 2020, Vol. 2020, 6672865. doi: 10.1155/2020/6672865.

Авторы:

Орлова Е.С. — врач — акушер-гинеколог, заведующая акушерским физиологическим отделением ФГБНУ «Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии имени Д.О. Отта», Санкт-Петербург, Россия

Чепанов С.В. — к.м.н., старший научный сотрудник группы протеомной иммунорегуляции отдела иммунологии и межклеточных взаимодействий ФГБНУ «Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии имени Д.О. Отта», Санкт-Петербург, Россия

Authors:

Orlova E.S., Obstetrician-Gynecologist, Head, Obstetric Physiology Department, D. Ott Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductology, St. Petersburg, Russian Federation

Chepanov S.V., PhD (Medicine), Senior Research Associate, Proteom Immunoregulation Group, Department of Immunology and Intercellular Interactions D. Ott Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductology, St. Petersburg, Russian Federation

Зайнулина М.С. — д.м.н., профессор, главный врач СПб ГБУЗ «Родильный дом № 6 имени профессора В.Ф. Снегирева»; профессор кафедры акушерства, гинекологии и репродуктологии ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Zainulina M.S., PhD, MD (Medicine), Professor, Chief Physician, V. Snegirev Maternity Hospital No. 6; Professor, Department of Obstetrics, Gynecology and Reproductology, First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

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

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 25.07.2023
Принята к печати 05.10.2023

Received 25.07.2023
Accepted 05.10.2023

ОПРЕДЕЛЕНИЕ Т-КЛЕТОЧНОГО ИММУННОГО ОТВЕТА К КОРОНАВИРУСУ SARS-CoV-2, ОСНОВАННОГО НА ИНДУКЦИИ ВЫРАБОТКИ γ -ИНТЕРФЕРОНА СПЕЦИФИЧЕСКИМИ Т-ЛИМФОЦИТАМИ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ПРИ ИХ СТИМУЛЯЦИИ ВИРУСНЫМ АНТИГЕНОМ

Черепович Б.С.¹, Кудряшова А.М.¹, Панкратьева Л.Л.²,
Боголюбова А.В.³, Мануйлов В.А.⁴, Гушчин В.А.⁴, Почтовый А.А.⁴,
Борисова О.В.¹, Свитич О.А.¹

¹ ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова», Москва, Россия

² ГБУЗ «Городская клиническая больница № 67 имени Л.А. Ворохобова Департамента здравоохранения города Москвы», Москва, Россия

³ ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

⁴ ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Резюме. Целью данной работы было исследование способности Т-клеток, иммунных к SARS-CoV-2 людей, продуцировать IFN γ , являющийся одним из маркеров Т-клеточного иммунитета, в ответ на стимуляцию пептидным пулом в цельной крови.

Исследовали образцы цельной крови 80 добровольцев с известным анамнезом, полученные в 2021 году и 258 добровольцев, полученные в сентябре – октябре 2022 года. В данном исследовании использовали 2 метода – 1) твердофазный иммуноферментный анализ для определения антител класса G к RBD SARS-CoV-2; 2) IGRA-тест, для определения IFN γ , вырабатываемого антиген-специфическими лимфоцитами в ответ на их стимуляцию вирусным антигеном.

Адрес для переписки:

Черепович Богдан Сергеевич
ФГБНУ «Научно-исследовательский институт
вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова»
115088, Россия, Москва, ул. 1-я Дубровская, 15.
Тел.: 8 (495) 674-54-97.
E-mail: bogdancherepovich@mail.ru

Address for correspondence:

Bogdan S. Cherepovich
I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera
15 1st Dubrovskaya St
Moscow
115088 Russian Federation
Phone: +7 (495) 674-54-97.
E-mail: bogdancherepovich@mail.ru

Образец цитирования:

Б.С. Черепович, А.М. Кудряшова, Л.Л. Панкратьева,
А.В. Боголюбова, В.А. Мануйлов, В.А. Гушчин,
А.А. Почтовый, О.В. Борисова, О.А. Свитич
«Определение Т-клеточного иммунного ответа
к коронавирусу SARS-CoV-2, основанного на
индукции выработки γ -интерферона специфическими
Т-лимфоцитами периферической крови при их
стимуляции вирусным антигеном» // Медицинская
иммунология, 2025. Т. 27, № 1. С. 45-56.
doi: 10.15789/1563-0625-DOT-3007

© Черепович Б.С. и соавт., 2025
Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

B.S. Cherepovich, A.M. Kudryashova, L.L. Pankratieva,
A.V. Bogoliybova, V.A. Manuilov, V.A. Gushchin,
A.A. Pochtovyi, O.V. Borisova, O.A. Svitich “Determination of
T cell immune response to SARS-CoV-2 coronavirus based on
induced γ -interferon production by specific T cells upon their
stimulation by viral antigen”, Medical Immunology (Russia)/
Meditsinskaya Immunologiya, 2025, Vol. 27, no. 1, pp. 45-56.
doi: 10.15789/1563-0625-DOT-3007

© Cherepovich B.S. et al., 2025
The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License
DOI: 10.15789/1563-0625-DOT-3007

Параметры IGRA-теста были оптимизированы на выборке из 80 образцов добровольцев. Было определено пороговое значение уровня IFN γ (4,85 пг/мл), диагностическая специфичность – 100% (80,6-100%); диагностическая чувствительность – 92,19% (83-96,62%), ДИ 95%.

Затем было проведено исследование выборки из 258 добровольцев, у 28,7% которых по результатам IGRA-теста превышения порогового уровня IFN γ после стимуляции выявлено не было, при этом у всех добровольцев были обнаружены антитела класса G к RBB SARS-CoV-2. Корреляции между уровнем антител и уровнем интерферонового ответа во всей группе выявлено не было. При сравнении уровней антител IgG и амплитуды превышения уровня IFN γ над базовым уровнем у групп выборки, отличающихся временем последней вакцинации медианные значения параметров были незначительно выше для части выборки, прошедшей ревакцинацию за 1-2 месяца до проведения исследования, при этом достоверная разницы между двумя выборками была выявлена только при оценке IFN γ , пг/мл (критерий Манна–Уитни, $p = 0,0321$).

По результатам исследования можно предположить, что все пациенты выборки, прошедшие вакцинацию и перенесшие инфекцию COVID-19, имели гуморальный иммунитет, но примерно у трети из них отсутствовал клеточный иммунитет к SARS-CoV-2. Корреляции между уровнем антител и уровнем интерферонового ответа выявлено не было (критерий Спирмена). Показано, что ревакцинация в предшествующие 1-2 месяца способствовала увеличению амплитуды интерферонового ответа.

Ключевые слова: COVID-19, SARS-CoV-2, твердофазный ИФА, IFN γ , IGRA-тест, Т-клеточный иммунитет

DETERMINATION OF T CELL IMMUNE RESPONSE TO SARS-CoV-2 CORONAVIRUS BASED ON INDUCED γ -INTERFERON PRODUCTION BY SPECIFIC T CELLS UPON THEIR STIMULATION BY VIRAL ANTIGEN

Cherepovich B.S.^a, Kudryashova A.M.^a, Pankratieva L.L.^b,
Bogoliybova A.V.^c, Manuilov V.A.^d, Gushchin V.A.^d, Pochtovyi A.A.^d,
Borisova O.V.^a, Svitich O.A.^a

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

^b L. Vorokhobov City Clinical Hospital No. 67, Moscow, Russian Federation

^c National Medical Research Center of Hematology, Moscow, Russian Federation

^d N. Gamaleya National Research Center of Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation

Abstract. The aim of this work was to study the capacity of human T cells immune for SARS-CoV-2, to produce IFN γ , a marker of T cell immunity, in response to stimulation by a peptide pool in whole blood. Eighty samples of whole blood were received from the volunteers with known medical history in 2021, and 258 volunteers were examined in September-October 2022. In this study, 2 detection techniques were used, i.e.: (1) solid-phase enzyme immunoassay to determine antibodies of class G to RBD SARS-CoV-2; (2) IGRA test to determine IFN γ produced by antigen-specific lymphocytes in response to their stimulation by viral antigen. The parameters of the IGRA test were optimized with a sample of 80 specimens from the volunteers. The threshold value of the IFN γ level was determined (4.85 pg/mL), at the diagnostic specificity of 100% (80.6-100), and diagnostic sensitivity of 92.19% (83-96.6%), 95% CI. The study was further continued with a sample of 258 volunteers. Of them, 28.7%, did not exceed the threshold level of IFN γ after stimulation, according to results of the IGRA test. Meanwhile, all volunteers exhibited class G antibodies to RBB SARS-CoV-2. There was no correlation between the levels of antibodies and the level of interferon response in the entire group. When comparing IgG antibody levels and the amplitude of IFN γ (if exceeding the baseline level) in the groups differing in the time of the last vaccination, the median values of the parameters were slightly higher for the subgroup which was revaccinated 1-2 months before the study, while a significant difference between these subgroups was revealed only when evaluating IFN γ , pg/mL (Mann–Whitney criterion, $p = 0.0321$).

According to the results of the study, it can be assumed that all the patients in the sample who were vaccinated and had COVID-19 infection, showed a humoral immune response. However, about a third of them lacked

cellular immunity to SARS-CoV-2. There was no correlation between the levels of antibodies and the level of interferon response (Spearman's criterion). Revaccination within previous 1-2 months has been shown to promote the increased amplitude of interferon response.

Keywords: COVID-19, SARS-CoV-2, ELISA test, IFN γ , IGRA-test, T cell immunity

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 20-15-00395.

Введение

Для контроля за эпидемическим процессом COVID-19 важно понимать, какую роль адаптивный иммунитет играет в обеспечении защиты против реинфекции. Показано, что титры антител IgG коррелируют с защитой организма от вируса SARS-CoV-2 [8, 11, 14] и обеспечивают ее даже в отсутствие антиген-специфических Т-лимфоцитов, что было подтверждено как на моделях животных [6, 29], так и при исследовании иммунитета у людей [14, 29]. Специфические Т-клетки присутствуют у большинства инфицированных SARS-CoV-2 лиц, которые перенесли инфекцию без серьезных осложнений [9, 20, 21, 23, 26], а устойчивый ответ CD8⁺Т-клеток связан с легким течением COVID-19 у онкологических пациентов с дефектами системы антительного ответа [1]. Важно отметить, что клеточный иммунитет выполняет важную роль в контексте несформировавшегося гуморального ответа [13, 14, 29] или на ранних стадиях после вакцинации до сероконверсии [7, 16]. Так, выраженный клеточный ответ уже через 14 дней после введения векторной вакцины, содержащей экспрессируемый ген Spike белка SARS-CoV-2, показан в работе Sheetikov S.A. и соавт. [24].

Уровень антител к SARS-CoV-2 со временем снижается, и они могут не обнаруживаться уже через 6 месяцев после заражения [25, 31] или после вакцинации [2], в то время как Т-клетки сохраняются долгое время [3, 4, 31]. Информация, полученная в результате изучения иммунитета к родственным SARS-CoV-2 вирусам, таким как SARS-CoV-1 и Ближневосточному респираторному синдрому (MERS) [18], показала, что клеточные иммунные реакции против этих вирусов сохраняются в течение более длительных периодов времени по сравнению с антителами, что можно экстраполировать и на SARS-CoV-2. Так, в работе Le Bert N. и соавт. [10] было показано, что у людей, инфицированных SARS-CoV-1, Т-клеточные реакции наблюдались в течение 17 лет. В работе Zornikova K.V. и соавт. [30] продемонстрировано, что спустя месяц после перенесенного заболевания 88% людей имели детектируемый уровень IgG к SARS-CoV-2, однако через 8 месяцев их доля снизилась до 58%. Т-клеточный

же ответ обнаруживался у 94% и 80% пациентов спустя 1 и 8 месяцев после инфекции соответственно.

Кроме того, защитные свойства гуморального иммунитета сильно варьируют в зависимости от доминирующего в данный момент штамма SARS-CoV-2, поскольку IgG чрезвычайно специфичны к эпитопам RBD, обуславливающим их протективное, вируснейтрализующее действие. В работе Tarke A. и соавт. [27] показано, напротив, что Т-лимфоциты людей, иммунизированных Spike-белком варианта Ухань, оставались антиген-специфичными по отношению к вариантам B.1.1.7, B.1.351, P.1, и CAL.20C, а доля иммунодоминантных Т-клеточных эпитопов, изменяемых характерными для этих вариантов мутациями, составляет всего 3-7%.

Таким образом, для понимания механизмов защиты от вируса SARS-CoV-2 важно изучать в равной степени как гуморальное, так и клеточное звенья иммунитета. Однако если тесты для определения антител широко доступны, то в случае с Т-клеточным иммунитетом к SARS-CoV-2 возникают сложности. Это связано с тем, что Т-клетки, специфичные для определенного патогена, составляют незначительную долю от общего количества лимфоцитов (часто менее 1-3%), присутствующих в крови, и для их изучения необходимо применять сложные функциональные анализы, которые, помимо прочего, требуют сохранения жизнеспособности Т-клеток во время анализа. Альтернативой этим сложным исследованиям, таким как ELISpot или проточная цитометрия, является метод, известный как interferon-gamma release assay (IGRA), в котором стимулирующие антигены (рекомбинантные белки или синтетические пептиды, соответствующие известным эпитопам) напрямую добавляются в цельную кровь. Распознавание антигенов специфичными Т-лимфоцитами индуцирует секрецию цитокинов, значительную долю которых составляет γ -интерферон (IFN). Последний по завершении стимуляции определяют в плазме крови количественно при помощи иммуноферментного анализа. IGRA-анализ обычно применяется для диагностики туберкулезной инфекции [5], однако было показано, что он позволяет измерять наличие специфичных к SARS-CoV-2 Т-клеток у бессимптомных [9] и симптоматич-

ных SARS-CoV-2-инфицированных [15, 17] пациентов.

Целью данной работы было исследование способности Т-клеток иммунных к SARS-CoV-2 людей продуцировать IFN γ , который является одним из маркеров Т-клеточного иммунитета, в ответ на стимуляцию пептидным пулом в цельной крови (IGRA-тест). Результаты обоснования выбора пептидного пула представлены в работе [28]. В ней были идентифицированы 73 иммуногенных эпитопа различных белков SARS-CoV-2, которые показали высокую диагностическую специфичность в части определения антиген-специфичных лимфоцитов без потери чувствительности по сравнению с полноразмерными антигенами в ELISpot-тесте. Представленный в работе [28], диагностический тест продемонстрировал 95% специфичность в клиническом исследовании на 119 иммунизированных (вакцинированных или выздоравливающих) и 101 наивном пациентах.

В данной работе на основе данного пула пептидов был сконструирован IGRA-тест, при помощи которого была исследована выборка образцов крови людей, которые были вакцинированы препаратом «Гам-Ковид-Вак», и/или инфицированы SARS-CoV-2 естественным путем, полученная в сентябре – октябре 2022 года.

Материалы и методы

Образцы

Исследовали образцы цельной гепаринизированной крови 80 добровольцев, полученные в 2021 году и 258 добровольцев, полученные в сентябре – октябре 2022 года. Для всех пациентов известны даты вакцинации и/или постановки диагноза «COVID-19» на основе первого положительного ПЦР-теста. Исследование одобрено локальным этическим комитетом ГБУЗ г. Москвы ГКБ № 67 им. Л.А. Ворохобова ДЗМ.

Использованные реагенты

Рекомбинантные антигены RBD Spike SARS-CoV-2 (ООО «Хайтест», Россия, кат. № 8COV), МоАТ к IFN γ , МоАТ к IFN γ биотинилированные (ООО «Хайтест», Россия), антитела мышинные моноклональные (МоАТ) к IgG человека, конъюгированные с пероксидазой (ООО «Сорбент-Сервис», Россия), пул пептидов (Peptide 2.0 Inc., США), стрептавидин, конъюгированный с пероксидазой хрена (Calbiochem, США), Human Recombinant Interferon Gamma (Thermo Fisher Scientific, США, Cat. No. PHC4031), First WHO International Standard for anti-SARS-CoV-2 immunoglobulin (human) (NIBSC code: 20/136, Dated 17/12/2020), Interferon Gamma (Human, Leukocyte derived), Non-WHO Reference Material (NIBSC code: 82/587).

Определение антител IgG к RBD Spike SARS-CoV-2 производили методом иммуноферментного анализа, как описано в работе [12]. Количественное определение антител проводили с использованием калибраторов, представляющих собой последовательные разведения стандартного образца BO3 (NIBSC code: 20/136). Образец считали содержащим антитела к RBD Spike SARS-CoV-2 при индексе позитивности образца (ИП, т. е. отношении оптической плотности образца в ИФА к средней оптической плотности отрицательного контрольного образца плюс 0,2 о. е., см. [12]) ≥ 1 и содержании антител ≥ 10 BAU/мл.

Проведение IGRA-теста. При проведении IGRA-теста по 1 мл гепаринизированной крови, полученной от одного и того же пациента, вносили в 3 пробирки: 1) содержащую пул пептидов, соответствующих иммунодоминантным Т-клеточным (CD4 $^{+}$, CD8 $^{+}$) эпитопам антигенов SARS-CoV-2 [28]; 2) контрольную, не содержащую никаких стимуляторов; 3) содержащую неспецифический митоген (фитогемагглютинин). Образцы помещали в термостат с температурой $+37 \pm 2$ °C на 24 часа. По завершении инкубации пробирки центрифугировали при 2800 об/мин в течение 10 минут для отделения плазмы крови.

Количественное определение γ -интерферона. Моноклональные антитела к IFN γ в 20 мМ фосфатном буфере pH 7,2 вносили по 100 мкл в концентрации 5 мкг/мл в лунки планшет и выдерживали в течение 18 часов при температуре $+4-8$ °C. Затем удаляли раствор из лунок планшет, планшеты промывали 1 раз дистиллированной водой, вносили по 150 мкл блокирующего раствора, представляющего собой 0,02М фосфатный буферный раствор, содержащий 5% сахарозы, 0,09% казеината натрия, 0,05% Tween 20.

При проведении анализа в лунки планшета (иммуносорбента) вносили по 50 мкл образцов сывороток или плазмы крови, калибровочные образцы, содержащие рекомбинантный IFN γ известной концентрации, аттестованные относительно стандарта Interferon Gamma (Human, Leukocyte derived), Non WHO Reference Material (NIBSC code: 82/587), и 50 мкл конъюгата моноклональных антител к γ -интерферону с пероксидазой хрена в концентрации 3 мкг/мл в 0,02 М фосфатном буферном растворе pH 7,2, содержащем 0,2% бычьего сывороточного альбумина, 0,05% Tween 20, инкубировали 90 минут при температуре $+37 \pm 2$ °C. После отмывки вносили по 100 мкл 33 мМ цитратного буферного раствора pH 4,0, содержащего 0,01% перекиси водорода и 0,5 мМ 3,3',5,5'-тетраметилбензидина. Через 25 минут реакцию останавливали добавлением 100 мкл 2N серной кислоты, измеряли оптиче-

скую плотность (ОП) в двухволновом режиме при основной длине волны 450 нм и длине волны сравнения 680 нм.

Строили график зависимости средних значений ОП разведений контрольных образцов от концентрации калибровочного образца в пг/мл в логарифмических координатах. Диапазон определения находится в интервале от 3,125 пг/мл до 200 пг/мл. По калибровочному графику определяли содержание $\text{IFN}\gamma$ в исследуемых образцах, используя значение ОП для каждого образца. Для них вычисляли разницу $\Delta\text{IFN}\gamma$ (пг/мл) между концентрацией в плазме крови после антигенной стимуляции и без нее.

Статистическая обработка результатов. Образцы анализировали в двух временных точках, и для расчетов использовались средние арифметические значения. Данные анализировали с помощью программного обеспечения GraphPad Prism и программного обеспечения Microsoft Office Excel. Для сравнения групп пациентов использовали Критерий Манна–Уитни. Величина $p < 0,05$ рассматривалась как статистически значимая.

Пороговое значение $\Delta\text{IFN}\gamma$ определяли путем построения ROC-зависимости (Receiver Operator Characteristic) для результатов анализа крови выборки пациентов, иммунных и неиммунных

в отношении SARS-CoV-2 и выбора значения $\Delta\text{IFN}\gamma$, для которого сумма чувствительности и специфичности была максимальной.

Результаты

Первый этап работы был посвящен определению такого уровня интерфероновый ответа на антигенную стимуляцию лимфоцитов крови ($\Delta\text{IFN}\gamma$), который мог быть ассоциирован с наличием или отсутствием предшествующей иммунизации пациента против SARS-CoV-2. С этой целью исследовали образцы от 80 участников с известным медицинским анамнезом (наличие или отсутствие вакцинации, заболевание COVID-19), собранные в период 2021 года, когда еще сохранялась неиммунная прослойка населения. Всего для 16 участников данной группы предполагался «неиммунный» статус (они заявили об отсутствии вакцинации или перенесенного заболевания), а для 64 — «иммунный» (были предоставлены документы, подтверждающие вакцинацию препаратом «Спутник V» или перенесенный COVID-19). Для всех них определяли антитела класса G к RBD SARS-CoV-2, а также изменение уровня $\text{IFN}\gamma$ в плазме крови после стимуляции лимфоцитов ($\Delta\text{IFN}\gamma$).

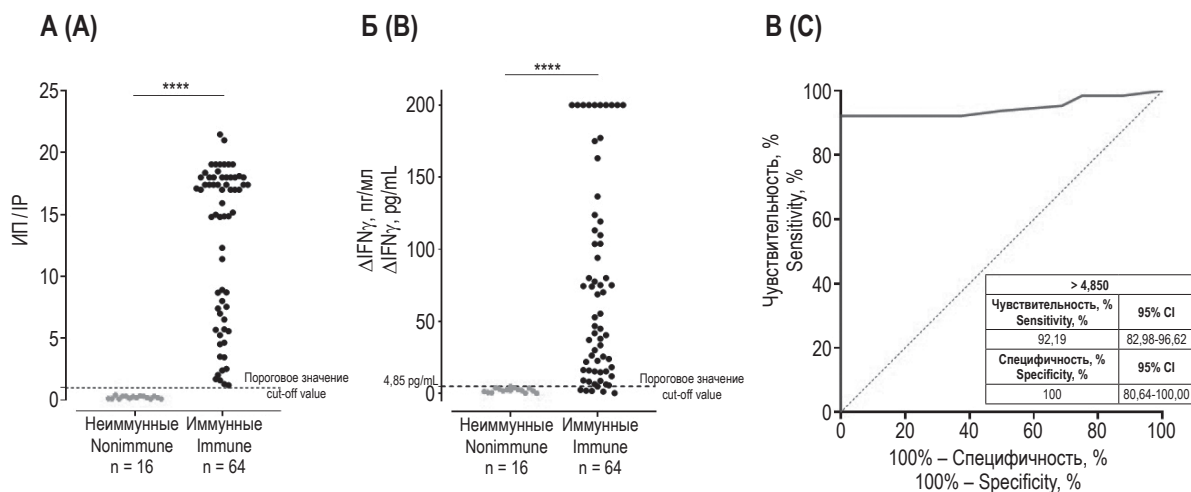


Рисунок 1. А – уровень антител IgG (в относительных единицах ИП, см. раздел «Материалы и методы») в сыворотке крови пациентов с наличием ($n = 64$) или отсутствием ($n = 16$) иммунизации в анамнезе. Пунктирной линией отмечено пороговое значение «положительного результата» ИП = 1 [12]. Б – превышение уровня $\text{IFN}\gamma$ над базовым у тех же пациентов. Пунктирной линией отмечено пороговое значение $\Delta\text{IFN}\gamma$ 4,85 пг/мл (см. пояснения в тексте). **** – достоверная разница в медианных значениях между подгруппами «иммунных» и «неиммунных» (непараметрический критерий Манна–Уитни, $p < 0,0001$). В – кривая ROC результатов IGRA-теста для «иммунных» в сравнении с «неиммунными» донорами

Figure 1. A, the level of IgG antibodies (in relative units of IP, see “Materials and methods”) in the blood serum of patients with a history of immunization ($n = 64$) or absence ($n = 16$). The dotted line marks the cut-off value of the “positive result” of the IP = 1 [12]. B, excess of the level of $\text{IFN}\gamma$ above the in the same patients. The dotted line marks the cut-off value of the $\Delta\text{IFN}\gamma$ of 4.85 pg/mL (see explanations in the text). ****, significant difference in median values between the subgroups of “immune” and “nonimmune” (nonparametric Mann–Whitney criterion, $p < 0.0001$). C, the ROC curve of the IGRA test results for “immune” versus “nonimmune” donors

Результаты определения антител класса G к RBD SARS-CoV-2 и изменение уровня IFN γ в плазме крови после стимуляции по сравнению с исходным уровнем (в отрицательном контрольном образце крови без стимуляции) представлены на рисунках 1А и 1Б соответственно. Следует отметить, что на момент анализа первой группы 80 участников (2021 год) в РФ еще не был доступен международный стандарт IgG к Spike SARS-CoV-2 (NIBSC code: 20/136, Dated 17/12/2020), поэтому результаты определения IgG на рисунке 1А представлены в единицах индекса позитивности (ИП) [12].

На основании полученных данных для выборки пациентов, иммунных и не иммунных в отношении SARS-CoV-2, была построена кривая ROC-зависимости (см. рис. 1В).

Пороговое значение, определяющее достоверно значимое превышение уровня IFN γ после стимуляции над исходным уровнем, определяли как Δ IFN γ , для которого сумма чувствительности и специфичности (т. е. процентной согласованно-

сти выраженности интерфероновой ответа к иммунному статусу в анамнезе) была максимальной. Эта величина составила 4,85 пг/мл, диагностические характеристики разработанного IGRA-теста в части определения иммунитета к SARS-CoV-2 составили:

– диагностическая специфичность – 100% (80,6-100%; ДИ 95%)

– диагностическая чувствительность – 92,19% (82,3-96,6%; ДИ 95%).

На втором этапе работы было проведено исследование выборки из 258 добровольцев, образцы цельной крови которых были получены в сентябре – октябре 2022 года. Характеристика выборки пациентов представлена в таблице 1.

Для всех пациентов второй группы также определяли антитела класса G к RBD SARS-CoV-2, и уровень интерфероновой ответа на стимуляцию лимфоцитов пептидным пулом. Результаты представлены на рисунке 2.

Во всех образцах были выявлены антитела класса G к RBD SARS-CoV-2. По результатам

ТАБЛИЦА 1. ОБЩИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ 258 ПАЦИЕНТОВ

TABLE 1. GENERAL CHARACTERISTICS OF 258 PATIENTS

Характеристика Characteristics	Фактор Factor	Общее General	Вакцинация «Спутник V» Vaccination "Sputnik V"	COVID-19 в анамнезе COVID-19 in the anamnesis
Доноры Donors	Количество Quantity	258	258 (100%)	198 (76,7%)
Возраст Age	Медиана возраста Диапазон (мин-макс) Median age Range (min-max)	43 19-73	43 19-73	43 19-73
Пол Sex	Муж. Жен. Male Female	70 (27,1%) 188 (72,9%)	70 (27,1%) 188 (72,9%)	48 (68%) 150 (80%)

ТАБЛИЦА 2. КОРРЕЛЯЦИЯ МЕЖДУ УРОВНЕМ АНТИТЕЛ КЛАССА G К RBD SARS-CoV-2 И АМПЛИТУДОЙ ПРЕВЫШЕНИЯ УРОВНЯ IFN γ НАД БАЗОВЫМ УРОВНЕМ ДЛЯ ВЫБОРКИ ИЗ 258 ОБРАЗЦОВ, КРИТЕРИЙ СПИРМЕНА

TABLE 2. CORRELATION BETWEEN THE LEVEL OF ANTIBODIES OF CLASS G TO RBD SARS-CoV-2 AND THE AMPLITUDE OF THE EXCESS OF THE LEVEL OF IFN γ ABOVE THE BASELINE LEVEL FOR A SAMPLE OF 258 SAMPLES, SPEARMAN'S CRITERION

	BAU/mL v. Δ IFN γ
Коэффициент корреляции (Spearman r) Correlation coefficient (Spearman r)	-0,03021
95% доверительный интервал/ 95% confidence interval	-0,2957-0,2396
p (two-tailed)	0,8235

IGRA-теста у 28,7% пациентов с гибридным (вакцина плюс перенесенное заболевание) или поствакцинальным иммунитетом значимого (более 4,85 пг/мл) превышения уровня $IFN\gamma$ после стимуляции выявлено не было.

По результатам проведенного статистического анализа (критерий Спирмена) не выявлено корреляции между уровнем антител и уровнем интерферонового ответа во всей группе из 258 пациентов (табл. 2).

Сравнение уровня антител IgG и интерферонового ответа ($\Delta IFN\gamma$) в группах выборки, отличающихся временем, прошедшим от последней вакцинации, представлены на рисунке 3. В зависимости от времени последней вакцинации все образцы были разделены на две группы: образцы пациентов, прошедших ревакцинацию за 1-2 месяца до взятия крови, и остальные.

Медианные значения обоих параметров незначительно выше для части выборки, прошед-

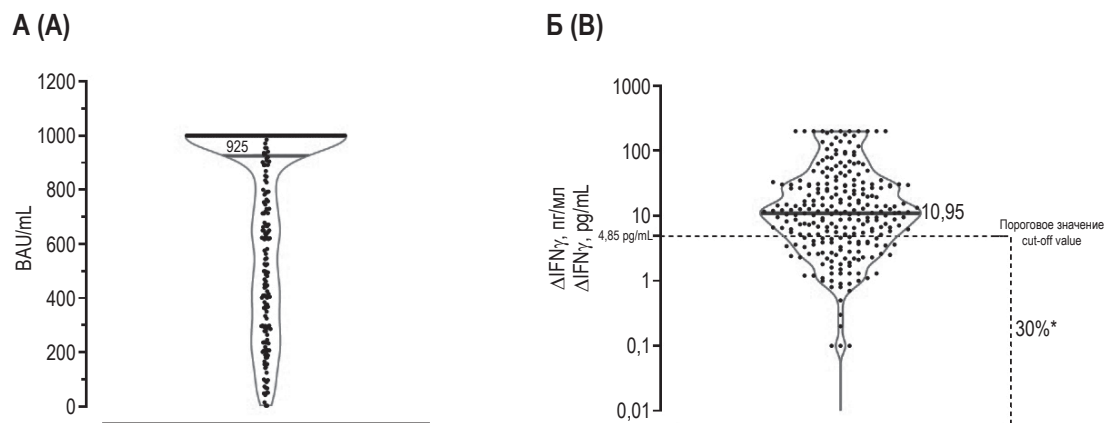


Рисунок 2. Характеристика 258 образцов по двум параметрам: А – уровень антител IgG в сыворотке крови (BAU/мл); Б – превышение уровня $IFN\gamma$ над базовым уровнем 4,85 пг/мл в IGRA-тесте (по оси Y шкала логарифмическая)

Figure 2. Characteristics of 258 samples according to two parameters: A, the level of IgG antibodies in blood serum (BAU/mL); B, the excess of the level of $IFN\gamma$ above the baseline level of 4.85 pg/mL in the IGRA-test (logarithmic scale along the Y axis)

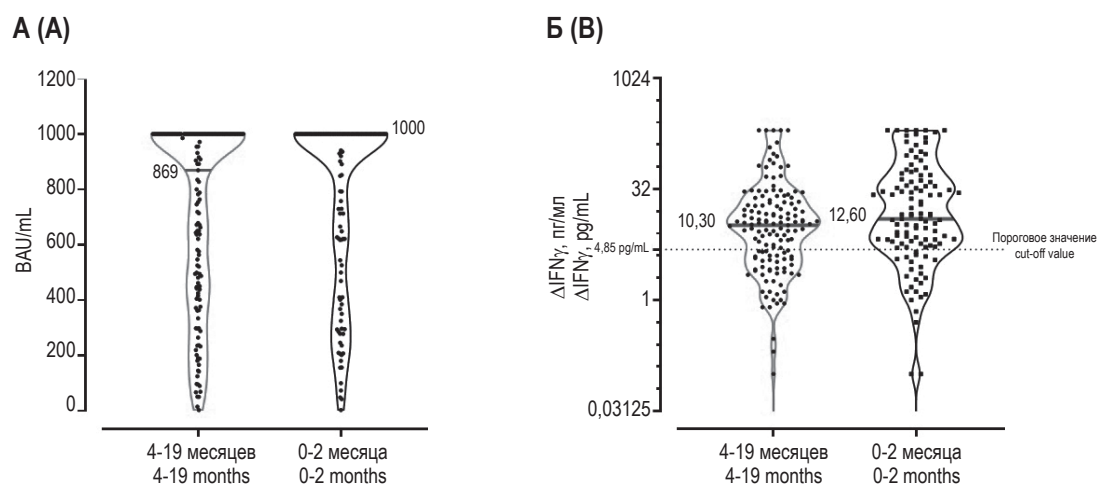


Рисунок 3. Характеристика 258 образцов по двум параметрам в зависимости от времени, прошедшего после последней вакцинации до взятия крови. А – уровень антител IgG и их медианное значение. Б – превышение уровня $IFN\gamma$ над базовым уровнем и их медианное значение (по оси Y шкала логарифмическая)

Figure 3. Characteristics of 258 samples according to two parameters, depending on the time elapsed after the last vaccination before blood collection. A, IgG antibody levels and their median value. B, the excess of the level of $IFN\gamma$ above the baseline level and their median value (logarithmic scale along the Y axis)

шей ревакцинацию за 1-2 месяца до проведения исследования, при этом достоверная разницы между двумя выборками была выявлена только при оценке $\Delta IFN\gamma$, пг/мл (критерий Манна–Уитни, $p = 0,0321$).

Обсуждение

Следует отметить, что пороговое значение, определяющее достоверно значимое превышение уровня $IFN\gamma$ после стимуляции над исходным уровнем, было проведено на ограниченной выборке, включающей всего шестнадцать не иммунных образцов. Здесь, однако, дальнейшие исследования столкнулось с объективными сложностями. За время оптимизации метода определения Т-клеточного иммунитета, в связи с широкими программами вакцинации населения и вспышкой заболеваемости вариантом «Омикрон» SARS-CoV-2 в декабре – феврале 2022 года, доля людей с наивным иммунным статусом в отношении SARS-CoV-2 резко сократилась.

Как было показано (рис. 1В и комментарии к нему), диагностические характеристики разработанного IGRA-теста в части определения иммунитета к SARS-CoV-2 составили (ДИ 95%): диагностическая специфичность – 100% (80,6–100%); диагностическая чувствительность – 92,19% (83–96,6%). Иными словами, в нашем исследовании люди, демонстрирующие в разработанном IGRA-тесте интерфероновый ответ на уровне 4,85 пг/мл и более, с вероятностью 92,19% (ДИ 95%: 83–96,6%) попадали в когорту «иммунных»; люди с интерфероновым ответом менее 4,85 пг/мл в 100% случаев (ДИ 95%: 80,6–100%) попадали в когорту «неиммунных». В рамках и терминологии следующего этапа исследования первых классифицировали как имеющих клеточный иммунный ответ к SARS-CoV-2, вторых, соответственно, – как не имеющих такового.

Ориентируясь на определенное пороговое значение $\Delta IFN\gamma$, на целевой выборке из 258 пациентов, вакцинированных «Спутник V» (75,2% получили 3–4 дозы вакцины), было оценено количество пациентов с достоверным превышением уровня $IFN\gamma$ после стимуляции над исходным уровнем, т. е. наличием Т-клеточного ответа. Это количество составило 71,3%, и у этих пациентов можно предполагать наличие специфического Т-клеточного иммунитета. При этом в части выборки с гибридным иммунитетом (наличие в анамнезе заболевания COVID-19 и вакцинации) количество пациентов с достоверным превы-

шением уровня $IFN\gamma$ составило 73,7%, что соответствует литературным данным, в которых говорится, что специфические Т-клетки, продуцирующие $IFN\gamma$, присутствовали у двух третей пациентов через год после COVID-19 [19]. У доноров с поствакцинальным иммунитетом этот процент составил 63,3%, однако достоверной разницы между двумя выборками нет (критерий Манна–Уитни, $p = 0,0782$).

Во всех образцах были выявлены антитела класса G к RBD SARS-CoV-2. Таким образом, можно предположить, что все пациенты выборки имели гуморальный иммунитет, но примерно у трети из них отсутствовал клеточный иммунитет к SARS-CoV-2. По результатам проведенного статистического анализа (критерий Спирмена) не выявлено корреляции между уровнем антител и уровнем интерфероновой ответа во всей выборке из 258 пациентов (табл. 2).

При сравнении уровней антител IgG и амплитуды превышения уровня $IFN\gamma$ над базовым уровнем у групп выборки, отличающихся временем последней вакцинации (рис. 3), показано что, ревакцинация в предшествующие 1-2 месяца способствовала увеличению амплитуды интерфероновой ответа, однако вопрос о влиянии этого уровня на протективность остается открытым, и обсуждается в ограниченном количестве публикаций [22].

Следует отметить, что поиски корреляций между параметрами ветвей иммунитета и установление протективного уровня сильно осложняются и имеют ограниченное значение из-за гетерогенности популяционного иммунитета, на который оказывают влияние такие факторы, как тип вакцины, число доз вакцины, время иммунизации и тип циркулирующего варианта SARS-CoV-2.

Заключение

По результатам исследования можно предположить, что все пациенты выборки, прошедшие вакцинацию и перенесшие инфекцию COVID-19, имели гуморальный иммунитет, но примерно у трети из них отсутствовал клеточный иммунитет к SARS-CoV-2. Корреляции между уровнем антител и уровнем интерфероновой ответа выявлено не было (критерий Спирмена). Показано, что ревакцинация в предшествующие 1-2 месяца способствовала увеличению амплитуды интерфероновой ответа.

Список литературы / References

1. Bange E.M., Han N.A., Wileyto P., Kim J.Y., Gouma S., Robinson J., Greenplate A.R., Hwee M.A., Porterfield F., Owoyemi O., Naik K., Zheng C., Galantino M., Weisman A.R., Ittner C.A.G., Kugler E.M., Baxter A.E., Oniyide O., Agyekum R.S., Dunn T.G., Jones T.K., Giannini H.M., Weirick M.E., McAllister C.M., Babady N.E., Kumar A.,

Widman A.J., DeWolf S., Boutemine S.R., Roberts C., Budzik K.R., Tollett S., Wright C., Perloff T., Sun L., Mathew D., Giles J.R., Oldridge D.A., Wu J.E., Alanio C., Adamski S., Garfall A.L., Vella L.A., Kerr S.J., Cohen J.V., Oyer R.A., Massa R., Maillard I.P., Maxwell K.N., Reilly J.P., Maslak P.G., Vonderheide R.H., Wolchok J.D., Hensley S.E., Wherry E.J., Meyer N.J., DeMichele A.M., Vardhana S.A., Mamtani R., Huang A.C. CD8⁺ T cells contribute to survival in patients with COVID-19 and hematologic cancer. *Nat. Med.*, 2021, Vol. 27 no. 7, pp. 1280-1289.

2. Bayart J.L., Douxfils J., Gillot C., David C., Mullier F., Elsen M., Eucher C., Van Eeckhoudt S., Roy T., Gerin V., Wieers G., Laurent C., Closset M., Dogné J.M., Favresse J. Waning of IgG, total and neutralizing antibodies 6 months post-vaccination with BNT162b2 in healthcare workers. *Vaccines*, 2021, Vol. 9, 1092. doi: 10.3390/vaccines9101092.

3. Bilich T., Nelde A., Heitmann J.S., Maringer Y., Roerden M., Bauer J., Rieth, J., Wacker M., Peter A., Hörber S., Rachfalski D., Märklin M., Stevanović S., Rammensee H.G., Salih H.R., Walz J.S. T cell and antibody kinetics delineate SARS-CoV-2 peptides mediating long-term immune responses in COVID-19 convalescent individuals. *Sci. Transl. Med.*, 2021, Vol. 13, Iss. 590, eabf7517. doi: 10.1126/scitranslmed.abf7517.

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. Goletti D., Vincenti D., Carrara S., Butera O., Bizzoni F., Bernardini G., Amicosante M., Girardi E. Selected RD1 peptides for active tuberculosis diagnosis: comparison of a gamma interferon whole-blood enzyme-linked immunosorbent assay and an enzyme-linked immunospot assay. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, 2005, Vol. 12, no. 11, pp. 1311-1316.

6. Hasenkrug K.J., Feldmann F., Myers L., Santiago M.L., Guo K., Barrett B.S., Mickens K.L., Carmody A., Okumura A., Rao D., Collins M.M., Messer R.J., Lovaglio J., Shaia C., Rosenke R., van Doremalen N., Clancy C., Saturday G., Hanley P., Smith B.J., Meade-White K., Shupert W.L., Hawman D.W., Feldmann H. Recovery from acute SARS-CoV-2 Infection and development of anamnestic immune responses in T cell-depleted rhesus macaques. *mBio*, 2021, Vol. 12, no. 4, e0150321. doi: 10.1128/mBio.01503-21.

7. Kalimuddin S., Tham C.Y.L., Qui M., de Alwis R., Sim J.X.Y., Lim J.M.E., Tan H.C., Syenina A., Zhang S.L., le Bert N., Tan A.T., Leong Y.S., Yee J.X., Ong E.Z., Ooi E.E., Bertoletti A., Low J.G. Early T cell and binding antibody responses are associated with COVID-19 RNA vaccine efficacy onset. *Med*, 2021, Vol. 2, no. 6, pp. 682-688.e4.

8. Khoury D.S., Cromer D., Reynaldi A., Schlub T.E., Wheatley A.K., Juno J.A., Subbarao K., Kent S.J., Triccas J.A., Davenport M.P. Neutralizing antibody levels are highly predictive of immune protection from symptomatic SARS-CoV-2 infection. *Nat. Med.*, 2021, Vol. 27, no. 7, pp. 1205-1211.

9. Le Bert L.N., Clapham H.E., Tan A.T., Chia W.N., Tham C.Y.L., Lim J.M., Kunasegaran K., Tan L.W.L., Dutertre C.A., Shankar N., Lim J.M.E., Sun L.J., Zahari M., Tun Z.M., Kumar V., Lim B.L., Lim S.H., Chia A., Tan Y.J., Tambyah P.A., Kalimuddin S., Lye D., Low J.G.H., Wang L.F., Wan W.Y., Hsu L.Y., Bertoletti A., Tam C.C. Highly functional virus-specific cellular immune response in asymptomatic SARS-CoV-2 infection. *J. Exp. Med.*, 2021, Vol. 218, no. 5, e20202617. doi: 10.1084/jem.20202617.

10. Le Bert L.N., Tan A.T., Kunasegaran K., Tham C.Y.L., Hafezi M., Chia A., Chng M.H.Y., Lin M., Tan N., Linster M., Chia W.N., Chen M.I., Wang L.F., Ooi E.E., Kalimuddin S., Tambyah P.A., Low J.G., Tan Y.J., Bertoletti A. SARS-CoV-2-specific T cell immunity in cases of COVID-19 and SARS, and uninfected controls. *Nature*, 2020, Vol. 584, no. 57821, pp. 457-462.

11. 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., Screaton 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.

12. Manuylov V., Burgasova O., Borisova O., Smetanina S., Vasina D., Grigoriev I., Kudryashova A., Semashko M., Cherepovich B., Kharchenko O., Kleymentov D., Mazunina E., Tkachuk A., Gushchin V. Avidity of IgG to SARS-CoV-2 RBD as a Prognostic Factor for the Severity of COVID-19 Reinfection. *Viruses*, 2022, Vol. 14, no. 3, 617. doi: 10.3390/v14030617.

13. McMahan K., Yu J., Mercado N.B., Loos C., Tostanoski L.H., Chandrashekar A., Liu J., Peter L., Atyeo C., Zhu A., Bondzie E.A., Dagotto G., Gebre M.S., Jacob-Dolan C., Li Z., Nampanya F., Patel S., Pessaint L., Van Ry A., Blade K., Yalley-Ogunro J., Cabus M., Brown R., Cook A., Teow E., Andersen H., Lewis M.G., Lauffenburger D.A., Alter G., Barouch D.H. Correlates of protection against SARS-CoV-2 in rhesus macaques. *Nature*, 2021, Vol. 590, no. 7847, pp. 630-634.

14. Molodtsov I.A., Kegeles E., Mitin A.N., Mityaeva O., Musatova O.E., Panova A.E., Pashenkov M.V., Peshkova I.O., Alsalloum A., Asaad W., Budikhina A.S., Deryabin A.S., Dolzhikova I.V., Filimonova I.N., Gracheva A.N., Ivanova O.I., Kizilova A., Komogorova V.V., Komova A., Kompantseva N.I., Kucheryavikh E., Lagutkin D.A., Lomakin Y.A., Maleeva A.V., Maryukhnich E.V., Mohammad A., Murugin V.V., Murugina N.E., Navoikova A., Nikonova M.F., Ovchinnikova L.A., Panarina Y., Pinegina N.V., Potashnikova D.M., Romanova E.V., Saidova A.A., Sakr N., Samoilova A.G., Serdyuk Y., Shakirova N.T., Sharova N.I., Sheetikov S.A., Shemetova A.F., Shevkova L.V., Shpektor A.V., Trufanova A., Tvorogova A.V., Ukrainskaya V.M., Vinokurov A.S., Vorobyeva D.A., Zornikova K.V., Efimov G.A., Khaitov M.R., Kofiadi I.A., Komissarov A.A., Logunov D.Y., Naigovzina N.B.,

Rubtsov Y.P., Vasilyeva I.A., Volchkov P., Vasilieva E. SARS-CoV-2 specific T cells and antibodies in COVID-19 protection: a prospective study. *Clin. Infect. Dis.*, 2022, Vol. 75, no. 1, pp. e1-e9.

15. Murugesan K., Jagannathan P., Pham T.D., Pandey S., Bonilla H.F., Jacobson K., Parsonnet J., Andrews J.R., Weiskopf D., Sette A., Pinsky B.A., Singh U., Banaei N. Interferon- γ release assay for accurate detection of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 T-cell response. *Clin. Infect. Dis.*, 2021, Vol. 73, no. 9, pp. e3130-e3132.

16. Painter M.M., Mathew D., Goel R.R., Apostolidis S.A., Pattekar A., Kuthuru O., Baxter A.E., Herati R.S., Oldridge D.A., Gouma S., Hicks P., Dysinger S., Lundgreen K.A., Kuri-Cervantes L., Adamski S., Hicks A., Korte S., Giles J.R., Weirick M.E., McAllister C.M., Dougherty J., Long S., D'Andrea K., Hamilton J.T., Betts M.R., Bates P., Hensley S.E., Grifoni A., Weiskopf D., Sette A., Greenplate A.R., Wherry E.J. Rapid induction of antigen-specific CD4⁺ T cells is associated with coordinated humoral and cellular immunity to SARS-CoV-2 mRNA vaccination. *Immunity*, 2021, Vol. 54, no. 9, pp. 2133-2142.e3.

17. Petrone L., Petruccioli E., Vanini V., Cuzzi G., Najafi Fard S., Alonzi T., Castilletti C., Palmieri F., Gualano G., Vittozzi P., Nicastrì E., Lepore L., Antinori A., Vergori A., Caccamo N., Cantini F., Girardi E., Ippolito G., Grifoni A., Goletti D. A whole blood test to measure SARS-CoV-2-specific response in COVID-19 patients. *Clin. Microbiol. Infect.*, 2021, Vol. 27, no. 2, pp. 286.e7-286.e13.

18. Rabaan A.A., Al-Ahmed S.H., Haque S., Sah R., Tiwari R., Malik Y.S., Dhama K., Yattoo M.I., Bonilla-Aldana D.K., Rodriguez-Morales A.J. SARS-CoV-2, SARS-CoV, and MERS-COV: A comparative overview. *Infez. Med.*, 2020, Vol. 28, no. 2, pp. 174-184.

19. Rank A., Tzortzini A., Kling E., Schmid C., Claus R., Löll E., Burger R., Römmele C., Dhillon C., Müller K., Grl P., Hoffmann R., Grütznier S., Dennehy K.M. One Year after Mild COVID-19: The Majority of Patients Maintain Specific Immunity, But One in Four Still Suffer from Long-Term Symptoms. *J. Clin. Med.*, 2021, Vol. 10, no. 15, 3305. doi: 10.3390/jcm10153305.

20. Rodda L.B., Netland J., Shehata L., Pruner K.B., Morawski P.A., Thouvenel C.D., Takehara K.K., Eggenberger J., Hemann E.A., Waterman H.R., Fahning M.L., Chen Y., Hale M., Rathe J., Stokes C., Wrenn S., Fiala B., Carter L., Hamerman J.A., King N.P., Gale M.Jr., Campbell D.J., Rawlings D.J., Pepper M. Functional SARS-CoV-2-Specific Immune Memory Persists after Mild COVID-19. *Cell*, 2021, Vol. 184, no. 1, pp. 169-183.e17.

21. Rydzynski M.C., Ramirez S.I., Dan J.M., Grifoni A., Hastie K.M., Weiskopf D., Belanger S., Abbott R.K., Kim C., Choi J., Kato Y., Crotty E.G., Kim C., Rawlings S.A., Mateus J., Tse L.P.V., Frazier A., Baric R., Peters B., Greenbaum J., Ollmann S.E., Smith D.M., Sette A., Crotty S. Antigen-Specific Adaptive Immunity to SARS-CoV-2 in Acute COVID-19 and Associations with Age and Disease Severity. *Cell*, 2020, Vol. 183, no. 4, pp. 996-1012.e19.

22. Scurr M.J., Lippiatt G., Capitani L., Bentley K., Lauder S.N., Smart K., Somerville M.S., Rees T., Stanton R.J., Gallimore A., Hindley J.P., Godkin A. Magnitude of venous or capillary blood-derived SARS-CoV-2-specific T cell response determines COVID-19 immunity. *Nat. Commun.*, 2022, Vol. 13, no. 1, 5422. doi: 10.1038/s41467-022-32985-8.

23. Sekine T., Perez-Potti A., Rivera-Ballesteros O., Strålin K., Gorin J.B., Olsson A., Llewellyn-Lacey S., Kamal H., Bogdanovic G., Muschiol S., Wullimann D.J., Kammann T., Emgård J., Parrot T., Folkesson E., Karolinska COVID-19 Study Group, Rooyackers O., Eriksson L.I., Henter J.I., Sönnernborg A., Allander T., Albert J., Nielsen M., Klingström J., Gredmark-Russ S., Björkström N.K., Sandberg J.K., Price D.A., Ljunggren H.G., Aleman S., Buggert M. Robust T Cell Immunity in Convalescent Individuals with Asymptomatic or Mild COVID-19. *Cell*, 2020, Vol. 183, no. 1, pp.158-168.e14.

24. Sheetikov S.A., Khmelevskaya A.A., Zornikova K.V., Zvyagin I.V., Shomuradova A.S., Serdyuk Y.V., Shakirova N.T., Peshkova I.O., Titov A., Romaniuk D.S., Shagina I.A., Chudakov D.M., Kiryukhin D.O., Shcherbakova O.V., Khamaganova E.G., Dzutseva V., Afanasiev A., Bogolyubova A.V., Efimov G.A. Clonal structure and the specificity of vaccine-induced T cell response to SARS-CoV-2 Spike protein. *Front. Immunol.*, 2024, Vol. 15, 1369436. doi: 10.3389/fimmu.2024.1369436.

25. Sherina N., Piralla A., Du L., Wan H., Kumagai-Braesch M., Andréll J., Braesch-Andersen S., Cassaniti I., Percivalle E., Sarasini A., Bergami F., Di Martino R., Colaneri M., Vecchia M., Sambo M., Zuccaro V., Bruno R., Sachs M., Oggionni T., Meloni F., Abolhassani H., Bertoglio F., Schubert M., Byrne-Steele M., Han J., Hust M., Xue Y., Hammarström L., Baldanti F., Marcotte H., Pan-Hammarström Q. Persistence of SARS-CoV-2-specific B and T cell responses in convalescent COVID-19 patients 6-8 months after the infection. *Med*, 2021, Vol. 2, no. 3, pp. 281-295.e4.

26. Tan A.T., Linster M., Tan C.W., Le Bert N., Chia W.N., Kunasegaran K., Zhuang Y., Tham C.Y.L., Chia A., Smith G.J.D., Young B., Kalimuddin S., Low J.G.H., Lye D., Wang L.F., Bertoletti A. Early induction of functional SARS-CoV-2-specific T cells associates with rapid viral clearance and mild disease in COVID-19 patients. *Cell Rep.*, 2021, Vol. 34, no. 6, 108728. doi: 10.1016/j.celrep.2021.108728.

27. Tarke A., Sidney J., Methot N., Yu E.D., Zhang Y., Dan J.M., Goodwin B., Rubiro P., Sutherland A., Wang E., Frazier A., Ramirez S.I., Rawlings S.A., Smith D.M., da Silva Antunes R., Peters B., Scheuermann R.H., Weiskopf D., Crotty S., Grifoni A., Sette A. Impact of SARS-CoV-2 variants on the total CD4⁺ and CD8⁺ T cell reactivity in infected or vaccinated individuals. *Cell Rep. Med.*, 2021, Vol. 2, no. 7, 100355. doi: 10.1016/j.xcrm.2021.100355.

28. Titov A., Shaykhutdinova R., Shcherbakova O.V., Serdyuk Y.V., Sheetikov S.A., Zornikova K.V., Maleeva A.V., Khmelevskaya A., Dianov D.V., Shakirova N.T., Malko D.B., Shkurnikov M., Nersisyan S., Tonevitsky A., Khamaganova E., Ershov A.V., Osipova E.Y., Nikolaev R.V., Pershin D.E., Vedmedskia V.A., Maschan M.,

Ginanova V.R., Efimov G.A. Immunogenic epitope panel for accurate detection of non-cross-reactive T cell response to SARS-CoV-2. *JCI Insight*, 2022, Vol. 7, no. 9, e157699. doi: 10.1172/jci.insight.157699.

29. Wyllie D., Jones H.E., Mulchandani R., Trickey A., Taylor-Phillips S., Brooks T., Charlett A., Ades A., Anthony M., Andrew O., Moore P., Boyes J., Hormis A., Todd N., Reckless I. SARS-CoV-2 responsive T cell numbers and anti-Spike IgG levels are both associated with protection from COVID-19: A prospective cohort study in keyworkers. *medRxiv*, 2021. doi: 10.1101/2020.11.02.20222778.

30. Zornikova K.V., Khmelevskaya A., Sheetikov S.A., Kiryukhin D.O., Shcherbakova O.V., Titov A., Zvyagin I.V., Efimov G.A. Clonal diversity predicts persistence of SARS-CoV-2 epitope-specific T-cell response. *Commun. Biol.*, 2022, Vol. 5, no. 1, 1351. doi: 10.1038/s42003-022-04250-7.

31. Zuo J., Dowell A.C., Pearce H., Verma K., Long H.M., Begum J., Aiano F., Amin-Chowdhury Z., Hoschler K., Brooks T., Taylor S., Hewson J., Hallis B., Stapley L., Borrow R., Linley E., Ahmad S., Parker B., Horsley A., Amirthalingam G., Brown K., Ramsay M.E., Ladhani S., Moss P. Robust SARS-CoV-2-specific T cell immunity is maintained at 6 months following primary infection. *Nat. Immunol.*, 2021, Vol. 22, no. 5, pp. 620-626.

Авторы:

Черепович Б.С. — младший научный сотрудник лаборатории генетики РНК-содержащих вирусов ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова», Москва, Россия

Кудряшова А.М. — научный сотрудник лаборатории медицинской биотехнологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова», Москва, Россия

Панкратьева Л.Л. — д.м.н., профессор, руководитель научно-клинического центра ГБУЗ «Городская клиническая больница № 67 имени Л.А. Ворохобова Департамента здравоохранения города Москвы», Москва, Россия

Боголюбова А.В. — к.б.н., заведующая лабораторией трансплантационной иммунологии ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Authors:

Cherepovich B.S., Junior Research Associate, Laboratory of Genetics of RNA-containing Viruses, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation

Kudryashova A.M., Research Associate, Laboratory of Medical Biotechnology, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation

Pankratieva L.L., PhD, MD (Medicine), Professor, Head of the Clinical Research Center, L. Vorokhobov City Clinical Hospital No. 67, Moscow, Russian Federation

Bogolyubova A.V., PhD (Biology), Head, Laboratory of Transplantation Immunology, National Medical Research Center of Hematology, Moscow, Russian Federation

Мануйлов В.А. — к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории трансляционной медицины ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Гущин В.А. — д.б.н., заведующий лабораторией механизмов популяционной изменчивости патогенных микроорганизмов и референс-центром по коронавирусной инфекции ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Почтовый А.А. — к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории механизмов популяционной изменчивости патогенных микроорганизмов ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Борисова О.В. — к.х.н., заведующая лабораторией медицинской биотехнологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова», Москва, Россия

Свитич О.А. — д.м.н., член-корр. РАН, заведующая лабораторией молекулярной иммунологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова», Москва, Россия

Manuilov V.A., PhD (Biology), Senior Research Associate, Laboratory of Translational Medicine, N. Gamaleya National Research Center of Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation

Gushchin V.A., PhD, MD (Biology), Head, Laboratory of Mechanisms of Population Variability of Pathogenic Microorganisms and Reference Center for Coronavirus Infection, N. Gamaleya National Research Center of Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation

Pochtovyi A.A., PhD (Biology), Research Associate, Laboratory of Mechanisms of Population Variability of Pathogenic Microorganisms, N. Gamaleya National Research Center of Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation

Borisova O.V., PhD (Chemistry), Head, Laboratory of Medical Biotechnology, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation

Svitich O.A., PhD, MD (Medicine), Corresponding Member, Russian Academy of Sciences, Head, Laboratory of Molecular Immunology, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation

Поступила 23.05.2024
Принята к печати 14.09.2024

Received 23.05.2024
Accepted 14.09.2024

СИСТЕМНЫЕ ФАКТОРЫ РЕГУЛЯЦИИ АНГИОГЕНЕЗА ПРИ МНОЖЕСТВЕННОЙ МИОМЕ МАТКИ

Коненков В.И.¹, Шевченко А.В.¹, Прокофьев В.Ф.¹, Королева Е.Г.²,
Тимофеева Ю.С.^{2,3}, Айдагулова С.В.³, Маринкин И.О.³

¹ Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной лимфологии – филиал ФГБНУ
«Федеральный исследовательский центр “Институт цитологии и генетики” Сибирского отделения
Российской академии наук», г. Новосибирск, Россия

² Медицинский центр «Авиценна», г. Новосибирск, Россия

³ ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения
РФ, г. Новосибирск, Россия

Резюме. Лейомиомы матки (ЛМ) являются доброкачественными опухолями матки. Гипертрофическое нарастание мышечной массы при ЛМ сопровождается развитием сосудистых сетей, которые регулируется балансом проангиогенных факторов, одним из которых является VEGF-A. Кроме того, проангиогенным эффектом обладает ряд воспалительных молекул, наиболее значимые из которых IL-1 β , IL-8 и др. Спектр их активности может перекрываться и регулироваться другими цитокинами. Цель – оценить уровень концентрации цитокинов, принимающих активное участие в регуляции роста сосудистой сети в периферической крови пациенток с множественной миомой матки в сопоставлении с данными по группе условно здоровых женщин.

В обследование вошли 178 женщин. Из них 89 женщин (23-60 лет) с ЛМ и 89 условно здоровых женщин аналогичного возраста (22-61 год). Уровни TNF α , IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-8, IL-10 и VEGF-A определялся методом ИФА (АО «Вектор-Бест», Россия). Статистическая обработка результатов проводилась с использованием пакета прикладных программ IBM SPSS Statistics 23 (США).

Концентрации IL-6, TNF α и IL-8 в сыворотке крови выше среди пациенток при сравнении со здоровыми женщинами. Установлена достоверная зависимость содержания VEGF от количества миоматозных узлов. При множественных выявленных узлах уровень VEGF выше. У здоровых женщин повышение концентрации TNF α , прямо коррелирует с повышением сывороточных концентраций IL-6. Корреляция с концентрацией VEGF носит слабо отрицательный характер. При лейомиоме характер этих взаимосвязей сохраняется: для IL-6, IL-8, VEGF. Для всех пациенток картина корреляционных отношений остается неизменной.

Полученные данные имеют практическое значение не только в качестве основы для разработки прогностических критериев развития ЛМ на доклиническом этапе, но и в качестве дифференциально-диагностических дополнительных лабораторных признаков. В частности, при дифференциации лейо-

Адрес для переписки:

Шевченко Алла Владимировна
Научно-исследовательский институт клинической
и экспериментальной лимфологии
630060, Россия, г. Новосибирск, ул. Тимакова, 2.
Тел.: 8 (952) 901-36-80.
E-mail: shalla64@mail.ru

Address for correspondence:

Alla V. Shevchenko
Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology
2 Timakov St
Novosibirsk
630060 Russian Federation
Phone: +7 (952) 901-36-80.
E-mail: shalla64@mail.ru

Образец цитирования:

В.И. Коненков, А.В. Шевченко, В.Ф. Прокофьев,
Е.Г. Королева, Ю.С. Тимофеева, С.В. Айдагулова,
И.О. Маринкин «Системные факторы регуляции
ангиогенеза при множественной миоме матки»
// Медицинская иммунология, 2025. Т. 27, № 1.
С. 57-68. doi: 10.15789/1563-0625-SRF-2978

© Коненков В.И. и соавт., 2025

Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

V.I. Konenkov, A.V. Shevchenko, V.F. Prokofiev,
E.G. Koroleva, Yu.S. Timofeeva, S.V. Aidagulova,
I.O. Marinkin “Systemic regulatory factors of angiogenesis
in multiple uterine myoma”, Medical Immunology (Russia)/
Meditsinskaya Immunologiya, 2025, Vol. 27, no. 1,
pp. 57-68.
doi: 10.15789/1563-0625-SRF-2978

© Konenkov V.I. et al., 2025

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

DOI: 10.15789/1563-0625-SRF-2978

миомы матки, наиболее частой доброкачественной миоматозной опухоли матки, от злокачественных лейомиосарком матки.

Ключевые слова: миома матки, иммуноферментный анализ, TNF α , IL-1, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, VEGF

SYSTEMIC REGULATORY FACTORS OF ANGIOGENESIS IN MULTIPLE UTERINE MYOMA

Konenkov V.I.^a, Shevchenko A.V.^a, Prokofiev V.F.^a, Koroleva E.G.^b, Timofeeva Yu.S.^{b,c}, Aidagulova S.V.^c, Marinkin I.O.^c

^a Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology, Institute Cytology and Genetics, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russian Federation

^b Avicenna Medical Center, Novosibirsk, Russian Federation

^c Novosibirsk State Medical University, Novosibirsk, Russian Federation

Abstract. Uterine leiomyomas (UL) are benign uterine tumors. Hypertrophic increase in muscle mass in LM is accompanied by development of vascular networks, which are regulated by the balance of pro-angiogenic factors, e.g., VEGF-A. Moreover, a number of inflammatory molecules exert pro-angiogenic effects, especially, IL-1 β , IL-8, etc. The spectrum of their activity may overlap, being regulated by other cytokines. The aim of our work was to assess serum concentrations of cytokines actively involved in vascular network growth in the patients with multiple uterine fibroids, as compared with data obtained in conditionally healthy women. The survey included 178 females: 89 women (23–60 years old) with uterine fibroids, and 89 conditionally healthy age-matched women (22–61 years old). The levels of TNF α , IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-8, IL-10 and VEGF-A were detected by ELISA technique (Vector-Best, Russia). Statistical analysis was carried out using the IBM SPSS Statistics 23 (USA). Serum levels of IL-6, TNF and IL-8, were higher among patients compared with healthy women. The dependence of VEGF level on the number of myoma nodes has been established: VEGF serum level was higher in patients with multiple tumor nodes. In healthy women, an increase in TNF α level showed direct correlation with higher serum level of IL-6. Correlation with VEGF level was weakly negative. In leiomyoma, these relationships persist for IL-6, IL-8, VEGF levels. The obtained data are of practical importance not only as potential prognostic criteria for development of the uterine myoma at preclinical stage, but also as additional laboratory indexes for differential diagnostics, in particular when discerning uterine leiomyoma, the most common benign myomatous tumor of uterus, from malignant uterine leiomyosarcomas.

Keywords: uterine leiomyoma, immunoenzyme assay, TNF α , IL-1, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, VEGF

Введение

Лейомиомы матки (ЛМ), или миомы матки (ММ), представляют собой доброкачественные опухоли матки. Предполагаемая распространенность этой опухоли среди женщин европеоидного происхождения составляет более 70%, а среди африканских женщин — более 80% в возрасте свыше 50 лет [25]. Вместе с тем необходима достоверная и своевременная диагностика для обеспечения правильного ведения и предотвращения ошибочного диагноза аденомиоза, эндометриоза, беременности, лейомиосаркомы, карциносаркомы матки или рака эндометрия, поскольку они могут проявляться сходными симптомами [23]. Кроме того, эта дифференциация важна для разработки точного прогноза, поскольку ЛМ связана с по-

тенциально повышенным риском развития рака эндометрия [29].

Гипертрофическое нарастание мышечной массы при ЛМ неизбежно сопровождается и развитием соответствующих сосудистых сетей, формирующихся согласно процессам неоангиогенеза и неоваскулогенеза, которые регулируются балансом семейств проангиогенных и антиангиогенных факторов. При гистологическом исследовании препаратов пролиферирующих вариантов развития ЛМ были выявлены некоторые признаки активации неоангиогенеза в виде повышения экспрессии CD34, эпидермального фактора роста (EGF), рецептора к нему (EGFR) и фактора роста фибробластов (FGF) [9]. Основными проангиогенными факторами являются семейство фактора роста эндотелия сосудов

VEGF (VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E), фактор роста фибробластов (bFGF), тромбоцитарный фактор роста (PDGF), трансформирующий фактор роста (TGF- β), ангиопоэтины 1, 2 (Ang-1, Ang-2), ангиогенин, плацентарный фактор роста, интерферон α (IFN α) и др. Кроме того, проангиогенным эффектом обладает ряд воспалительных молекул, наиболее значимые из которых матричные металлопротеиназы (MMP), молекулы системы комплемента (C2, C3, C5), молекулы адгезии и миграции моноцитов (MCP-1, IL-1 β , IL-18, IL-8) и др. Каждый из цитокинов или факторов роста обладает своими контрольно-регуляторными функциями. Спектр их активности может перекрываться и регулироваться другими цитокинами или свободнорадикальными молекулами, такими как оксид азота (NO) и др. [2, 14, 21].

Важным стимулом экспрессии основного стимулятора ангиогенеза — VEGF, является гипоксия, которая способствует связыванию индуцируемого гипоксией фактора-1 α (HIF-1 α) с элементом ответа на гипоксию (HRE) в промоторе VEGF, что приводит к увеличению экспрессии фактора роста. VEGF играет важную роль в васкулогенезе, формировании *de novo* первичной сосудистой структуры из эндотелиальных клеток-предшественников во время эмбрионального и постнатального развития, хотя у взрослых он ограничен такими случаями, как заживление ран и женские репродуктивные циклы [22]. Нельзя недооценивать роль выражено модулирующих ангиогенез цитокинов, таких как фактора роста сосудистого эндотелия (VEGF), интерлейкина-6 (IL-6), интерлейкина-8 (IL-8) и опухоль некротизирующего фактора альфа (TNF α) в развитии лейомиомы [21, 24, 33, 39]. Показано, что IL-6 стимулирует развитие свежих кровеносных сосудов при ангиогенезе, поставляя необходимые питательные вещества и кислород для поддержания роста пролиферирующих клеток [31]. IL-8 (он же хемокин CXCL) может регулировать миграцию неиммунных клеток и стимулировать неоваскуляризацию и способствует ангиогенезу путем индукции миграции и пролиферации CXCR2-экспрессирующих неоваскуляризирующих эндотелиальных клеток, образуя новые кровеносные сосуды [18]. TNF α усиливает экспрессию E-селектина, VCAM-1 и ICAM-1 в стромальных клетках костного мозга и микрососудистых эндотелиальных клетках дермы человека и индуцирует ангиогенез [35]. Однако определение концентраций цитокинов в сыворотке крови методами иммуноферментного анализа (ИФА) всегда дает высокий разброс данных, полученных в различных лабораториях. Кроме того, есть расхождения и для нормативных значений при ис-

пользовании тест-систем разных производителей и разными методиками. Так, в одной из наиболее обоснованных статей приводятся нормативные значения концентраций VEGF в сыворотке крови 102 здоровых человек с достаточно широким разбросом: 10-246 пг/мл при средних значениях 152,21 $\pm$ 56,7 пг/мл. Затем авторы приводят данные о разделении этой группы на две по принципу выше/ниже верхней границы 246 пг/мл [10]. Анализ публикаций по сходной тематике подтверждает эту информацию: 201,4 $\pm$ 18,6 пг/мл [4, 7, 17]. В связи с этим закономерно ставится вопрос о проведении единовременных рандомизированных многоцентровых двойных слепых исследований для получения рекомендаций и нормативных значений [1]. Стоит подчеркнуть, что важный фактор достоверности результатов исследований — использование при сравнительном анализе данных результатов, полученных на реагентах одного производителя.

Цель настоящего исследования — оценить уровень концентрации цитокинов, принимающих активное участие в регуляции роста сосудистой сети в периферической крови пациенток с множественной миомой матки в сопоставлении с данными по группе условно здоровых женщин.

Материалы и методы

Пациентки

В обследование вошла 201 женщина. Из них 109 женщин (23-60 лет) с выраженной клинической картиной заболевания миомой матки (D25 по МКБ-10), подтвержденной данными УЗИ экспертного класса. У 67,8 % женщин выявлены единичные миоматозные узлы (диаметр узла 12 мм — 300 мм), у 32,2 % множественные узлы — от двух до семи (диаметр узлов 20 мм — 100 мм). В качестве контрольной группы обследованы 92 женщины аналогичного возраста (22-61 год), не предъявляющие жалоб на приеме и осмотре у гинеколога, при диспансерном обследовании которых по результатам УЗИ не было выявлено патологических изменений.

Методы ИФА

Для анализа использовали сыворотку венозной крови, забранной утром натощак. Уровни TNF α , IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-8, IL-10 и VEGF-A определялся методом твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА) с применением пероксидазы хрена в качестве индикаторного фермента. По каждому цитокину измерено 89 образцов от пациенток с ММ и 89 образцов от условно здоровых женщин. Использовали стандартные тест-системы производства АО «Вектор-Бест» (Россия). Считывание и расчет результатов проводили на спектрофотометре ELx800 (BioTek, Тайвань), измеряя оптическую плотность рас-

творов в лунках при длине волны 450 нм. Количественное содержимое цитокинов в сыворотке крови выражалось в пг/мл.

Статистические методы анализа

Статистическая обработка результатов проводилась с использованием пакета прикладных программ IBM SPSS Statistics 23 (США). Проверку гипотезы о нормальном распределении количественных параметров проводили с использованием непараметрического критерия согласия Колмогорова—Смирнова с поправкой Лиллиефорса. При этом нормальным считалось распределение, у которого значение D статистики критерия Колмогорова—Смирнова в отличие от теоретически нормального распределения Гаусса была не значима ($p > 0,05$). Описательные статистики для показателей, измеренных по интервальным шкалам, представлены в виде среднего значения, стандартной ошибки, стандартного отклонения, минимума и максимума, моды и медианы с интерквартильным размахом в формате Me ($Q_{0,25}$ – $Q_{0,75}$). Для анализа количественных данных использовали непараметрические методы статистики (U-тест Манна—Уитни, ранговая корреляция Спирмена). Для сравнения качественных признаков использовали тесты стати-

стической значимости: критерий χ^2 Пирсона с поправкой Йетса, точный двусторонний критерий Фишера. Критический уровень значимости при проверке статистических гипотез принимали равным 0,05.

Результаты

Результаты проведенного нами исследования концентраций цитокинов с проангиогенной активностью в группе из 89 здоровых женщин среднего возраста представлены в таблице 1. Полученные значения соответствуют опубликованным данным большинства других российских лабораторий, проводимых на системах АО «Вектор-Бест».

Результаты наших исследований, полученных при обследовании 89 пациенток соответствующего контрольной группе возраста, представленные в таблице 2, свидетельствуют о том, что характер распределения значений концентрации таких цитокинов, как IL-6, IL-8, VEGF и TNF α в группе пациенток с ЛМ, как и в группе здоровых женщин, не подчиняется нормальному распределению и требует для сопоставления применения

ТАБЛИЦА 1. УРОВЕНЬ ЦИТОКИНОВ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ЗДОРОВЫХ ЖЕНЩИН РЕПРОДУКТИВНОГО ВОЗРАСТА (n = 89)

TABLE 1. THE SERUM LEVEL OF CYTOKINES IN HEALTHY WOMEN OF REPRODUCTIVE AGE (n = 89)

Показатели Index		Возраст Age	TNF α	IL-1	IL-4	IL-6	IL-8	IL-10	VEGF
Среднее Mean		33,93	5,66	9,85	3,63	2,19	3,72	8,54	512,23
Ошибка среднего значения Standard error		0,66	0,31	0,47	0,40	0,17	0,23	0,49	24,26
Среднеквадратическое отклонение Standard deviation		6,32	2,92	4,40	3,75	1,63	2,13	4,64	228,90
Медиана Mediana		34,00	5,00	9,00	2,42	1,93	3,18	8,18	496,84
Мода Moda		29,00	3,24	5,21	0,91	0,51	1,30	8,47	243,91
Асимметрия Skewness		0,87	0,91	0,92	2,27	1,51	1,47	1,21	0,57
Экссесс Excess		2,83	0,75	1,12	8,92	2,99	2,70	2,22	0,58
Минимум Minimum		22,00	0,33	1,64	0,00	-0,04	1,04	-1,04	57,81
Максимум Maximum		61,00	13,93	25,31	24,07	7,99	11,70	25,29	1220,95
Процентили Percentiles	25	29,25	3,54	6,32	0,97	0,95	2,24	5,33	372,93
	75	38,00	6,93	12,96	5,86	3,00	4,83	10,65	624,96

ТАБЛИЦА 2. УРОВЕНЬ ЦИТОКИНОВ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ПАЦИЕНТОК С МИОМОЙ МАТКИ РЕПРОДУКТИВНОГО ВОЗРАСТА (n = 89)

TABLE 2. CYTOKINE SERUM LEVELS IN PATIENTS WITH UTERINE FIBROIDS OF REPRODUCTIVE AGE (n = 89)

Показатели Index	Возраст Age	TNF α	IL-1	IL-4	IL-6	IL-8	IL-10	VEGF
Среднее Mean	39,75	13,72	54,71	4,85	9,71	9,24	9,08	373,51
Ошибка среднего значения Standard error	0,62	0,46	3,05	0,33	0,57	1,62	0,64	19,10
Среднеквадратическое отклонение Standard deviation	6,48	4,35	28,76	3,12	5,42	15,31	6,03	180,20
Медиана Mediana	40,00	13,57	51,43	4,09	8,93	6,76	7,76	344,74
Мода Moda	37,00	14,20	35,97	3,59	3,88	6,97	3,50	79,25
Асимметрия Skewness	-0,13	0,37	4,66	1,23	0,61	6,36	3,25	1,43
Экссесс Excess	0,88	0,21	32,34	2,21	-0,45	42,28	16,96	3,25
Минимум Minimum	23,00	4,65	24,20	0,13	1,68	1,33	1,33	79,25
Максимум Maximum	61,00	25,88	265,12	17,37	24,70	122,12	46,92	1112,54
Процентили Percentiles	25	36,00	10,83	39,66	2,36	4,95	4,82	247,52
	75	44,00	16,10	62,50	6,94	14,11	8,24	462,41

ТАБЛИЦА 3. СРАВНИТЕЛЬНЫЙ УРОВЕНЬ ЦИТОКИНОВ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ЗДОРОВЫХ ЖЕНЩИН И ПАЦИЕНТОК С МИОМОЙ МАТКИ

TABLE 3. COMPARATIVE CYTOKINE SERUM LEVELS IN HEALTHY WOMEN AND PATIENTS WITH UTERINE FIBROIDS

Показатели Index	Здоровые Healthy (n = 89)	Пациентки с миомой Patients with fibroids (n = 89)	p ₁₋₂	Количество миоматозных узлов Number of myomatous nodes		p ₃₋₄
				Единичные Single	Множес- твенные Multiple	
				3	4	
TNF α	5,00 (3,54-6,93)	13,57 (10,83-16,10)	< 0,001	13,23 (10,36-15,63)	14,09 (11,23-16,27)	0,242
IL-6	1,93 (0,95-3,00)	8,93 (4,95-14,11)	< 0,001	8,81 (3,88-12,63)	8,93 (5,17-14,63)	0,364
IL-8	3,18 (2,24-4,83)	6,76 (4,82-8,24)	< 0,001	6,28 (5,09-7,88)	6,97 (4,77-8,49)	0,360
VEGF	496,84 (372,93-624,96)	344,74 (247,52-462,41)	< 0,001	315,63 (218,94-397,25)	383,78 (266,39-482,48)	0,035

Примечание. Данные представлены как медианы и интерквартильный размах: Me (Q_{0,25}-Q_{0,75}). p₁₋₂ и p₃₋₄ – статистическая значимость различий по U-критерию Манна–Уитни (двусторонняя).

Note. The data are presented as medians and interquartile range: Me (Q_{0,25}-Q_{0,75}). p₁₋₂ and p₃₋₄ are the statistical significance of differences according to the Mann–Whitney U test (two-sided).

ТАБЛИЦА 4. РЕЗУЛЬТАТЫ НЕПАРАМЕТРИЧЕСКОГО КОРРЕЛЯЦИОННОГО АНАЛИЗА КОНЦЕНТРАЦИЙ РЕГУЛЯТОРНЫХ ФАКТОРОВ ЦИТОКИНОВ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ЗДОРОВЫХ ЖЕНЩИН И ПАЦИЕНТОК С МИОМОЙ МАТКИ

TABLE 4. RESULTS OF NONPARAMETRIC CORRELATION ANALYSIS OF THE CONCENTRATIONS OF CYTOKINE REGULATORY FACTORS IN THE BLOOD SERUM OF HEALTHY WOMEN AND PATIENTS WITH UTERINE FIBROIDS

Показатели Index	TNF α	IL-6	IL-8	VEGF
Здоровые женщины Healthy women				
TNF α	1,000	0,446**	0,033	-0,009
IL-6	0,446**	1,000	0,112	0,283**
IL-8	0,033	0,112	1,000	-0,016
VEGF	-0,009	0,283**	-0,016	1,000
Пациентки с миомой матки Patients with uterine fibroids				
TNF α	1,000	0,664**	0,328**	-0,211
IL-6	0,664**	1,000	0,411**	-0,194
IL-8	0,328**	0,411**	1,000	0,203
VEGF	-0,211	-0,194	0,203	1,000

Примечание. * – корреляция статистически значима на уровне $< 0,05$; ** – на уровне $< 0,01$.

Note. *, correlation is statistically significant at the level of < 0.05 ; **, at the level of < 0.01 .

непараметрических методов статистической обработки данных.

Исходя из этого, при сопоставлении результатов исследования в основной и контрольных группах женщин в таблице 3, данные квартильного анализа представлены как медианы и интерквартильный размах: $Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})$, где p – статистическая значимость по U-критерию Манна–Уитни (двусторонняя).

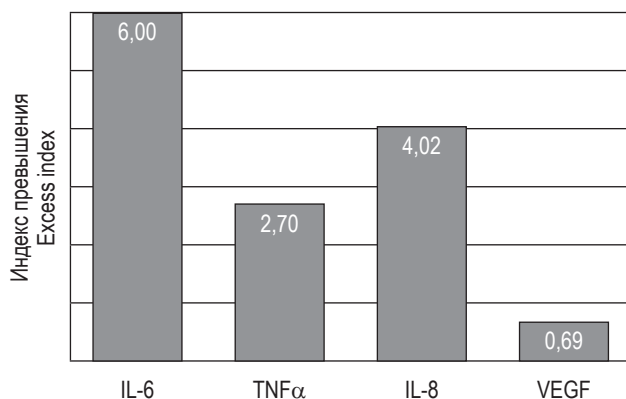


Рисунок 1. Числовые показатели изменений концентраций регуляторных факторов при лейомиоме

Figure 1. Numerical indicators of changes in levels of regulatory factors in leiomyoma

Из представленных данных следует, что концентрации обоих цитокинов с провоспалительной активностью IL-6 и TNF α , а также хемокина IL-8 (CXCL8) в сыворотке крови достоверно выше среди пациенток при сравнении со здоровыми женщинами того же возраста и этнически европеоидного происхождения, соответственно в 6,0, в 2,7 и в 4,02 раза (рис. 1).

Исключение из этой закономерности представляет ростовой фактор VEGF, концентрация которого в сыворотке крови как здоровых женщин, так и у пациенток с ЛМ, представлена трехзначными значениями 496,84 (372,93-624,96) и 344,74 (247,52-462,41) пг/мл соответственно. При клинико-иммунологическом анализе распределения значений концентрации среди пациенток с лейомиомой установлена достоверная зависимость содержания VEGF от количества миоматозных узлов, выявленных и удаленных оперативным путем. Из результатов, представленных в таблице 3, следует, что при множественных выявленных узлах (более двух) концентрация сывороточного VEGF достоверно выше, чем при выявлении одного узла. Согласно полученным нами данным, концентрация IL-6, IL-8 и TNF α в сыворотке крови пациенток со множественными миоматозными узлами также незначительно превышает значения этого показателя в группе женщин с единичными узлами ($p > 0,05$).

Проведенный нами далее тщательный клинико-иммунологический анализ зависимости концентраций всех проанализированных факторов с проангиогенной активностью от таких клинических характеристик течения заболевания, как возраст пациенток и длительность заболевания от момента постановки диагноза, индекс массы тела пациенток, гипертрофия миометрия, количества перенесенных беременностей, родов и спонтанных выкидышей, медицинских абортотворений в анамнезе, не выявил достоверных различий.

Все семь цитокинов были определены у 86 условно здоровых женщин и у 67 пациенток с ММ. В этих группах нами был проведен корреляционный анализ (табл. 4).

Концентрации цитокинов с проангиогенной активностью в сыворотке крови здоровых женщин находятся в логично объясняемых корреляционных отношениях. Так, повышение концентрации $TNF\alpha$, согласно полученным результатам, высоко достоверно прямо коррелирует с повышением сывороточных концентраций к IL-6 (коэффициенты ранговой корреляции Спирмена составляет $r_s = 0,45$ ($p < 0,01$). Наряду с этим корреляция с концентрацией VEGF носит слабоотрицательный характер ($r_s = 0,01$). При лейомиоме характер этих взаимосвязей сохраняется: для IL-6 ($r_s = 0,66$, $p < 0,01$), для IL-8 ($r_s = 0,33$, $p < 0,01$), для VEGF ($r_s = 0,21$). Как среди пациенток с одиночными, так и со множественными узлами картина корреляционных отношений остается неизменной.

Обсуждение

Ангиогенез, при котором новые капилляры прорастают из ранее существовавшего сосуда, является более часто изучаемой и лучше изученной формой формирования сосудов и обычно влечет за собой серию хорошо организованных процессов, управляемых идентифицированными проангиогенными факторами. Движущей силой этого явления является потребность окружающих тканей в кислороде и питательных веществах, что провоцирует выработку VEGF, факторов роста фибробластов (FGF) и других проангиогенных медиаторов несосудистыми клетками [26, 27]. Нами показано значительное возрастание IL-6 и $TNF\alpha$, IL-8 в сыворотке крови пациенток с миомой матки. Сходные результаты получены и в исследовании сывороток крови 47 женщин с ММ большого размера в сопоставлении с группой из 25 здоровых женщин в российской популяции [3], и в исследовании польских коллег [36]. При этом, полученные нами показатели концентрации $TNF\alpha$ при ЛМ $13,57 \pm 0,46$ пг/мл, достоверно превышают значения данных большинства лабораторий ($p < 0,001$), исследующих этот по-

казатель у здоровых женщин с использованием реагентов фирмы АО «Вектор-Бест» [4, 6, 7, 8, 11, 12, 13, 15, 17]. Превышение же концентраций сывороточного IL-8 у женщин с ММ относительно здоровых женщин показано только при миомах большого размера [3]. Высокие значения VEGF, концентрация которого в сыворотке крови как здоровых женщин, так и у пациенток может быть связана с постоянно функционирующим физиологическим механизмом поддержания определенного уровня процессов неоангиогенеза и ремоделирования соединительной ткани и экстрацеллюлярного матрикса, в которые погружены капиллярные и сосудистые сети кровеносной и лимфатической систем. Значительное повышение VEGF уровня при больших размерах миомы может косвенно свидетельствовать о запросе на усиленный неоангиогенез при распространенном миоматозе. Эти результаты лишней раз подчеркивают системный каскадный характер воздействия компонентов цитокиновой сети на многие тканевые процессы, включая ангиогенез.

Фактор роста эндотелия сосудов-A (VEGF-A) является ключевым медиатором ангиогенеза, передающим сигнал через семейство тирозинкиназных рецепторов класса IV рецепторов VEGF (VEGFR). Хотя лиганды VEGF-A связываются как с VEGFR1, так и с VEGFR2, они в первую очередь передают сигнал через VEGFR2, что приводит к пролиферации, выживанию, миграции и сосудистой проницаемости эндотелиальных клеток. Различные изоформы VEGF-A возникают в результате альтернативного сплайсинга одноименного гена в экзоне 8, что приводит к образованию изоформ VEGF xxx a или VEGF xxx b. Альтернативные события сплайсинга в экзонах 5-7, в дополнение к недавно выявленным событиям посттрансляционного считывания, производят изоформы VEGF-A, которые различаются по своей биодоступности [32].

Многочисленные доклинические исследования выявили тесную связь между VEGF и $TNF\alpha$, например, $TNF\alpha$ активирует Etk и VEGFR2 специфически через TNFR2 для усиления передачи сигналов P13K-Akt, что непосредственно приводит к TNF -индуцированной миграции эндотелиальных клеток (EC). $TNF\alpha$ усиливает экспрессию E-селектина, VCAM-1 и ICAM-1 в стромальных клетках костного мозга и микрососудистых эндотелиальных клетках человека и индуцирует ангиогенез. $TNF\alpha$ стимулирует эндотелиальные клетки экспрессировать и секретировать MCP-1, который является важным хемокином для рекрутирования макрофагов. Продукция MMP-9 в клетках B-CLL, THP-1 или Jurkat поддерживается аутокринным $TNF\alpha$ через TNFR1. Кроме того, $TNF\alpha$ усиливает экспрессию мембранного

MMP-1 в клетках, что приводит к усилению активации MMP-2 и клеточной миграции [39].

В низких концентрациях провоспалительный цитокин TNF α индуцирует миграцию и пролиферацию ЭК и формирование сосудоподобных структур. Повышенная продукция макрофагами TNF α приводит к стимуляции синтеза VEGF клетками и активации неоангиогенеза. К естественным ингибиторам ангиогенеза относят следующие цитокины: фактор пигментного эпителия (PEDF), ангиостатин, эндостатин, TGF- β , IFN γ , IFN α и все тот же TNF α , который при длительном воздействии на ЭК тормозит их пролиферацию и в итоге запускает апоптоз [20, 34]. Обратная регуляция TNF α и VEGF описана и при неопластическом ангиогенезе [16]. Нарушенная регуляция генов влияет на развитие/подавление опухолевых процессов, апоптоза, ангиогенеза, формирование внеклеточного матрикса, различных сигнальных путей, связанных с развитием опухолей, и дифференцировку стволовых клеток [30].

Эти результаты многое проясняют в клеточных механизмах развития ММ. Но не дают ответа на важный вопрос о причинных факторах избирательности развития заболевания у одной части женщин и резистентности к его возникновению у другой части, проживающей в тех же условиях. Вместе с тем хорошо известно, что у этой болезни наблюдается явное расовое неравенство. По оценкам, афроамериканские женщины в три раза чаще заболевают лейомиомой матки и, как правило, имеют более серьезные симптомы. Существует также семейная группировка между родственниками первой степени родства и близнецами, а также множественные наследственные синдромы, при которых происходит развитие миомы [19].

Проведенное нами ранее исследование показало, что варианты полиморфных участков генов VEGF и TNF α входят в состав большинства полигенных показателей риска (PRS — Polygenic Risk Score), с высокой частотой выявляемых в группе пациенток с ММ и практически не выявляемых в группе здоровых женщин [5, 28].

Эти данные раскрывают некоторые механизмы генетической предрасположенности к развитию ММ, т. к. прямо указывают на возможность связи развития ММ с генотипом женщины, несущих в своем геноме варианты регуляторных участков генов, обеспечивающих высокий уровень экспрессии этих генов и, соответственно, высокий уровень секреции их белковых продуктов с ангиогенез-модулирующей активностью во внеклеточную среду.

Комплексный анализ собственных и литературных данных позволяет высказать гипотезу о

том, что значительная часть генетических факторов риска развития ММ у части женщин связана с носительством в геноме локусов количественных признаков (QTL), ассоциированных с высоким уровнем продукции регуляторных факторов модуляции ангиогенеза. В свою очередь, высокая предуготовленность клеток таких женщин к способности выделять большие концентрации цитокинов с проангиогенной и провоспалительной активностью при поступлении запроса на активацию, может являться одним из механизмов реализации генетической предрасположенности к развитию ММ.

Кроме того, эти данные могут уже сейчас иметь и практическое значение не только в качестве основы для разработки прогностических критериев развития ММ на доклиническом этапе, но и в качестве дифференциально диагностических дополнительных лабораторных признаков. В частности, лейомиомы матки, наиболее частые доброкачественные миоматозные опухоли матки, часто невозможно отличить от злокачественных лейомиосарком матки по клиническим критериям. Более того, дифференциация изображений УЗИ/МРТ между обоими объектами часто является сложной задачей из-за их потенциально перекрывающихся особенностей. Поскольку подозрение на лейомиому часто лечится консервативно или с помощью минимально инвазивных методов лечения, ошибочный диагноз лейомиосаркомы как доброкачественной лейомиомы потенциально может привести к значительной задержке лечения, что приведет к увеличению заболеваемости и смертности [37].

Заключение

Представленные данные свидетельствуют о значительной активации продукции цитокинов с проангиогенными свойствами при развитии ММ. Высокие концентрации таких цитокинов IL-6, IL-8, VEGF и TNF α в сыворотке крови пациенток, в сочетании с их корреляционными взаимоотношениями, свидетельствуют о системном характере активационных воздействий на неоангиогенез, что вероятно связано с процессами очаговой пролиферации мышечной ткани при развитии миоматозных узлов.

Благодарности

Коллектив авторов выражает благодарность лаборанту лаборатории клинической иммуногенетики Барсуковой Галине Александровне за большой вклад в проведение экспериментальных исследований.

Список литературы / References

1. Арсентьева Н.А., Тотолян А.А. Методические сложности при определении содержания некоторых цитокинов в периферической крови практически здоровых лиц // Медицинская иммунология, 2018. Т. 20, № 5. С. 763-774. [Arsentieva N.A., Totolian A.A. Methodological issues of determining concentrations of some cytokines in peripheral mblood from healthy individuals. *Meditinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2018, Vol. 20, no. 5, pp. 763-774. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2018-5-763-774.
2. Архипова М.М., Лихванцева В.Г., Геворкян А.С., Рычкова С.И., Сельков С.А. Изучение уровня про- и антиангиогенных факторов роста в стекловидной жидкости при неоваскулярной возрастной макулярной дегенерации на фоне лечения // Офтальмология, 2022. Т. 19, № 2. С. 368-377. [Arkhipova M.M., Likhvantseva V.G., Gevorkyan A.S., Rychkova S.I., Selkov S.A. Study of the level of pro- and antiangiogenic growth factors in vitreous fluid in neovascular age-related macular degeneration on the background of treatment. *Oftalmologiya = Ophthalmology in Russia*, 2022, Vol. 19, no. 2, pp. 368-377. (In Russ.)]
3. Исакова О.В., Баженова Л.Г., Шрамко С.В., Зорина В.Н. Иммунорегуляторные белки и цитокины при миоме тела матки // Российский вестник акушера-гинеколога, 2015. Т. 15, № 5. С. 15-18. [Isakova O.V., Bazhenova L.G., Shramko S.V., Zorina V.N. Immunoregulatory proteins and cytokines in myoma of the corpus uteri. *Rossiyskiy vestnik akushera-ginekologa = Russian Bulletin of Obstetrician-Gynecologist*, 2015, Vol. 15, no. 5, pp. 15-18. (In Russ.)]
4. Кит О.И., Франциянц Е.М., Моисеенко Т.И., Вереникина Е.В., Черярина Н.Д., Козлова Л.С., Погорелова Ю.А. Факторы роста семейства VEGF и FGF 21 в сыворотке крови в динамике развития рака яичников // Современные проблемы науки и образования, 2017. № 1. [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://science-education.ru/ru/article/view?id=25898>. [Kit O.I., Frantsiyants E.M., Moiseenko T.I., Verenikina E.V., Cheryarina N.D., Kozlova L.S., Pogorelova Y.A. Growth factors of VEGF and FGF 21 family in blood serum in the ovarian cancer dynamics. *Sovremennyye problemy nauki i obrazovaniya = Modern Problems of Science and Education*, 2017, no. 1. [Electronic resource]. Available at: <https://science-education.ru/ru/article/view?id=25898>. (In Russ.)]
5. Королева Е.Г., Коненков В.И., Шевченко А.В., Прокофьев В.Ф., Орлов Н.Б., Тимофеева Ю.С., Айдугулова С.В., Маринкин И.О. Ассоциированность полиморфных вариантов генов цитокинов, фактора роста эндотелия и матричных металлопротеиназ с развитием миомы матки среди русских женщин // Сибирский научный медицинский журнал, 2024. Т. 44, № 2. С. 113-122. [Koroleva E.G., Konenkov V.I., Shevchenko A.V., Prokofiev V.F., Orlov N.B., Timofeeva Yu.S., Aidagulova S.V., Marinkin I.O. Association of polymorphic variants of cytokines genes, endothelial growth factor and matrix metalloproteinases with the development of uterine fibroids among russian women. *Sibirskiy nauchnyy meditsinskiy zhurnal = Siberian Scientific Medical Journal*. 2024, Vol. 44, no. 2, pp. 113-122. (In Russ.)].
6. Лаптева А.М., Коленчукова О.А., Смирнова С.В. Особенности иммунного статуса и назального микробиотоза при полипозном риносинусите и астматической триаде // Медицинская иммунология, 2016. Т. 18, № 6. С. 563-568. [Lapteva A.M., Kolenchukova O.A., Smirnova S.V. Immune parameters and nasal microflora in patients with polypoid rhinosinusitis and asthmatic triad. *Meditinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2016, Vol. 18, no. 6, pp. 563-568. (In Russ.)] doi: 0.15789/1563-0625-2016-6-563-568.
7. Ребров А.П., Захарова Н.Б., Патрикеева Д.А., Карпова О.Г., Оксеньчук А.Н., Попыхова Э.Б. Взаимосвязь содержания факторов роста, цитокинов в сыворотке крови и моче с возрастом у пациентов с системной склеродермией // Бюллетень медицинских Интернет-конференций, 2014. Т. 4, № 1. С. 8-13. [Rebrov A.P., Zakharova N.B., Patrikeeva D.A., Karpova O.G., Oxenchuk A.N., Pykhova E.B. The relationship of the content of growth factors, cytokines in blood serum and urine with age in patients with systemic scleroderma. *Byulleten meditsinskikh internet-konferentsiy = Bulletin of Medical Internet Conferences*, 2014, Vol. 4, no. 1, pp. 8-13.
8. Савченко А.А., Борисов А.Г., Здитовецкий Д.Э., Гвоздев И.И. Особенности цитокиновой регуляции респираторного взрыва нейтрофилов крови в прогнозе развития абдоминального сепсиса у больных распространенным гнойным перитонитом // Медицинская иммунология, 2016. Т. 18, № 5. С. 475-482. [Savchenko A.A., Borisov A.G., Zdzitovetsky D.E., Gvozdev I.I. Cytokine regulation of respiratory burst in blood neutrophils for prediction of abdominal sepsis in patients with extended purulent peritonitis. *Meditinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2016, Vol. 18, no. 5, pp. 475-482. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2016-5-475-482.
9. Сидорова И.С., Унанян А.Л., Коган Е.А., Гуриев Т.Д. Миома матки у больных молодого возраста: клинико-патогенетические особенности // Акушерство, гинекология, репродукция, 2010. Т. 4, № 1. С. 16-19. [Sidorova I.S., Hunanyan A.L., Kogan E.A., Guriev T.D. Uterine fibrosis in young patients: clinical and pathogenetic characteristics. *Akusherstvo, ginekologiya, reproduksiya = Obstetrics, Gynecology and Reproduction*, 2010, Vol. 4, no. 1, pp. 16-19. (In Russ.)]
10. Скальный А.В., Мазилина А.Н. Фактор роста эндотелия сосудов VEGF и металло-лигандный гомеостаз в патогенезе ишемического инсульта // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова, 2021. Т. 121, № 8-2. С. 30-34. [Skalny A.V., Mazilina A.N. Vascular endothelial growth factor VEGF and metal-ligand homeostasis in the pathogenesis of ischemic stroke. *Zhurnal Nevrologii i Psikhiatrii imeni S.S. Korsakova = Korsakov Journal of Neurology and Psychiatry*, 2021, Vol. 121, no. 8-2, pp. 30-34. (In Russ.)]
11. Смирнова О.В., Манчук В.Т., Поливанова Т.В., Агилова Ю.Н. Особенности цитокиновой регуляции при прогрессировании множественной миеломы // Медицинская иммунология, 2015. Т. 17, № 3.

С. 261-268. [Smirnova O.V., Manchuk V.T., Polivanova T.V., Agilova Yu.N. Cytokine regulation in the course of multiple myeloma progression. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2015, Vol. 17, no. 3, pp. 261-268. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2015-3-261-268.

12. Смирнова О.В., Цуканов В.В., Титова Н.М., Губанов Б.Г. Особенности цитокиновой регуляции у больных механической желтухой злокачественного генеза // Медицинская иммунология, 2018. Т. 20, № 1. С. 135-144. [Smirnova O.V., Tsukanov V.V., Titova N.M., Gubanov B.G. Features of cytokine regulation in patients with mechanical jaundice of malignant genesis. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2018, Vol. 20, no. 1, pp. 135-144. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2018-1-135-144.

13. 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.

14. Соколов Д.И., Колобов А.В., Лесничия М.В., Костючек И.Н., Боля К.В., Аржанова О.Н., Кветной И.М., Сельков С.А. Роль проангиогенных и антиангиогенных факторов в развитии плаценты // Медицинская иммунология, 2008. Т. 10, № 4-5. С. 347-352. [Sokolov D.I., Kolobov A.V., Lesnichija M.V., Kostiouchek I.N., Bolya K.V., Arzhanova O.N., Kvetnoy I.M., Selkov S.A. Role of pro- and antiangiogenic factors in placental development. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2008, Vol. 10, no. 4-5, pp. 347-352. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2008-4-5-347-352.

15. Сорокина Л.Н., Иванов В.А., Минеев В.Н., Лим В.В., Трофимов В.И. Особенности цитокинового спектра у больных неаллергической бронхиальной астмой в сочетании с сопутствующим сахарным диабетом 2 типа // Медицинская иммунология, 2017. Т. 19, № 3. С. 313-318. [Sorokina L.N., Ivanov V.A., Lim V.V., Mineev V.N., Trofimov V.I. Cytokine profile features in the patients with nonallergic bronchial asthma with co-existing type 2 diabetes mellitus. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2017, Vol. 19, no. 3, pp. 313-318. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2017-3-313-318.

16. Чехонин В.П., Шеин С.А., Корчагина А.А., Гурина О.И. Роль VEGF в развитии неопластического ангиогенеза // Вестник Российской академии медицинских наук, 2012. Т. 67, № 2. С. 23-34. [Chekhonin V.P., Shein S.A., Korchagina A.A., Gurina O.I. VEGF in neoplastic angiogenesis. *Vestnik Rossiyskoy akademii meditsinskikh nauk = Annals of the Russian Academy of Medical Sciences*, 2012, Vol. 67, no. 2, pp. 23-34. (In Russ.)]

17. Хворостухина Н.Ф., Островская А.Е., Новичков Д.А., Степанова Н.Н. Цитокиновый профиль при осложнении гормональной миомы матки // Медицинская иммунология, 2017. Т. 19, № 6. С. 739-748. [Khvorostukhina N.F., Ostrovskaya A.E., Novichkov D.A., Stepanova N.N. Cytokine profile in complications of hormone therapy administered for uterine fibroids. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2017, Vol. 19, no. 6, pp. 739-748. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2017-6-739-748.

18. Cambier S., Gouwy M., Proost P. The chemokines CXCL8 and CXCL12: molecular and functional properties, role in disease and efforts towards pharmacological intervention. *Cell. Mol. Immunol.*, 2023, Vol. 20, no. 3, pp. 217-251.

19. Commandeur A.E., Styer A.K., Teixeira J.M. Epidemiological and genetic clues for molecular mechanisms involved in uterine leiomyoma development and growth. *Hum. Reprod. Update*, 2015, Vol. 21, no. 5, pp. 593-615.

20. Dreyfuss J.L., Giordano R.J., Regatieri C.V. Ocular Angiogenesis. *J. Ophthalmol.*, 2015, Vol. 2015, 892043. doi: 10.1155/2015/892043.

21. Dudley A.C., Griffioen A.W. Pathological angiogenesis: mechanisms and therapeutic strategies. *Angiogenesis*, 2023, Vol. 26, pp. 313-347.

22. Ferrara N., Gerber H.-P., LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat. Med.*, 2003, Vol. 9, pp. 669-676.

23. Fleischer A.C., James A.E.Jr., Millis J.B., Julian C. Differential diagnosis of pelvic masses by gray scale sonography. *AJR Am. J. Roentgenol.*, 1978, Vol. 131, pp. 469-476.

24. Fousek K., Horn L.A., Palena C. Interleukin-8: A chemokine at the intersection of cancer plasticity, angiogenesis, and immune suppression. *Pharmacol. Ther.*, 2021, Vol. 219, 107692. doi: 10.1016/j.pharmthera.2020.107692.

25. Islam M.S., Protic O., Stortoni P., Grechi G., Lamanna P., Petraglia F., Castellucci M., Ciarmela P. Complex networks of multiple factors in the pathogenesis of uterine leiomyoma. *Fertil. Steril.*, 2013, Vol. 100, pp. 178-193.

26. Jeong J.H., Ojha U., Lee Y.M. Pathological angiogenesis and inflammation in tissues. *Arch. Pharm. Res.*, 2021, Vol. 44, no. 1, pp. 1-15.

27. Kirk S.L., Karlik S.J. VEGF and vascular changes in chronic neuroinflammation. *J. Autoimmun.*, 2003, Vol. 21, no. 4, pp. 353-363.

28. Koltsova A.S., Efimova O.A., Pendina A.A. View on Uterine Leiomyoma Genesis through the Prism of Genetic, Epigenetic and Cellular Heterogeneity. *Int. J. Mol. Sci.*, 2023, Vol. 24, no. 6, 5752. doi: 10.3390/ijms24065752.

29. Lagana A.S., Scioscia M. Endometrial cancer in women with adenomyosis: an underestimated risk? *Int. J. Fertil. Steril.*, 2020, Vol. 14, pp. 260-261.

30. Mlodawska O.W., Saini P., Parker J.B., Wei J.J., Bulun S.E., Simon M.A., Chakravarti D. Epigenomic and enhancer dysregulation in uterine leiomyomas. *Hum. Reprod. Update*, 2022, Vol. 28, no. 4, pp. 518-547.

31. Nenu I., Toadere T.M., Topor I., Țichindeleanu A., Bondor D.A., Trella Ș.E., Sparchez Z., Filip G.A. Interleukin-6 in Hepatocellular Carcinoma: A Dualistic Point of View. *Biomedicines*, 2023, Vol. 11, no. 10, 2623. doi: 10.3390/biomedicines11102623.
32. Peach C.J., Mignone V.W., Arruda M.A., Alcobia D.C., Hill S.J., Kilpatrick L.E., Woolard J. Molecular pharmacology of VEGF-A isoforms: binding and signalling at VEGFR2. *Int. J. Mol. Sci.*, 2018, Vol. 19, no. 4, 1264. doi: 10.3390/ijms19041264.
33. Qi C., Song X., Wang H., Yan Y., Liu B. The role of exercise-induced myokines in promoting angiogenesis. *Front. Physiol.*, 2022, Vol. 13, 981577. doi: 10.3389/fphys.2022.981577.
34. Rajappa M., Saxena P., Kaur J. Ocular angiogenesis: mechanisms and recent advances in therapy. *Adv. Clin. Chem.*, 2010, Vol. 50, pp. 103-121.
35. Shu Q., Amin M.A., Ruth J.H., Campbell P.L., Koch A.E. Suppression of endothelial cell activity by inhibition of TNF α . *Arthritis Res. Ther.*, 2012, Vol. 14, pp. 88-96.
36. Sikorski R., Kapeć E., Zaleska W. Serum levels of proinflammatory cytokines in women with uterine myomas. *Ginekol. Pol.*, 2001, Vol. 72, no. 12A, pp. 1485-1488.
37. Sun S., Bonaffini P.A., Nougaret S., Fournier L., Dohan A., Chong J., Smith J., Addley H., Reinhold C. How to differentiate uterine leiomyosarcoma from leiomyoma with imaging. *Diagn. Interv. Imaging*, 2019, Vol. 100, no. 10, pp. 619-634.
38. Wei Y., Erfani S., Schweer D., de Gouvea R., Qadir J., Shi J., Cheng K., Wu D., Craven R., Wu Y., Olivier T., Baldwin L.A., Zhou B., Zhou Y., Zhao W., Yang B.B., Ueland F.R., Yang X.H. Targeting receptor tyrosine kinases in ovarian cancer: Genomic dysregulation, clinical evaluation of inhibitors, and potential for combinatorial therapies. *Mol. Ther. Oncolytics*, 2023, Vol. 28, pp. 293-306.
39. Zhou X., Li Z., Zhou J. Tumor necrosis factor α in the onset and progression of leukemia. *Exp. Hematol.*, 2017, Vol. 45, pp. 17-26.

Авторы:

Коненков В.И. — д.м.н., профессор, академик РАН, руководитель лаборатории клинической иммуногенетики, Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной лимфологии — филиал ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр «Институт цитологии и генетики» Сибирского отделения Российской академии наук», г. Новосибирск, Россия

Шевченко А.В. — д.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории клинической иммуногенетики, Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной лимфологии — филиал ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр «Институт цитологии и генетики» Сибирского отделения Российской академии наук», г. Новосибирск, Россия

Прокофьев В.Ф. — к.м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории клинической иммуногенетики, Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной лимфологии — филиал ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр «Институт цитологии и генетики» Сибирского отделения Российской академии наук», г. Новосибирск, Россия

Authors:

Konenkov V.I., PhD, MD (Medicine), Professor, Full Member, Russian Academy of Sciences, Head, Laboratory of Clinical Immunogenetics, Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology, Institute Cytology and Genetics, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russian Federation

Shevchenko A.V., PhD, MD (Biology), Leading Research Associate, Laboratory of Clinical Immunogenetics, Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology, Institute Cytology and Genetics, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russian Federation

Prokofiev V.F., PhD (Medicine), Leading Research Associate, Laboratory of Clinical Immunogenetics, Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology, Institute Cytology and Genetics, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russian Federation

Королева Е.Г. — врач — акушер-гинеколог Медицинского центра «Авиценна», г. Новосибирск, Россия

Тимофеева Ю.С. — к.м.н., ассистент кафедры акушерства и гинекологии ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ; врач акушер-гинеколог, Медицинский центр «Авиценна», г. Новосибирск, Россия

Айдагулова С.В. — д.б.н., профессор, заведующая лабораторией клеточной биологии и фундаментальных основ репродукции Центральной научно-исследовательской лаборатории ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Новосибирск, Россия

Маринкин И.О. — д.м.н., профессор, заслуженный врач РФ, заведующий кафедрой акушерства и гинекологии, ректор ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Новосибирск, Россия

Koroleva E.G., Obstetrician-Gynecologist, Avicenna Medical Center, Novosibirsk, Russian Federation

Timofeeva Yu.S., PhD (Medicine), Assistant Professor, Department of Obstetrics and Gynecology, Novosibirsk State Medical University; Obstetrician-Gynecologist, Avicenna Medical Center, Novosibirsk, Russian Federation

Aidagulova S.V., PhD, MD (Biology), Professor, Head, Laboratory of Cell Biology and Fundamentals of Reproduction, Central Research Laboratory, Novosibirsk State Medical University, Novosibirsk, Russian Federation

Marinkin I.O., PhD, MD (Medicine), Professor, Honored Doctor of the Russian Federation, Head, Department of Obstetrics and Gynecology, rector, Novosibirsk State Medical University, Novosibirsk, Russian Federation

Поступила 29.03.2024

Отправлена на доработку 23.05.2024

Принята к печати 13.08.2024

Received 29.03.2024

Revision received 23.05.2024

Accepted 13.08.2024

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ ЭФФЕКТОВ БЕНЗ(А)ПИРЕНА И CHLORELLA GROWTH FACTOR *IN VIVO*, АССОЦИИРОВАННЫХ С КЛЕТОЧНЫМИ КЛАСТЕРАМИ ВРОЖДЕННОГО И АДАПТИВНОГО ИММУНИТЕТА

Ширинкина А.С.¹, Долгих О.В.^{1, 2}

¹ ФБУН «Федеральный научный центр медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения», г. Пермь, Россия

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

Резюме. Бенз(а)пирен — ароматическое соединение первого класса опасности, обладающее канцерогенным, мутагенным, гематотоксическим, в том числе иммуотропным, эффектами. Изучение клеточных кластеров в условиях воздействия экзогенных гаптенов *in vivo* с использованием в качестве модельного объекта белых нелинейных мышей позволяет расширить наши знания о механизмах и особенностях иммуотропных эффектов бенз(а)пирена, что определяет актуальность данного исследования. В эксперименте участвовали 12 самок беспородных (нелинейных) белых мышей. Концентрация бенз(а)пирена при однократном поступлении составила 6 мкг/л, в качестве нейтрализатора его эффектов и адаптогена использован концентрат *Chlorella growth factor* (CGF), последовательно поступавший в течение 4 недель в количестве 60–70 млн/мл живых клеток, оба вещества вводились через пероральный зонд в объеме 1 мл. Исследование фагоцитарной активности клеток проводили по методике Каплина В.Н. Анализ общего количества лейкоцитов и лимфоцитов проводили с использованием унифицируемых общеклинических методов анализа на гематологическом анализаторе. Изучение кластеров клеточной дифференцировки проводилось методом проточной цитометрии (CD25, CD95, CD11a, CD309). Для статистической обработки результатов исследования применяли методы математической статистики с помощью программы Microsoft® Office Excel, Statistica 6.0. Установлено, что субхроническая (подострая) интоксикация бенз(а)пиреном в условиях эксперимента *in vivo* приводила к значимой модификации клеточного иммунитета по сравнению с контролем, фенотипом которой выступали дефицит факторов врожденного клеточного иммунитета (система гранулоцитарного фагоцитоза) и дисбаланс адаптивного клеточного иммунитета с преимущественным угнетением апоптотической активности (CD95⁺) и моделированием интегрин- и VEGF-опосредованных сценариев (CD11a, CD309). Причем последовательное поступление природного модификатора *Chlorella growth factor* характеризовалось нормализацией фагоцитарной ак-

Адрес для переписки:

Ширинкина Алиса Сергеевна
ФБУН «Федеральный научный центр медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения»
614045, Россия, г. Пермь, ул. Монастырская, 82.
Тел.: 8 (965) 571-11-33.
E-mail: shirinkina.ali@yandex.ru

Address for correspondence:

Alisa S. Shirinkina
Federal Research Center of Medical and Preventive
Technologies of Risk Management for Public Health
82 Monastyrskaya St
Perm
614045 Russian Federation
Phone: +7 (965) 571-11-33.
E-mail: shirinkina.ali@yandex.ru

Образец цитирования:

А.С. Ширинкина, О.В. Долгих «Экспериментальное изучение эффектов бенз(а)пирена и *Chlorella growth factor in vivo*, ассоциированных с клеточными кластерами врожденного и адаптивного иммунитета» // Медицинская иммунология, 2025. Т. 27, № 1. С. 69–74. doi: 10.15789/1563-0625-ESO-2917

© Ширинкина А.С., Долгих О.В., 2025
Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

A.S. Shirinkina, O.V. Dolgikh “Experimental study of the effects of benz(a)pyrene and *Chlorella growth factor in vivo* associated with cellular clusters of innate and adaptive immunity”, *Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2025, Vol. 27, no. 1, pp. 69–74. doi: 10.15789/1563-0625-ESO-2917

© Shirinkina A.S., Dolgikh O.V., 2025
The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License
DOI: 10.15789/1563-0625-ESO-2917

тивности и отменой индуцированных бенз(а)пиреном эффектов. Ограничения исследования, полученных результатов и выводов обусловлены малым (ограниченным) объемом выборки. В результате изучения *in vivo* особенностей фагоцитоза и кластеров клеточной дифференцировки иммунцитов мышей, в условиях последовательной экспериментальной субхронической экспозиции техногенных и природных модификаторов, выявлен дисбаланс показателей неспецифического и адаптивного клеточного иммунитета, сопряженный с формируемыми бенз(а)пиреном гранулоцитарной альтерацией и нарушением контроллинга клеточной пролиферации, отменяемые CGF. Последовательное поступление комплекса CGF приводило к оптимизации работы иммунной системы по ряду его показателей, позитивной модификации имунотропных эффектов бенз(а)пирена, снимая супрессию гранулоцитарного и сопряженного с интегрином лимфоцитарного ростков крови, оказывая преимущественно фагоцитоз-протективные эффекты, а также антиапоптотическое и интегрин-миметическое действие.

Ключевые слова: бенз(а)пирен, токсичность, фактор роста хлореллы, эксперимент *in vivo*, фагоцитоз, иммунорегуляция

EXPERIMENTAL STUDY OF THE EFFECTS OF BENZ(A)PYRENE AND CHLORELLA GROWTH FACTOR *IN VIVO* ASSOCIATED WITH CELLULAR CLUSTERS OF INNATE AND ADAPTIVE IMMUNITY

Shirinkina A.S.^a, Dolgikh O.V.^{a, b}

^a Federal Research Center of Medical and Preventive Technologies of Risk Management for Public Health, Perm, Russian Federation

^b Perm National Research Polytechnic University, Perm, Russian Federation

Abstract. Benz(a)pyrene is a first hazard class aromatic compound which exerts carcinogenic, mutagenic, hematotoxic, and immunotropic effects. The study of cell clusters influenced *in vivo* by exogenous haptens using laboratory mice as a model object allows us to expand knowledge about the mechanisms and features of immunotropic effects induced by benzo(a)pyrene. The experimental series involved 12 female outbred white mice. The concentration of benzo(a)pyrene for a single dose was 6 µg/L. To neutralize its effects, the Chlorella growth factor (CGF) concentrate was used as an adaptogen, which was consistently administered over 4 weeks at a dose of 60–70 mlns/mL of living cells. Both substances were administered via oral tube in a volume of 1 mL. The study of cell phagocytosis was carried out by the method of V.N. Kaplin. Analysis of the total number of leukocytes and lymphocytes was carried out using a hematology analyzer. The study of cell differentiation clusters was carried out using flow cytometry. Microsoft® Office Excel and Statistica 6.0 programs were used for statistical evaluation. Results: subchronic intoxication with benzo(a)pyrene under the *in vivo* experimental conditions led to significant modification of cellular immunity, exhibiting a phenotype of deficient innate cellular immunity factors, and imbalance of adaptive cellular immunity with a predominant inhibition of apoptotic activity (CD95⁺) and modeling of integrin- and VEGF-mediated events (CD11a, CD309). Sequential intake of the natural modifier (CGF) was characterized by normalization of phagocytic activity and alleviation of benzo(a)pyrene-induced effects. Conclusions of the study are limited by small number of experimental sample. The *in vivo* experiment have shown an imbalanced pattern of nonspecific and adaptive cellular immunity, associated with granulocyte changes caused by benzo(a)pyrene along with disturbed control of cell proliferation alleviated by CGF. The intake of the CGF complex led to optimization of immune system as shown by a number of indexes, along with positively modified immunotropic effects of benzo(a)pyrene with cancelled suppression of granulocytic and integrin-associated lymphoid lineages, which provides, mostly, phagocytosis protection, as well as anti-apoptotic and integrin-mimetic effects.

Keywords: benzo(a)pyrene, toxicity, Chlorella growth factor, *in vivo* experiment, phagocytosis, immunoregulation

Введение

Бензапирен является высокотоксичным и канцерогенным веществом. Он принадлежит к группе полициклических ароматических углеводородов (ПАУ), которые образуются при неполном сгорании органических материалов, таких как нефть, уголь и древесина. Бенз(а)пирен отнесен к веществам первого класса опасности, с чрезвычайно опасным воздействием на окружающую среду и человека. Пути проникновения бенз(а)пирена в организм разнообразны: с пищей и водой, через кожу и дыхание [1, 3]. Бенз(а)пирен индуцирует нарушения иммунной и нейрогуморальной регуляции, а также оказывает мутагенное действие [2].

Зеленая микроводоросль рода *Chlorella vulgaris* является наиболее распространенным и традиционным представителем рода зеленых одноклеточных, коккоидных форм, водорослей, которые размножаются с помощью автоспор и имеют размеры клеток от 2 до 10 мкм [16]. Благодаря высокой концентрации белка (50%), хлорелла является источником незаменимых аминокислот, необходимых для обмена веществ [14]. Биологически активные вещества биомассы хлореллы оказывают противовоспалительное, антиоксидантное и противомикробное действие [5, 6, 7, 10]. По исследованиям на мышах комплекс *Chlorella growth factor* (CGF) может быть полезен для профилактики atopических состояний, ассоциированных с избыточной активацией гуморального иммунитета [4, 8, 9].

Актуальность представляет оценка и верификация в условиях эксперимента *in vivo* вероятных иммуотропных эффектов бенз(а)пирена и возможности модификации негативных сценариев последовательной экспозицией природным адаптогеном CGF.

Цель исследования — оценка эффектов *in vivo* бензо(а)пирена в условиях его изолированного и сочетанного с природным гаптеном *Chlorella growth factor* (CGF) действия для задач изучения механизма формирования и последующей отмены ранних иммунорегуляторных нарушений, сопряженных с экспозицией бензо(а)пиреном.

Материалы и методы

Эксперимент проводили на самках белых беспородных мышей в количестве 12 особей. Мыши содержались в соответствии с ГОСТ 33216-2014 «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила содержания и ухода за лабораторными грызунами и кроликами» и получали стандартный корм и воду без ограничения.

Интоксикация бензо(а)пиреном моделировалась на 6 половозрелых самках белых беспородных мышей в условиях субхронического эксперимента. Мышам вводили бенз(а)пирен посредством перорального зонда в концентрации 6 мкг/л (подобрана по результатам экспериментальной оценки клеточной витальности) в 1,0 мл раствора в течение 21 дня. После контрольного забора биосред ежедневно вводился концентрат CGF, содержащий 60–70 млн/мл живых клеток *Chlorella growth factor* по 1,0 мл раствора в течение 21 дня. Группу контроля составили 6 самок белых беспородных мышей, получавшие 1 мл физраствора.

Исследование фагоцитарной активности клеток проводили с использованием формализированных эритроцитов барана в качестве объектов фагоцитоза, производства НПО «Микроген».

Относительное количество популяций и субпопуляций лимфоцитов определяли с использованием флуоресцентно меченых моноклональных антител, связывающихся со специфическими рецепторами: CD25, CD95, CD11a, CD309. Исследование проводили на проточном цитофлуориметре BD FACSCalibur™ (Becton Dickinson, США), сбор и обработка цитометрических данных осуществляли с использованием пакета прикладных программ CELLQuestPro и MultiSET.

Для статистической обработки результатов исследования применяли методы математической статистики с помощью программы Microsoft® Office Excel 2003 и пакета прикладных программ Statistica 6.0 (StatSoft, США). Для проверки статистических гипотез о виде распределения был применен критерий Колмогорова—Смирнова. Во всех случаях распределение признаков соответствовало закону нормального распределения. Количественные признаки представлены как среднее арифметическое $\pm$ ошибка среднего ($M \pm m$). Для оценки значимости различий зависимых выборок использовали t-критерий Стьюдента. Проверка нулевых гипотез об отсутствии различий между долями выполнена с помощью критерия хи-квадрат (χ^2). Критическое значение уровня статистической значимости при проверке нулевых гипотез принималось $p < 0,05$.

Результаты

Результаты экспериментального изучения образцов периферической крови (гранулоцитарный и лимфоцитарный ростки) мышей *in vivo* в условиях комбинированной последовательной экспозиции бенз(а)пиреном (БП) и *Chlorella growth factor* представлены в таблице 1.

Сравнительный анализ с показателями контроля позволил установить угнетение фагоцито-

ТАБЛИЦА 1. ФАГОЦИТОЗ И КЛАСТЕРЫ КЛЕТОЧНОЙ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ В СРАВНИВАЕМЫХ ГРУППАХ

TABLE 1. PHAGOCYTOSIS AND CLUSTERS OF CELL DIFFERENTIATION IN COMPARED GROUPS

Показатель Index	Контроль Control n = 6 (M±m)	Опыт Experiment n = 6 (M±m)		p ₁	p ₂
		БП B[a]P	БП + CGF B[a]P + CGF		
Фагоцитарное число, у. е. Phagocytic number, c. u.	0,43±0,06	0,36±0,06	0,40±0,04	0,00	0,09
Фагоцитарный индекс, у. е. Phagocytic index, c. u.	1,54±0,08	1,27±0,14	1,63±0,21	0,02	0,01
CD25, отн., % CD25 lymphocytes, %	48,66±2,15	23,26±1,12	18,50±0,20	0,01	0,03
CD95, отн., % CD95 lymphocytes, %	31,55±2,14	13,79±1,52	8,05±0,88	0,00	0,01
CD11a, отн., % CD11a lymphocytes, %	3,10±0,23	1,99±0,22	6,27±1,00	0,04	0,03
CD309, отн., % CD309 lymphocytes, %	1,68±0,22	2,25±0,12	3,13±0,09	0,02	0,02

Примечание. p₁ – достоверность результатов в опытной группе животных (БаП) относительно группы контроля; p₂ – достоверность результатов в опытной группе животных в динамике эксперимента (БаП) → (БаП + CGF).

Note. p₁, reliability of results in the experimental group of animals (BaP) relative to the control group; p₂, reliability of results in the experimental group of animals in the dynamics of the experiment (BaP) → (BaP+CGF).

за по критерию фагоцитарного числа и фагоцитарного индекса у животных в опытной группе в пробах индуцированных бенз(а)пиреном в 1,2 раза, добавление CGF в течение трех недель приводило к восстановлению активности фагоцитоза до уровня показателей контрольной группы (p ≤ 0,05).

Активационные кластеры клеточной дифференцировки CD25⁺ и CD95⁺ отражают способность лимфоцитов к пролиферации и дифференцировке и характеризуют функциональное состояние активированных Т-лимфоцитов. Рецептор CD95⁺ играет важную роль в контроле цикличности функционирования клеток иммунной системы, являясь одним из рецепторов апоптоза, а экспрессия данного показателя определяет степень готовности клеток к запрограммированной клеточной гибели. Воздействие бенз(а)пирена приводило к снижению экспрессии лимфоцитарных кластеров в опытной группе животных (в 2,0-2,4 раза), причем последовательное поступление CGF не приводило к восстановлению данных показателей, усугубляя их дефицит у животных, что предполагает ограничения к использованию фактора для восстановления баланса запрограммированной клеточной гибели.

У мышей в опытной группе наблюдения в условиях перорального введения бензо(а)пирена выявлено достоверное снижение минорных кластеров клеточной дифференцировки с фенотипом CD11a. Дисбаланс фактора экспрессии

дендритных клеток CD11a формирует риски развития васкулярной патологии, ассоциированные с интегрином, прежде всего в центральной нервной системе. Введение CGF восстанавливает уровень экспрессии альфа-интегрина, отменяя супрессивный эффект бензо(а)пирена.

Трансмембранный гликопротеин CD309 играет важную роль в формировании функционального состояния сосудов и регуляции их проницаемости, являясь одним из трех клеточных сигнальных тирозинкиназных рецепторов семейства VEGF, играет ключевую роль в опухолевом ангиогенезе. Отмечается статистически значимое увеличение экспрессии данного маркера в результате экспозиции бензо(а)пиреном, причем CGF также обладает протективным эффектом, стимулируя экспрессию рецептора CD309.

Обсуждение

Согласно литературным данным, даже в низких дозах пероральный прием бенз(а)пирена способен вызывать повреждение ДНК, увеличивая потенциальный риск развития онкологических процессов [18]. Помимо этого бенз(а)пирен может нарушать рост клеток, стабильность геномной ДНК, формирует дисбаланс апоптоза клеток [17].

Другими авторами отмечено, что *Chlorella vulgaris* оказывает протективное действие в отношении лабораторных животных, облученных

гамма-лучами, снижая повреждение клеток и оптимизируя их количество [13, 15]. Хлорелла способствует выведению радиоактивного стронция из организма путем адсорбции в кишечнике [11]. *Chlorella vulgaris* способствовала нормализации клеточного статуса белых нелинейных мышей, подвергшихся воздействию свинца, увеличивая количество иммунных клеток NK-киллеров, интерферона IFN γ , цитокина IL-1 α и TNF α [12].

Заключение

Результаты экспериментальных исследований *in vivo* на примере техногенного гаптена бенз(а)пирена и сложного нуклеотидно-пептидного комплекса *Chlorella growth factor* позволили установить, что у мышей, индуцированных бенз(а)пиреном, отмечалось угнетение фагоцитарной активности нейтрофилов в 1,2 раза по критериям фагоцитарного числа и фагоцитарного индекса,

Chlorella growth factor восстанавливал активность системы фагоцитоза до уровня неэкспонированных животных. Кластеры клеточной дифференцировки экспонированных бензо(а)пиреном мышей характеризовались угнетением экспрессии в 2,0-2,4 раза (активационные маркеры и интегрин-альфа), в отличие от рецептора тирозинкиназы семейства VEGF CD309, его продукция возросла в 1,3 раза. Разнонаправленные изменения наблюдались в показателях клеточных субпопуляций лимфоцитов по результатам последовательной нагрузки CGF: если кластеры CD25 и CD95 не успели восстановиться, продолжив тенденцию к снижению, то относительный уровень экспрессии интегрин и рецептора VEGF характеризовался достоверным его повышением, а рост экспрессии CD11a после введения CGF был сопряжен с отменой негативных эффектов бензо(а)пирена.

Список литературы / References

1. Гребенкина А.С., Сви́дерский Н.Г. Бензапирен как один из факторов загрязнения атмосферного воздуха в городе // Пожарная и техносферная безопасность: проблемы и пути совершенствования, 2020. № 1 (5). С. 197-200. [Greibenkina A.S., Sviderskiy N.G. Benzapirene as one of the atmospheric air pollution factors in the city. *Pozharnaya i tekhnosfernaya bezopasnost: problemy i puti sovershenstvovaniya = Fire and Technospheric Safety: Problems and Ways of Improvement*, 2020, no. 1 (5), pp. 197-200. (In Russ.)]
2. Никоношина Н.А., Долгих О.В. Иммунный и нейрогуморальный профиль детского населения, проживающего в условиях экспозиции бенз(а)пиреном // Гигиена и санитария, 2022. Т. 101, № 12. С. 1542-1547. [Nikonoshina N.A., Dolgikh O.V. Immune and neurohumoral profile of the children population living in the conditions of exposure to benzo(a)pyrene. *Gigiyena i sanitariya = Hygiene and Sanitation*, 2022, Vol. 101, no. 12, pp. 1542-1547. (In Russ.)]
3. Скугорева С.Г., Домрачева Л.И., Кутявина Т.И., Абдухаллилов О.М., Забубенина Ю.С., Ашихмина Т.Я. Оценка токсичности почвы, загрязненной бенз[а]пиреном // Принципы экологии, 2022. № 3. С. 61-69. [Skugoreva S.G., Domracheva L.I., Kutavina T.I., Abdukhalilov O.M., Zabubenina Yu.S., Ashikhmina T.Ya. Evaluation of the toxicity of soil contaminated benz[a]pyrene. *Printsiipy ekologii = Principles of the Ecology*, 2022, no. 3, pp. 61-69. (In Russ.)]
4. Bae M.J., Shin H.S., Chai O.H., Han J.G., Shon D.H. Inhibitory effect of unicellular green algae (*Chlorella vulgaris*) water extract on allergic immune response. *J. Sci. Food Agric.*, 2013, Vol. 93, no. 12, pp. 3133-3136.
5. Barkia I. Saari N. Microalgae for High-Value Products Towards Human Health and Nutrition. *Mar. Drugs*, 2019, Vol. 17, no. 5, 304. doi: 10.3390/md17050304.
6. Chheng J., Shih M. Potential hypoglycemic effects of *Chlorella* in streptozotocin-induced diabetic mice. *Life Sci.*, 2005, Vol. 77, no. 9, pp. 980-990.
7. Chheng J., Shih M. Improving glycogenesis in Streptozotocin (STZ) diabetic mice after administration of green algae *Chlorella*. *Life Sci.*, 2006, Vol. 78, no. 11, pp. 1181-1186.
8. Hasegawa T., Ito K., Ueno S., Kumamoto S., Ando Y., Yamada A., Nomoto K., Yasunobu Y. Oral administration of hot water extracts of *Chlorella vulgaris* reduces IgE production against milk casein in mice. *Int. J. Immunopharmacol.*, 1999, Vol. 21, no. 5, pp. 311-323.
9. Hidalgo-Lucas S., Bisson J., Duffaud A., Nejdi A., Deremaux L., Baert B., Degraeve M., Rozan P. Benefits of oral and topical administration of ROQUETTE *Chlorella* sp. on skin inflammation and wound healing in mice. *Antiinflamm. Antiallergy Agents Med. Chem.*, 2014, Vol. 13, no. 2, pp. 93-102.
10. Kralovec J.A., Power M.R., Liu F., Maydanski E., Ewart H.S., Watson L.V. Barrow C.J., Lin T.J. An aqueous *Chlorella* extract inhibits IL-5 production by mast cells *in vitro* and reduces ovalbumin-induced eosinophil infiltration in the airway in mice *in vivo*. *Int. J. Immunopharmacol.*, 2005, Vol. 5, no. 4, pp. 689-698.
11. Ogawa K., Fukuda T., Han J., Kitamura Y., Shiba K., Odani A. Evaluation of *chlorella* as a decorporation agent to enhance the elimination of radioactive strontium from body. *PLoS One*, 2016, Vol. 11, no. 2, e0148080. doi: 10.1371/journal.pone.0148080.

12. Queiroz M.L., Rocha M.C., Torello C.O., Queiroz J.S., Bincoletto C., Morgano M., Romano M., Paredes-Gamero E., Barbosa C.M., Calgarotto A.K. Chlorella vulgaris restores bone marrow cellularity and cytokine production in lead-exposed mice. *Food Chem. Toxicol.*, 2011, Vol. 49, no. 11, pp. 2934-2941.
13. Sarma L., Tiku A.B., Kesavan P.C., Ogaki M. Evaluation of radioprotective action of a mutant (E-25) form of Chlorella vulgaris in mice. *J. Radiat. Res.*, 1993, Vol. 34, no. 4, pp. 277-284.
14. Shim J.Y., Shin H.S., Han J.G., Park H.S., Lim B.L., Chung K.W., Om A. Protective effects of Chlorella vulgaris on liver toxicity in cadmium-administered rats. *J. Med. Food*, 2008, Vol. 11, no. 3, pp. 479-485.
15. Singh S.P., Tiku A.B., Kesavan P.C. Post-exposure radioprotection by Chlorella vulgaris (E-25) in mice. *Indian J. Exp. Biol.*, 1995, Vol. 33, no. 8, pp. 612-615.
16. Zempo-Miyaki A., Maeda S., Otsuki T. Effect of Chlorella-derived multicomponent supplementation on maximal oxygen uptake and serum vitamin B2 concentration in young men. *J. Clin. Biochem. Nutr.*, 2017, Vol. 61, no. 2, pp. 135-139.
17. Zhan S., Zhang X., Cao S., Huang J. Benzo(a)pyrene disrupts mouse preimplantation embryo development. *Fertil. Steril.*, 2015, Vol. 103, no. 3, pp. 815-825.
18. Zheng Z., Park J. K., Kwon O.W., Ahn S.H., Kwon Y.J., Jiang L., Zhu S., Par B.H. The risk of gastrointestinal cancer on daily intake of low-dose BaP in C57BL/6 for 60 Days. *J. Korean Med. Sci.*, 2022, Vol. 37, no. 30, e235. doi: 10.3346/jkms.2022.37.e235.

Авторы:

Ширинкина А.С. — младший научный сотрудник лаборатории методов клеточных технологий отдела иммунобиологических методов диагностики ФБУН «Федеральный научный центр медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения», г. Пермь, Россия

Долгих О.В. — д.м.н., заведующий отделом иммунобиологических методов диагностики ФБУН «Федеральный научный центр медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения»; профессор ФГАОУ ВО «Пермский национальный исследовательский политехнический университет», г. Пермь, Россия

Authors:

Shirinkina A.S., Junior Research Associate, Laboratory of Cell Technology Methods, Department of Immunobiological Diagnostic Methods, Federal Research Center of Medical and Preventive Technologies of Risk Management for Public Health, Perm, Russian Federation

Dolgikh O.V., PhD, MD (Medicine), Head, Department of Immunobiological Diagnostic Methods, Federal Research Center of Medical and Preventive Technologies of Risk Management for Public Health; Professor, Perm National Research Polytechnic University, Perm, Russian Federation

Поступила 29.02.2024
Принята к печати 17.03.2024

Received 29.02.2024
Accepted 17.03.2024

ВЛИЯНИЕ РИФАМПИЦИНА НА ЭКСПРЕССИЮ ГЕНОВ СИСТЕМЫ TOLL-ПОДОБНЫХ РЕЦЕПТОРОВ В СТРУКТУРАХ ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫСЯТ С ПРЕНАТАЛЬНЫМ ВОЗДЕЙСТВИЕМ АЛКОГОЛЯ

Айрапетов М.И.^{1,2}, Ереско С.О.¹, Михайлова А.А.¹, Суханова Д.Д.¹,
Игнатова П.Д.¹, Лебедев А.А.¹, Бычков Е.Р.¹, Шабанов П.Д.^{1,2}

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

² ФГБВОУ ВО «Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова», Санкт-Петербург, Россия

Резюме. Поступление алкоголя в организм во время беременности может отразиться на нормальном ходе эмбрионального развития плода, что приведет к формированию симптомов фетального алкогольного спектра нарушений (ФАСН). Имеются сведения о том, что при ряде пренатальных патологических состояниях наблюдаются изменения в регуляции механизмов экспрессии ряда про- и противовоспалительных цитокинов. В нашем исследовании мы сосредоточили внимание на изучении уровня экспрессии ряда генов про- и противовоспалительных цитокинов в переднем и височном отделах мозга крысят в постнатальном периоде развития при моделировании пренатального воздействия алкоголя (ПВА). Также оценили уровень экспрессии генов, которые ассоциированы с регуляцией экспрессией генов про- и противовоспалительных цитокинов. Кроме того, в задачи нашего исследования входило произвести фармакологическую коррекцию наблюдаемых изменений потенциальным фармакологическим агентом — рифампицином, который по данным других исследований оказывал нейропротекторный эффект. Моделирование ПВА осуществлялось путем спаивания беременных самок крыс 15%-ным раствором этанола на протяжении всей беременности. Инъекции выполнялись крысятам с 1-го по 7-й постнатальные дни. Забор структур мозга для анализа экспрессии генов осуществлялся на 8-е постнатальные сутки. Результаты исследования показали наличие изменений в экспрессии генов *Tlr3* и *Tlr4* на 8-е сутки постнатального развития в передней и височной долях головного мозга. Экспрессия генов *Mycd88* и *Ticam* имела разнонаправленные изменения среди исследуемых структур мозга крысят с ПВА. Отмечен повышенный уровень мРНК провоспалительных генов. Применение Rif в эксперименте показало способность Rif (50 мг/кг) корректировать наблюдаемые долгосрочные патологические изменения в экспрессии исследуемых генов. Представляется интересным изучение в будущем дозозависимого эффекта, а также исследование выявленных изменений белковыми методами. Кроме того, представляется важным в будущем изучение системы

Адрес для переписки:

Айрапетов Марат Игоревич
ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины»
197376, Россия, Санкт-Петербург, ул. Академика
Павлова, 12.
Тел.: 8 (952) 269-22-20.
E-mail: interleukin1b@gmail.com

Address for correspondence:

Marat I. Airapetov
Institute of Experimental Medicine
12 Acad. Pavlov St
St. Petersburg
197376 Russian Federation
Phone: +7 (952) 269-22-20.
E-mail: interleukin1b@gmail.com

Образец цитирования:

М.И. Айрапетов, С.О. Ереско, А.А. Михайлова,
Д.Д. Суханова, П.Д. Игнатова, А.А. Лебедев,
Е.Р. Бычков, П.Д. Шабанов «Влияние рифампицина на
экспрессию генов системы Toll-подобных рецепторов
в структурах головного мозга крысят с пренатальным
воздействием алкоголя» // Медицинская иммунология,
2025. Т. 27, № 1. С. 75–86.
doi: 10.15789/1563-0625-EOR-2935

© Айрапетов М.И. и соавт., 2025
Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

M.I. Airapetov, S.O. Eresko, A.A. Mikhailova,
D.D. Sukhanova, P.D. Ignatova, A.A. Lebedev, E.R. Bychkov,
P.D. Shabanov "Effect of rifampicin on Toll-like receptor
system gene expression in brain structures of rats with
prenatal alcohol exposure", Medical Immunology (Russia)/
Meditsinskaya Immunologiya, 2025, Vol. 27, no. 1, pp. 75–86.
doi: 10.15789/1563-0625-EOR-2935

© Airapetov M.I. et al., 2025
The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License
DOI: 10.15789/1563-0625-EOR-2935

TLR-сигнализации в других структурах мозга с ПВА, а также на разных сроках постнатального развития в онтогенезе.

Ключевые слова: мозг, пренатальное воздействие алкоголя, алкоголь, цитокины, Toll-подобные рецепторы, нейровоспаление, рифампицин

EFFECT OF RIFAMPICIN ON TOLL-LIKE RECEPTOR SYSTEM GENE EXPRESSION IN BRAIN STRUCTURES OF RATS WITH PRENATAL ALCOHOL EXPOSURE

Airapetov M.I.^{a, b}, Eresko S.O.^a, Mikhailova A.A.^a, Sukhanova D.D.^a, Ignatova P.D.^a, Lebedev A.A.^a, Bychkov E.R.^a, Shabanov P.D.^{a, b}

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

^b S. Kirov Military Medical Academy, St. Petersburg, Russian Federation

Abstract. Alcohol intake during pregnancy may affect the normal course of fetal development, causing the symptoms of fetal alcohol spectrum disorders (FASD). There is evidence that a number of prenatal pathologic conditions exhibit altered expression of several pro- and anti-inflammatory cytokines. In our study, we focused on studying expression of numerous pro- and anti-inflammatory cytokine genes in the forebrain and temporal regions of rat brain during the postnatal development, thus modeling prenatal alcohol exposure effects (PAE). We also evaluated expression of genes associated with regulation of genes controlling expression of pro- and anti-inflammatory cytokines. Moreover, the objectives of our study included pharmacological correction of the observed changes by rifampicin (Rif), a potential pharmacological agent which had a neuroprotective effect shown by other studies. The experimental model of PAE was produced by oral intake of 15% ethanol solution to pregnant female rats throughout pregnancy. The drug injections were performed to the pups from the 1 to the 7 postnatal days. Brain structures were sampled for gene expression analysis on the 8 postnatal day. The results of the study showed distinct changes in *Tlr3* and *Tlr4* gene expression in anterior and temporal lobes of brain on the 8 day of postnatal development. Expression of *Myd88* and *Ticam* genes showed multidirectional changes among the studied brain structures of PAE rats. The increased mRNA level of proinflammatory genes was noted. Usage of Rif in experiments showed the ability of Rif (50 mg/kg) to correct the observed long-term pathological changes in the expression of the genes under study. It is of interest to study the dose-dependent effect in the future, as well as to investigate the revealed changes at the level of protein analysis. In future studies, it seems important to evaluate TLR signaling system in other brain structures with PAE, as well as at different terms of postnatal development in ontogenesis.

Keywords: brain, prenatal alcohol effects, alcohol, cytokines, Toll-like receptors, neuroinflammation, rifampicin

Работа выполнена в рамках государственного задания № 075-01393-23-04 Минобрнауки России.

Введение

Пренатальные повреждения центральной нервной системы служат причиной широкого спектра психоневрологических и когнитивных расстройств у детей [19, 39, 50, 56]. Пренатальное воздействие алкоголя (ПВА) служит причиной развития симптомов фетального алкогольного спектра нарушений (ФАСН) [35]. Особое место занимает спектр нарушений со стороны центральной нервной системы, которая является

одной из наиболее чувствительных к поступающему со стороны матери алкоголю [1, 35, 43, 45].

Исследования последних лет подтверждают тот факт, что медиаторы воспаления, в том числе цитокины, в ЦНС задействованы в механизмах регуляции высших функций мозга [48]. Дисрегуляция этих механизмов на молекулярном уровне в развивающемся мозге активно изучается в последние годы. Так, ряд результатов был получен на модели материнского воспаления (англ. *maternal inflammation*), которое заключается во введении антигенов на разных сроках беременности с целью получения иммунного ответа и дальнейшего изучения влияния этих изменений в организме на ход нейрогенеза плода [19, 39, 50, 56]. На данный момент существует не так много

работ в мировой литературе, которые уделяли бы внимание состоянию нейроиммунных взаимодействий в развивающемся мозге при ПВА, практически отсутствуют сведения о влиянии ПВА на систему врожденного иммунитета в ЦНС.

Цель нашей работы заключалась в получении новых сведений о влиянии ПВА на уровень экспрессии генов системы врожденного иммунитета у крыс в переднем и височном отделах головного мозга в неонатальном периоде развития. Кроме того, в задачи нашего исследования входило выполнение фармакологической коррекции нейроиммунных механизмов в неонатальном мозге крыс с ПВА посредством рифампицина (Rif). Данный препарат был выбран нами исходя из того, что в литературе описываются его противовоспалительные и нейропротекторные свойства, которые были получены на различных моделях патологических состояний нервной системы [10, 11, 55].

Материалы и методы

Животные

В эксперименте использовали взрослых самцов (250–300 г, $n = 3$) и самок (200–250 г, $n = 6$) крыс породы Wistar, которые были приобретены в питомнике «Рапполово» (Россия). Самок и самцов содержали в отдельных пластиковых клетках. Животные имели неограниченный доступ к воде и корму. Каждый самец был спарен с двумя самками в клетке. Первый день беременности устанавливали на основании обнаружения у самок сперматозоидов в вагинальном мазке. При обнаружении сперматозоидов производили маркировку (всего было 6 беременных самок), определяли массу тела крысы, отсаживали ее в отдельную клетку и начинали отсчет срока беременности.

Моделирование пренатального воздействия алкоголя (ПВА)

Беременные крысы были разделены на две группы: группа полупринудительной алкоголизации 15%-ным раствором этанола в качестве единственного источника жидкости ($n = 3$) и контрольная группа, получающая воду ($n = 3$). В каждом помете было по 8–10 крысят, для продолжения эксперимента оставляли по 6 крысят в помете. Всего 18 крысят с ПВА, 18 крысят без ПВА. Измеряли массу тела крыс во время беременности, а также массу тела потомства. Нами не было обнаружено значительных различий в массе тела между группами.

Введение рифампицина (Rif)

Полученному потомству крысят с ПВА на протяжении первых 7 суток неонатального развития были выполнены внутривентральные инъекции рифампицина ($n = 6$; 50 мг/кг; рифампицин, лиофилизат д/приг.концентрата д/приг р-ра для

инфузий 150 мг, РУП «Белмедпрепараты», Беларусь). Инъекции выполнялись крысам, взятым случайно из разных помётов по 2 крысёнка из каждого помёта. Рифампицин растворяли в физ. растворе. Второй («ПВА + физ. р-р.»; $n = 4$) и третьей («контроль»; $n = 6$) группе крысят на протяжении первых 7 суток неонатального развития были выполнены внутривентральные инъекции физ. р-ра в эквивалентном объеме. На 8-е сутки постнатального развития был произведен забор необходимых структур головного мозга, образцы мозга немедленно замораживались и хранились при -78°C .

ПЦР в режиме реального времени

Выделение тотальной РНК выполняли реагентом ExtractRNA (ЗАО «Евроген», Россия) в полном соответствии с инструкцией производителя. Обработку проб проводили с использованием ДНКазы (Promega, США). Концентрацию полученной РНК измеряли на спектрофотометре Implen NanoPhotometer P330 (Implen, Германия), по отношению A_{260}/A_{280} (в норме $\geq 1,8$) оценивали чистоту выделенного продукта. Синтез кДНК проводили методом обратной транскрипции (ОТ) в 20 мкл с использованием набора реактивов MMLV RT kit (ЗАО «Евроген», Россия) в полном соответствии с инструкцией производителя. Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) с детекцией в режиме реального времени (Mx3005P, Stratagene, США) проводили в 10 мкл реакционной смеси, содержащей SYBR Green (ЗАО «Евроген», Россия), смесь специфических прямых и обратных праймеров (табл. 1) (Beagle, Россия), подобранных с использованием программного обеспечения Primer-BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). Полученные данные нормировались к уровню гена *Gapdh* и рассчитывались в относительных единицах по отношению к содержанию мРНК изучаемого гена методом 2^{-ΔΔCt} [30].

Статистическая обработка данных

Для статистической обработки полученных данных использовалась программа Graph Pad Prism v. 6. Для сравнения групп использовали U-критерий Манна–Уитни для независимых малых выборок. Нормальность распределения проверяли тестом Д’Агостино–Пирсона. Различия считали статистически значимыми при значении $p \leq 0,05$.

Результаты

Влияние пренатального воздействия алкоголя (ПВА) на уровень экспрессии генов TLR-сигнальных путей в структурах головного мозга крысят

В головном мозге крысят на 8-е сутки постнатального развития в передней и височной долях в группе с ПВА отмечается повышенный

ТАБЛИЦА 1. ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ ПРАЙМЕРОВ

TABLE 1. SEQUENCE OF PRIMERS

Ген Gene	Праймеры / Primers	
	Прямой (5'-3') / Forward (5'-3')	Обратный (5'-3') / Reverse (5'-3')
<i>Tlr3</i>	AACTGGAGAACCTCCAAGA	CACCCTGGAGAAAACCTCTT
<i>Tlr4</i>	ACTCTGATCATGGCATTGTT	GTCTCAATTTACACCTGGA
<i>Tlr7</i>	TGAAAATGGTATTTCCAATGTG	TAAGGGTAAGGTTGGTGTA
<i>Myd88</i>	TCATTGAGAAAAGGTGTCGT	AGTGCAGATAGTGATGAAC
<i>Ticam</i>	GCTCAGCTAGATGATGTGAT	TGACAGTGCAGACCTGG
<i>Irf1</i>	CGGAAGTTACCTTCTAGCTC	CGGAAGTTACCTTCTAGCTC
<i>Irf3</i>	AATTCCTCCCCTGGCTC	CATGGGATCCTGAACTTTGT
<i>Irf7</i>	TTGGTTACACTATCTGTGGC	CTACTGACCTCACCCAAGA
<i>Hmgb1</i>	CTCTGATGCAGCTTATACGA	AAAAGACTAGCTTCCCCTTG
<i>Il1β</i>	TGTCTGACCCATGTGAGCTG	TTTGGGATCCACACTCTCCAG
<i>Il6</i>	ACTTCACAAGTCGGAGGCTT	AATTGCCATTGCACAACCTTTTC
<i>Tnfα</i>	CACGTCGTAGCAAACCAC	TATGAAATGGCAAATCGGCT
<i>Il10</i>	CTGCAGGACTTTAAGGGTTA	CCTTTGTCTTGGAGCTTATT
<i>Il13</i>	TGTAACCAAAAGGCCTCGGA	TGGCCATAGCGGAAAAGTTG
<i>Il4</i>	CGGTGAACTGAGGAAACT	TCAGTGTTGTGAGCGTGG
<i>Gapdh</i>	GCCAGCCTCGTCTCATA	GTGGGTAGAGTCATACTGGA

уровень мРНК TLR3. Уровень TLR4 мРНК повышен только в передней доле. Уровень мРНК TLR7 остался без статистически значимых изменений в обоих исследуемых отделах мозга (рис. 1).

Анализ на содержание мРНК адаптерных белков (*Myd88*, *Ticam*) (рис. 2) и транскрипционных

факторов (*IRF1*, *IRF3*, *IRF7*) (рис. 3), характерных для TLR-сигналикации, позволил выявить повышение уровня экспрессии гена *Myd88* в височной доле и повышение экспрессии гена *Ticam* в височной доле. Экспрессия гена *Irf3* была повышена в обеих структурах мозга, тогда как экспрессия *Irf1* и *Irf7* осталась без статистически значимых изменений.

Оценка содержания мРНК ряда про- (*IL-1β*, *TNFα*, *IL-6*) (рис. 4) и противовоспалительных цитокинов (*TGF-β*, *IL-13*, *IL-10*, *IL-4*) (рис. 5) позволила выявить значимые изменения в экспрессии многих генов цитокинов в исследуемых отделах мозга. Отмечен повышенный уровень экспрессии *IL1β*, *Tnfα* и *Tgβ* в обоих отделах мозга, отмечается тенденция к повышению уровня экспрессии *IL6*. При этом в передней доле мозга был дополнительно выявлен повышенный уровень экспрессии остальных противовоспалительных генов *IL13*, *IL10*, *IL4*, тогда как в височной доле не обнаружено значимых изменений в экспрессии *IL10* и *IL4*, а экспрессия гена *IL13*, напротив, снижена.

HMGB1 — белок, опосредующий активацию путей внутриклеточной TLR4 и TLR7-сигналикации. В группе крысят с ПБА отмечается повышенный уровень экспрессии гена *Hmgb1* в передней доле головного мозга, отмечается тенденция к повышению в височной доле (рис. 6).

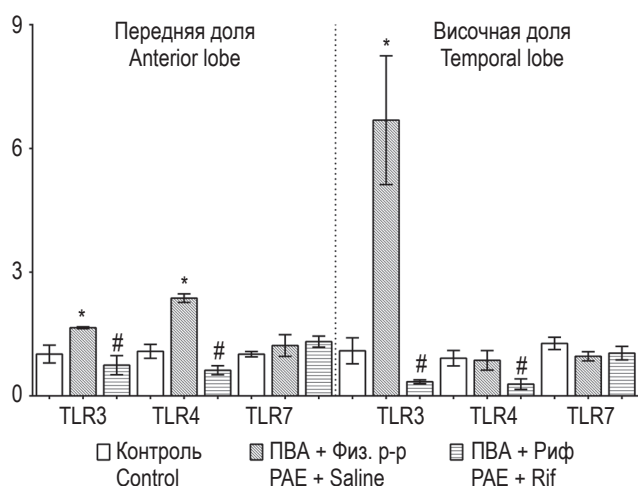


Рисунок 1. Содержание мРНК TLR в структурах головного мозга крысят на 8-е сутки неонатального развития (условные единицы, средние значения ± SEM)

Примечание. * – $p \leq 0,05$ по отношению к группе ПБА; # – $p \leq 0,05$ по отношению к контролю.

Figure 1. TLR mRNA content in rat brain structures on the 8th day of neonatal development (conditional units, mean values ± SEM)

Note. *, $p \leq 0.05$ vs control; #, $p \leq 0.05$ vs PBA group.

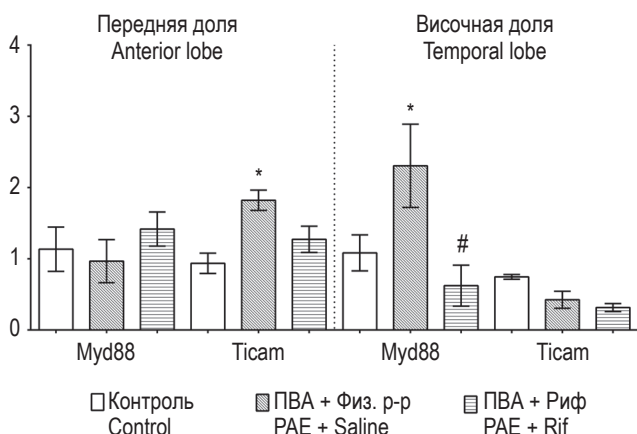


Рисунок 2. Содержание мРНК адаптерных белков в структурах головного мозга крысят на 8-е сутки неонатального развития (условные единицы, средние значения $\pm$ SEM)

Примечание. См. примечание к рисунку 1.

Figure 2. Adaptor protein mRNA content in rat brain structures on the 8th day of neonatal development (conditional units, mean values $\pm$ SEM)

Note. As for Figure 1.

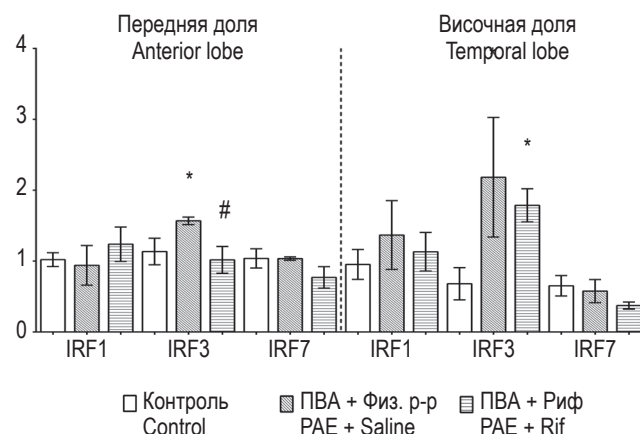


Рисунок 3. Содержание мРНК транскрипционных факторов в структурах головного мозга крысят на 8-е сутки неонатального развития (условные единицы, средние значения $\pm$ SEM)

Примечание. См. примечание к рисунку 1.

Figure 3. mRNA content of transcription factors in rat brain structures on the 8th day of neonatal development (conventional units, mean values $\pm$ SEM)

Note. As for Figure 1.

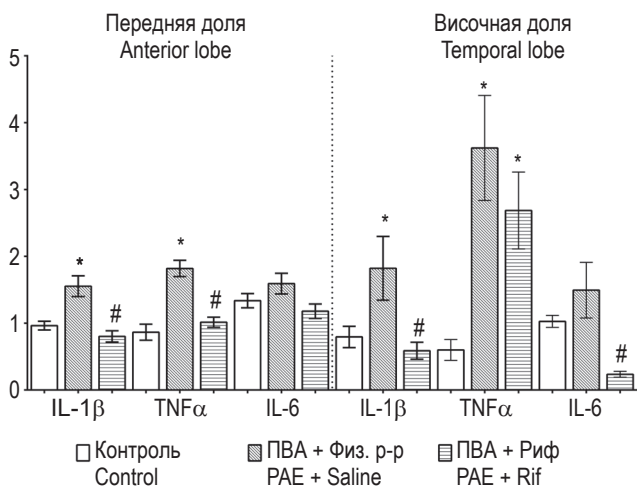


Рисунок 4. Содержание мРНК провоспалительных цитокинов в структурах головного мозга крысят на 8-е сутки неонатального развития (условные единицы, средние значения $\pm$ SEM)

Примечание. См. примечание к рисунку 1.

Figure 4. Proinflammatory cytokine mRNA content in rat brain structures on the 8th day of neonatal development (conditional units, mean values $\pm$ SEM)

Note. As for Figure 1.

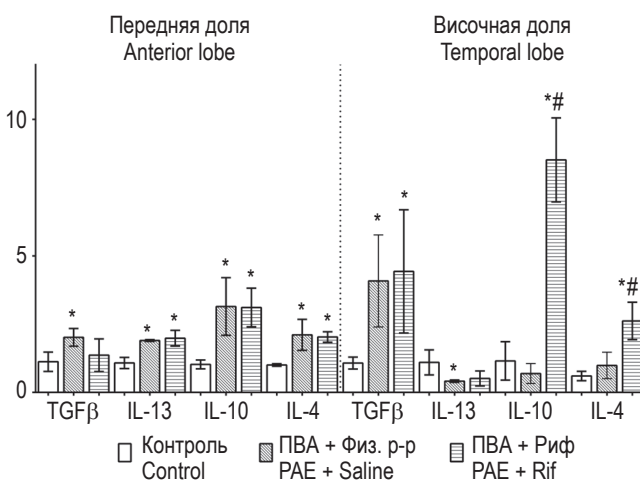


Рисунок 5. Содержание мРНК противовоспалительных цитокинов в структурах головного мозга крысят на 8-е сутки неонатального развития (условные единицы, средние значения $\pm$ SEM)

Примечание. См. примечание к рисунку 1.

Figure 5. mRNA content of anti-inflammatory cytokines in rat brain structures on the 8th day of neonatal development (conventional units, mean values $\pm$ SEM)

Note. As for Figure 1.

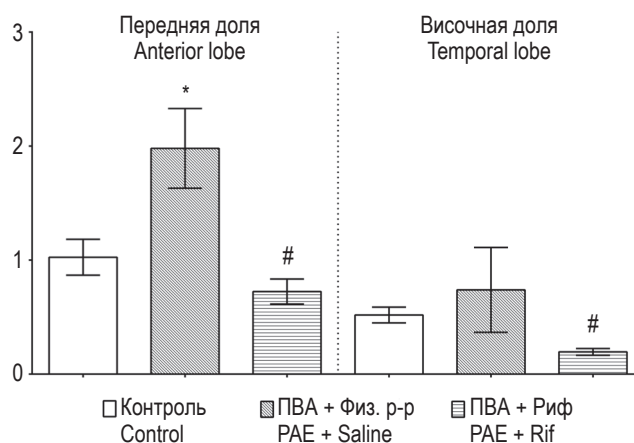


Рисунок 6. Содержание мРНК Hmgb1 в структурах головного мозга крысят на 8-е сутки неонатального развития (условные единицы, средние значения $\pm$ SEM)
Примечание. См. примечание к рисунку 1.

Figure 6. Hmgb1 mRNA content in rat brain structures on the 8th day of neonatal development (conditional units, mean values $\pm$ SEM)

Note. As for Figure 1.

Влияние рифампицина (Rif) на уровень экспрессии генов TLR-сигнальных путей в структурах головного мозга крысят с ПВА

Выполненные инъекции Rif (50 мг/кг) с 1-го по 7-й дни постнатального развития вызвали снижение уровня экспрессии генов *Tlr3* и *Tlr4* как в передней, так и в височной долях мозга до уровня контрольных значений. Рифампицин не оказал значимого влияния на экспрессию генов *Myd88*, *Ticam*, *Irf1* и *Irf7*, при этом экспрессия гена транскрипционного фактора *Irf3* была скорректирована инъекциями рифампицина до уровня контроля, однако лишь в передней доле мозга крысят.

Кроме того, в группе крысят с Rif была отмечена нормализация уровня экспрессии гена *IL1 β* в обоих отделах мозга, а также содержание мРНК HMGB1 до уровня контрольных значений. Повышенный уровень экспрессии *Tnfa* удалось скорректировать лишь в лобной доле, а на экспрессию гена *IL6* Rif оказал влияние лишь в височной доле мозга. На уровень экспрессии генов провоспалительных цитокинов рифампицин в нашем эксперименте не оказал значимых корректирующих эффектов.

Обсуждение

Поступление алкоголя в организм вызывает различные изменения в системе TLR-сигнализации в структурах головного мозга [3, 4,

5, 18, 23, 27]. С помощью агонистов и антагонистов к TLR, а также генетических манипуляций несколькими группами исследователей был подтвержден тот факт, что изменение активности TLR-сигнализации опосредуют развитие нейровоспалительных явлений в нервной ткани [7, 15, 18, 22, 23, 42, 44, 47, 54]. В исследованиях как *in vitro*, так и *in vivo* было показано, что воздействие этанола вызывает сходные с агонистами TLR изменения в нервной ткани, ведущие к развитию нейровоспалительного процесса, который проявляется повышением уровня медиаторов воспаления [3, 23, 54], повышением реактивности нейроглиальных клеток в провоспалительном направлении [5, 27, 28, 29, 44, 53], развитием апоптотических процессов в клетках нервной ткани [5, 7, 27, 42], нарушением синаптогенеза и миелинизации аксонов [3, 17].

Имеются сведения, что все подтипы TLR экспрессируются в головном мозге, начиная с самых ранних стадий онтогенеза [6, 26]. Существуют данные о наличии изменений в системе TLR-сигнализации в головном мозге потомства при некоторых пренатальных патологиях [8, 16, 32, 41]. Мы предположили, что в развивающемся мозге ПВА может быть причиной долгосрочных изменений в системе TLR-сигнализации. Кроме того, в эксперименте на крысах было показано, что воздействие этанола в подростковом возрасте приводит к длительному увеличению уровня экспрессии белка и мРНК TLR4 и TLR3 в префронтальной коре мозга крыс, сохраняясь при этом и во взрослом мозге. Повышенный уровень экспрессии TLR4 и TLR3 коррелировал в префронтальной коре животных с развитием когнитивных дисфункций при исследовании процессов обучения и памяти с помощью теста Барнс [51].

Выполненное нами моделирование ПВА позволило получить данные о том, что существуют изменения в экспрессии генов *Tlr3* и *Tlr4* на 8-е сутки постнатального развития в передней и височной долях головного мозга. Такие результаты стали подтверждением нашего предположения о возможных долгосрочных изменениях в экспрессии генов системы TLR в развивающемся мозге с ПВА. Нами не выявлено изменений в экспрессии гена *Tlr7* в головном мозге крысят с ПВА. Возможно, система TLR7 более устойчива к ПВА или изменения в экспрессии гена носят менее длительный характер.

Выполненные инъекции Rif в нашем эксперименте понизили уровень экспрессии *Tlr3* и *Tlr4* в группе крысят с ПВА до уровня контрольных значений. Данное соединение нами было выбрано на основании того, что на разных моделях нейровоспаления было показано, что Rif

способен снижать уровень провоспалительных цитокинов, содержание β -амилоида в модели болезни Альцгеймера, α -синуклеина в модели болезни Паркинсона. Есть исследования, показывающие улучшение процесса аутофагии у мышей в гиппокампе при воздействии Rif [6]. На модели демиелинизации мозолистого тела было показано, что при введении мышам Rif регистрируется снижение экспрессии маркеров апоптотических событий, а также снижение активности каспаз 3 и 12 [57], а предварительное введение Rif подавляло индуцированную литий-пилокарпином нейродегенерацию гиппокампа [8]. На культуре микроглиальных клеток были получены сведения о конкуренции Rif и липополисахарида за связывание с белком MD2 (англ. Myeloid Differentiation factor 2) [55]. Белок MD2 необходим для связывания лиганда TLR4 с последующим проведением сигнала. Rif, связываясь с данным белком, способствовал угнетению сигналинга LPS-CD14-MD2-TLR4-NF- κ B в эксперименте, и, как следствие, отмечалось снижение проведения сигнала через NF- κ B и экспрессии генов воспаления [55].

Показано, что нейроны и клетки глии секретируют белок HMGB1 во время активации рецепторов глутамата [34], а поступление этанола может сопровождаться эксайтотоксическим эффектом глутамата [9]. Во внеклеточном пространстве HMGB1 способен активировать TLR2, TLR4, TLR5 и TLR7, что служит причиной активации соответствующих этим рецепторам путей внутриклеточной сигнализации [2, 12]. Выполненное нами исследование показало, что экспрессия *Hmgb1* в группе крысят с ПБА была повышена в передней доле мозга крысят на 8-е сутки постнатального развития. Инъекции Rif понизили экспрессию *Hmgb1* до уровня контрольных значений.

Экспрессия генов *Myd88* и *Ticam* имела разнонаправленные изменения среди исследуемых структур мозга крысят с ПБА — повышение *Ticam* в передней доле, а *Myd88* в височной доле. Уровень экспрессии гена *Irf3* повышен в группе с ПБА в передней доле и височной доле мозга крысят. При этом в группе крысят с инъекциями Rif экспрессия *Irf3* была снижена до уровня контрольных значений. Инъекции Rif на оказали значимого влияния на экспрессию *Ticam*, *Myd88*, *Irf1* и *Irf7*.

Результаты нашего исследования показали повышенный уровень экспрессии провоспалительных генов *IL1 β* и *Tnf α* в мозге крысят с ПБА, имеется тенденция к повышению в экспрессии гена *IL6*. Инъекции Rif снизили уровень *IL1 β* до уровня контрольных значений, экспрессия *Tnf α*

была скорректирована рифампицином только в передней доле мозга.

Изменения в экспрессии генов цитокинов могут послужить одной из причин, влекущих к нарушениям протекания нормально хода нейрогенеза в головном мозге потомства с ПБА в неонатальном периоде развития, в которые происходят ключевые события нейрогенеза в наиболее филогенетически молодых структурах головного мозга, в частности в коре мозга.

В одном из исследований сообщается о повышении содержания белков TRIF, TNF α и IL-1 β в гиппокампе крыс после ПБА [44]. В мозге человеческих эмбрионов с ПБА (12,2-21,4 недели беременности) экспрессия мРНК цитокина TNF α и нескольких других провоспалительных хемокинов также была повышена [20]. Таким образом, из полученных нами результатов и из данных других исследователей можно заключить, что состояние экспрессии генов провоспалительных цитокинов подвержено длительным изменениям после ПБА в развивающемся мозге, однако молекулярные причины, инициирующие эти события, а также и последствия таких изменений еще предстоит исследовать.

Интересным для нас результатом исследования было и то, что в мозге крысят с ПБА на 8-е сутки развития отмечаются разнонаправленные изменения в экспрессии генов противовоспалительных цитокинов — отмечается повышенный уровень экспрессии *Tg β* , *IL13*, *IL10* и *IL4* в передней доле мозга крысят, в височной доле повышен уровень *Tg β* и понижен уровень *IL13*.

В литературе имеются сведения о повышенном уровне IL-10 у детей с задержкой нервного развития после перенесенного ПБА [13]. Сообщается, что IL-10 экспрессируется в мозговой ткани плода уже в первом триместре [38] и повышен при нормальной, неосложненной беременности [24], что предполагает важное участие белка в эмбриогенезе.

В работе на генетически модифицированных макрофагах, гиперэкспрессирующих IL-10, снижался индуцированный антигеном темп роста провоспалительных цитокинов TNF α , IL-1 β , IL-6 в мозге плода [36]. Кроме того, пренатальное воздействие антигена поли(I:C), экзогенного агониста TLR3, приводило к нарушению поведения у потомства, однако эти эффекты предотвращены у потомства, которые гиперэкспрессировали IL-10 [36, 49]. Сообщается, что в головном мозге микроглия экспрессирует низкие уровни IL-4 и IL-13 базально, но индукция цитокинов может вызываться при ряде состояний [46, 58]. Есть сведения, что рецептор к IL-13 расположен на дофаминергических нейронах, и гиперакти-

вация этого рецептора была связана с потерей дофаминергических клеток [37], что побудило к исследованиям влияния воздействия алкоголя на систему IL-13 из-за важности дофамина в развитии патологических изменений в мозге после употребления алкоголя. Внутриклеточные молекулярные пути этих цитокинов приводят к активации транскрипционного фактора STAT6, который связан с экспрессией цитокинов IL-10 и TGF- β , которые сами по себе играют ключевую роль в нейропротекции, в обучении и памяти [14, 21, 31, 52]. Наблюдения *in vitro* показали, что этанол увенчивал содержание IL-4 и IL-13 и их рецепторов на микроглии BV2 только в присутствии нейрональной культуры SH-SY5Y. Таким образом, по всей видимости, для индукции данных цитокинов необходимо присутствие нескольких типов клеток нейрональной ткани. Есть предположения, что в мозге эти цитокины могут ингибировать экспрессию провоспалительных цитокинов, а в работе на нейрональной культуре показано, что как IL-4, так и IL-13 не только уменьшают экспрессию IL-1 β и TNF α , но и ингибируют индукцию этих цитокинов, вызванную добавлением этанола. Авторы работы сообщают, что IL-4 и IL-13, зависимым от STAT6 способом, активируют экспрессию TGF- β и IL-10, а повышение этих ключевых противовоспалительных цитокинов может объяснять причину снижения в последующем уровня провоспалительных цитокинов [28]. Кроме того, было показано, что IL-13 подавляет инфильтрацию воспалительных клеток и потерю аксонов [40]. Внутривенно вводимый IL-13 мышам в модели ишемии головного мозга изменял состояние активации микроглии в сторону противовоспалительного фенотипа и обеспечивал активацию нейропротекторных путей. Так, например, наблюдали повышение уровня противовоспалительного цитокина IL-10 в плазме, однако IL-13 не смог изменить уровни основных провоспалительных молекул, таких как TNF α и IFN как в ЦНС, так и на периферии. Исследователи объясняют полученные наблюдения тем, что IL-13 не ингибирует провоспалительные медиаторы, а скорее индуцирует экспрессию молекул, связанных с иммунным ответом 2-го типа [33]. Таким образом, IL-13 может контролировать пути развития нейровоспаления, что может приводить к повышению выживаемости нейронов [46]. Однако есть данные наблюдения, где вызванная введением липополисахарида (ЛПС) индукция экспрессии IL-13 в микроглии способствовала нейродегенерации в полосатом теле мозга у крыс. Исследователи с целью изучения потенциальной роли IL-13 вводили ЛПС в полосатое тело мозга крысы. Через семь дней после

инъекции ЛПС наблюдалась значительная потеря нейронов и активация микроглии в полосатом теле, при этом в микроглии повышалась иммунореактивность IL-13 уже через 3 дня и сохранялась до 7 дней после инъекции ЛПС. Оценка иммунореактивности GFAP (маркер астроглии) и степени проницаемости гематоэнцефалического барьера (ГЭБ) показали снижение числа астроцитов и нарушение проницаемости ГЭБ. Введение антител, нейтрализующих IL-13, защищало от нейротоксичности *in vivo*, вызванной ЛПС, уменьшалась потеря астроцитов и повреждение ГЭБ [25].

Таким образом, наблюдаемое нами повышение экспрессии ряда генов противовоспалительных цитокинов могут свидетельствовать о повышенной активности противовоспалительных/нейропротекторных путей в мозге у крыс с ПВА. Весьма вероятно, что вызванная ПВА повышенная активность путей нейровоспаления, вероятно, инициирует в дальнейшем активацию генов противовоспалительных / нейропротекторных путей, что, по всей видимости, мы наблюдаем на 8-е сутки постнатального развития, однако существует интерес в понимании того, какой вклад может вносить повышение экспрессии про- и противовоспалительных цитокинов в ход нейрогенеза. Вполне вероятно, что как повышенный уровень экспрессии провоспалительных, так и повышенный уровень экспрессии противовоспалительных/нейропротекторных механизмов могут оказывать неблагоприятные воздействия на нормальный ход нейрогенеза у потомства, что в дальнейшем может послужить к развитию когнитивных и прочих нарушений, ассоциированных с формированием расстройств ФАСН.

Выполненные нами инъекции Rif привели к достоверному снижению уровня мРНК ключевых провоспалительных цитокинов TNF α , IL-1 β и IL-16, хотя и разнонаправленно среди исследуемых структур мозга. Вероятно, там, где инъекции Rif не оказали значимого влияния, может быть связь с тем, вводимых нами дозировок Rif было недостаточно для устранения всех вызванных изменений в экспрессии генов цитокинов, или преобладание в активном состоянии иных внутриклеточных патофизиологических механизмов разнонаправленно среди исследуемых структур.

Заключение

Выполненное нами исследование позволило получить новые данные о состоянии экспрессии генов системы TLR-сигнализации в головном мозге крыс на 8-е сутки постнатального развития с пренатальным воздействием алкоголя. Кроме того, в задачи исследования входило оценить вли-

яния Rif на систему TLR в развивающемся мозге с ПВА. Результаты эксперимента показали способность Rif корректировать наблюдаемые долгосрочные патологические изменения в системе TLR. Представляется интересным изучение в будущем дозозависимого эффекта, а также исследование выявленных изменений белковыми методами. Кроме того, представляется важным в будущем изучение системы TLR-сигналикации в

других структурах мозга с ПВА, а также на разных сроках постнатального развития в онтогенезе.

Соблюдение этических стандартов

Используемые методы в работе были одобрены Этическим комитетом по уходу и использованию животных Института экспериментальной медицины (протокол № 21/5 заседания локального этического комитета при ФГБНУ «ИЭМ» от 26.02.2015).

Список литературы / References

1. Айрапетянц М.Г. Последствия алкогольной интоксикации для потомства. М.: Наука, 1989. 124 с. [Ayrapetyants M.G. Consequences of alcohol intoxication for offspring]. Moscow: Nauka, 1989, 124 p.
2. Айрапетов М.И., Ереско С.О., Бычков Е.Р., Лебедев А.А., Шабанов П.Д. Экспрессия гена Hmgb1 изменяется в стриатуме и амигдале мозга крыс при длительной алкоголизации и отмене этанола // Биомедицинская химия, 2021. Т. 67, № 1. С. 95-99. [Airapetov M.I., Eresko S.O., Bychkov E.R., Lebedev A.A., Shabanov P.D. Expression of the gene Hmgb1 changes in the striatum and amygdala of the rat brain during prolonged alcoholization and ethanol withdrawal. *Biomeditsinskaya khimiya = Biomedical Chemistry*, 2021, Vol. 67, no. 1, pp. 95-99. (In Russ.)]
3. Айрапетов М.И., Ереско С.О., Лебедев А.А., Бычков Е.Р., Шабанов П.Д. Роль TOLL-подобных рецепторов в нейроиммунологии алкоголизма // Биомедицинская химия, 2020. Т. 66, № 3. С. 208-215. [Airapetov M.I., Eresko S.O., Lebedev A.A., Bychkov E.R., Shabanov P.D. Involvement of TOLL-like receptors in the neuroimmunology of alcoholism. *Biomeditsinskaya khimiya = Biomedical Chemistry*, 2020, Vol. 66, no. 3, pp. 208-215. (In Russ.)]
4. Айрапетов М.И., Ереско С.О., Бычков Е.Р., Лебедев А.А., Шабанов П.Д. Уровень экспрессии Toll-подобных рецепторов изменяется в эмоциогенных структурах мозга крыс в условиях длительной алкоголизации и при отмене этанола // Медицинская иммунология, 2020. Т. 22, № 1. С. 77-86. [Airapetov M.I., Eresko S.O., Bychkov E.R., Lebedev A.A., Shabanov P.D. The expression level of Toll-like receptors changes in the emotiogenic brain structures of rats under conditions of prolonged alcoholization and ethanol withdrawal. *Meditinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2020, Vol. 22, no. 1, pp. 77-86. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-EOT-1836.
5. Айрапетов М.И., Ереско С.О., Кочкин Д.В., Бычков Е.Р., Лебедев А.А., Шабанов П.Д. Гинзенозиды влияют на систему Toll-подобных рецепторов в структурах головного мозга крыс в условиях отмены длительной алкоголизации // Биомедицинская химия, 2022. Т. 68, № 6. С. 459-469. [Airapetov M.I., Eresko S.O., Kochkin D.V., Bychkov E.R., Lebedev A.A., Shabanov P.D. Ginsenosides affect the system of Toll-like receptors in the brain of rats under conditions of long-term alcohol withdrawal. *Biomeditsinskaya khimiya = Biomedical Chemistry*, 2022, Vol. 68, no. 6, pp. 459-469. (In Russ.)]
6. Airapetov M., Eresko S., Ignatova P., Lebedev A., Bychkov E., Shabanov P. Effect of rifampicin on TLR4-signaling pathways in the nucleus accumbens of the rat brain during abstinence of long-term alcohol treatment. *Alcohol. Alcohol.*, 2024, Vol. 59, no. 3, agae016. doi: 10.1093/alcalc/ague016.
7. Alfonso-Loeches S., Pascual-Lucas M., Blanco A.M., Sanchez-Vera I., Guerri C. Pivotal role of TLR4 receptors in alcohol-induced neuroinflammation and brain damage. *J. Neurosci.*, 2010, Vol. 30, no. 24, pp. 8285-8295.
8. Ali A.E., Mahdy H.M., Elsherbiny D.M., Azab S.S. Rifampicin ameliorates lithium-pilocarpine-induced seizures, consequent hippocampal damage and memory deficit in rats: Impact on oxidative, inflammatory and apoptotic machineries. *Biochem. Pharmacol.*, 2018, Vol. 156, pp. 431-443.
9. Bell R.L., Hauser S.R., McClintick J., Rahman S., Edenberg H.J., Szumlinski K.K., McBride W.J. Ethanol-Associated Changes in Glutamate Reward Neurocircuitry: A Minireview of Clinical and Preclinical Genetic Findings. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.*, 2016, Vol. 137, pp. 41-85.
10. Bi W., Cheng X., Zeng Z., Zhou R., Luo R., Zhang J., Zhu L. Rifampicin ameliorates lipopolysaccharide-induced cognitive and motor impairments via inhibition of the TLR4/MyD88/NF-κB signaling pathway in mice. *Neurol. Res.*, 2021, Vol. 43, no. 5, pp. 358-371.
11. Bi W., Zhu L., Jing X., Zeng Z., Liang Y., Xu A., Liu J., Xiao S., Yang L., Shi Q., Guo L., Tao E. Rifampicin improves neuronal apoptosis in LPS-stimulated co-cultured BV2 cells through inhibition of the TLR-4 pathway. *Mol. Med. Rep.*, 2014, Vol. 10, no. 4, pp. 1793-1799.

12. Blednov Y.A., Ponomarev I., Geil C., Bergeson S., Koob G.F., Harris R.A. Neuroimmune regulation of alcohol consumption: behavioral validation of genes obtained from genomic studies. *Addict. Biol.*, 2012, Vol. 17, no. 1, pp. 108-120.
13. Bodnar T.S., Rainecki C., Wertelecki W., Yevtushok L., Plotka L., Zymak-Zakutnya N., Honerkamp-Smith G., Wells A., Rolland M., Woodward T.S., Coles C.D., Kable J.A., Chambers C.D., Weinberg J. Altered maternal immune networks are associated with adverse child neurodevelopment: Impact of alcohol consumption during pregnancy. *Brain Behav. Immun.*, 2018, Vol. 73, pp. 205-215.
14. Caraci F., Gulisano W., Guida C.A., Impellizzeri A.A.R., Drago F., Puzzo D., Palmeri A.A. Key role for TGF- β 1 in hippocampal synaptic plasticity and memory. *Sci. Rep.*, 2015, Vol. 5, 11252. doi: 10.1038/srep11252.
15. Chen T., Chen C., Zhang Z., Zou Y., Peng M., Wang Y. Toll-like receptor 4 knockout ameliorates neuroinflammation due to lung-brain interaction in mechanically ventilated mice. *Brain Behav. Immun.*, 2016, Vol. 56, pp. 42-55.
16. Chin P.Y., Dorian C., Sharkey D.J., Hutchinson M.R., Rice K.C., Moldenhauer L.M., Robertson S.A. Toll-like receptor-4 antagonist (+)-naloxone confers sexually dimorphic protection from inflammation-induced fetal programming in mice. *Endocrinology*, 2019, Vol. 160, no. 11, pp. 2646-2662.
17. Clabough E., Ingersoll J., Reekes T., Gleichsner A., Ryan A. Acute ethanol exposure during synaptogenesis rapidly alters medium spiny neuron morphology and synaptic protein expression in the dorsal striatum. *Int. J. Mol. Sci.*, 2021, Vol. 23, no. 1, pp. 290.
18. Coleman L.G. Jr, Zou J., Crews F.T. Microglial-derived miRNA let-7 and HMGB1 contribute to ethanol-induced neurotoxicity via TLR7. *J. Neuroinflammation*, 2017, Vol. 14, no. 1, 22. doi: 10.1186/s12974-017-0799-4.
19. Couch A.C.M., Berger T., Hanger B., Matuleviciute R., Srivastava D.P., Thuret S., Vernon A.C. Maternal immune activation primes deficiencies in adult hippocampal neurogenesis. *Brain Behav. Immun.*, 2021, Vol. 97, pp. 410-422.
20. Darbinian N., Darbinyan A., Merabova N., Bajwa A., Tatevosian G., Martirosyan D., Zhao H., Selzer M.E., Goetzl L. Ethanol-mediated alterations in oligodendrocyte differentiation in the developing brain. *Neurobiol. Dis.*, 2021, Vol. 148, 105181. doi: 10.1016/j.nbd.2020.105181.
21. Donzis E.J., Tronson N.C. Modulation of learning and memory by cytokines: Signaling mechanisms and long-term consequences. *Neurobiol. Learn. Mem.*, 2014, Vol. 115, pp. 68-77.
22. Ferguson C., McKay M., Harris R.A., Homanics G.E. Toll-like receptor 4 (Tlr4) knockout rats produced by transcriptional activator-like effector nuclease (TALEN)-mediated gene inactivation. *Alcohol*, 2013, Vol. 47, no. 8, pp. 595-599.
23. Gano A., Lebonville C.L., Becker H.C. TLR3 activation with poly I:C exacerbates escalated alcohol consumption in dependent male C57BL/6J mice. *Am. J. Drug Alcohol Abuse*, 2023, Vol. 49, pp. 290-301.
24. Holmes V.A., Wallace J.M., Gilmore W.S., McFaul P., Alexander H.D. Plasma levels of the immunomodulatory cytokine interleukin-10 during normal human pregnancy: a longitudinal study. *Cytokine*, 2003, Vol. 21, pp. 265-269.
25. 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.
26. Kaul D., Habel P., Derkow K., Krüger C., Franzoni E., Wulczyn F.G., Bereswill S., Nitsch R., Schott E., Veh R., Naumann T., Lehnardt S. Expression of Toll-like receptors in the developing brain. *PLoS One*, 2012, Vol. 7, no. 5, e37767. doi: 10.1371/journal.pone.0037767.
27. Lawrimore C.J., Coleman L.G., Crews F.T. Ethanol induces interferon expression in neurons via TRAIL: role of astrocyte-to-neuron signaling. *Psychopharmacology (Berl.)*, 2019, Vol. 236, no. 10, pp. 2881-2897.
28. Lawrimore C.J., Coleman L.G., Zou J., Crews F.T. Ethanol induction of innate immune signals across BV2 microglia and SH-SY5Y neuroblastoma involves induction of IL-4 and IL-13. *Brain Sci.*, 2019, Vol. 9, no. 9, 228. doi: 10.3390/brainsci9090228.
29. Li Q., Liu D., Pan F., Ho C.S.H., Ho R.C.M. Ethanol exposure induces microglia activation and neuroinflammation through TLR4 activation and SENP6 modulation in the adolescent rat hippocampus. *Neural Plast.*, 2019, Vol. 2019, 1648736. doi: 10.1155/2019/1648736.
30. Livak K.J., Schmittgen T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods.*, 2001, Vol. 25, no. 4, pp. 402-408.
31. Lobo-Silva D., Carriche G.M., Gil Castro A., Roque S., Saraiva M. Balancing the immune response in the brain: IL-10 and its regulation. *J. Neuroinflammation*, 2016, Vol. 13, 2081. doi: 10.1186/s12974-016-0763-8.
32. MacDowell K.S., Munarriz-Cuezva E., Caso J.R., Madrigal J.L., Zabala A., Meana J.J., García-Bueno B., Leza J.C. Paliperidone reverts Toll-like receptor 3 signaling pathway activation and cognitive deficits in a maternal immune activation mouse model of schizophrenia. *Neuropharmacology*, 2017, Vol. 116, pp. 196-207.
33. Mantovani A., Sica A., Sozzani S., Allavena P., Vecchi A., Locati M. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol.*, 2004, Vol. 25, pp. 677-686.

34. Maroso M., Balosso S., Ravizza T., Liu J., Bianchi M.E., Vezzani A. Interleukin-1 type 1 receptor/Toll-like receptor signalling in epilepsy: the importance of IL-1 β and high-mobility group box 1. *J. Intern. Med.*, 2011, Vol. 270, no. 4, pp. 319-326.
35. Mattson S.N., Bernes G.A., Doyle L.R. Fetal alcohol spectrum disorders: a review of the neurobehavioral deficits associated with prenatal alcohol exposure. *Alcohol Clin. Exp. Res.*, 2019, Vol. 43, no. 6, pp. 1046-1062.
36. Meyer U., Murray P.J., Urwyler A., Yee B.K., Schedlowski M., Feldon J. Adult behavioral and pharmacological dysfunctions following disruption of the fetal brain balance between pro-inflammatory and IL-10-mediated anti-inflammatory signaling. *Mol. Psychiatry*, 2008, Vol. 13, pp. 208-221.
37. Mori S., Sugama S., Nguyen W., Michel T., Sanna M.G., Sanchez-Alavez M., Cintron-Colon R., Moroncini G., Kakinuma Y., Maher P., Conti B. Lack of interleukin-13 receptor α 1 delays the loss of dopaminergic neurons during chronic stress. *J. Neuroinflammation*, 2017, Vol. 14, 88. doi: 10.1186/s12974-017-0862-1
38. Mousa A., Seiger A., Kjaeldgaard A., Bakhiet M. Human first trimester forebrain cells express genes for inflammatory and anti-inflammatory cytokines. *Cytokine*, 1999, Vol. 11, pp. 55-60.
39. Nolvi S., Merz E.C., Kataja E.L., Parsons C.E. Prenatal Stress and the Developing Brain: Postnatal Environments Promoting Resilience. *Biol. Psychiatry*, 2023, Vol. 93, no. 10, pp. 942-952.
40. Ochoa-Repáraz J., Rynda A., Ascón M.A., Yang X., Kochetkova I., Riccardi C., Callis G., Trunkle T., Pascual D.W. IL-13 production by regulatory T cells protects against experimental autoimmune encephalomyelitis independently of autoantigen. *J. Immunol.*, 2008, Vol. 181, pp. 954-968.
41. O'Loughlin E., Pakan J.M.P., Yilmazer-Hanke D., McDermott K.W. Acute in utero exposure to lipopolysaccharide induces inflammation in the pre- and postnatal brain and alters the glial cytoarchitecture in the developing amygdala. *J. Neuroinflammation*, 2017, Vol. 14, no. 1, 212. doi: 10.1186/s12974-017-0981-8.
42. Qin L., Zou J., Barnett A., Vetreno R.P., Crews F.T., Coleman L.G.Jr. TRAIL mediates neuronal death in AUD: a link between neuroinflammation and neurodegeneration. *Int. J. Mol. Sci.*, 2021, Vol. 22, no. 5, 2547. doi: 10.3390/ijms22052547.
43. Riley E.P., Infante M.A., Warren K.R. Fetal alcohol spectrum disorders: an overview. *Neuropsychol. Rev.*, 2011, Vol. 21, pp. 73-78.
44. Rizzo M.D., Crawford R.B., Bach A., Sermet S., Amalfitano A., Kaminski N.E. Imiquimod and interferon- α augment monocyte-mediated astrocyte secretion of MCP-1, IL-6 and IP-10 in a human co-culture system. *J. Neuroimmunol.*, 2019, Vol. 333, 576969. doi: 10.1016/j.jneuroim.2019.576969.
45. Shenoda B.B. An overview of the mechanisms of abnormal GABAergic interneuronal cortical migration associated with prenatal ethanol exposure. *Neurochem. Res.*, 2017, Vol. 42, no. 5, pp. 1279-1287.
46. Shin W.H., Lee D.Y., Park K.W., Kim S.U., Yang M.S., Joe E.H., Jin B.K. Microglia expressing interleukin-13 undergo cell death and contribute to neuronal survival *in vivo*. *Glia*, 2004, Vol. 46, no. 2, pp. 142-152.
47. Shukla P.K., Meena A.S., Rao R., Rao R. Deletion of TLR-4 attenuates fetal alcohol exposure-induced gene expression and social interaction deficits. *Alcohol*, 2018, Vol. 73, pp. 73-78.
48. Siegel A., Zalcman S.S. The neuroimmunological basis of behavior and mental disorders. New York: Springer, 2008. 454 p.
49. Sowell K.D., Uriu-Adams J.Y., Van de Water J., Chambers C.D., Coles C.D., Kable J.A., Yevtushok L., Zymak-Zakutnya N., Wiertelicki W., Keen C.L. Collaborative Initiative on Fetal Alcohol Spectrum Disorders (CIFASD). Implications of altered maternal cytokine concentrations on infant outcomes in children with prenatal alcohol exposure. *Alcohol*, 2018, Vol. 68, pp. 49-58.
50. Usui N., Kobayashi H., Shimada S. Neuroinflammation and oxidative stress in the pathogenesis of autism spectrum disorder. *Int. J. Mol. Sci.*, 2023, Vol. 24, no. 6, 5487.
51. Vetreno R.P., Crews F.T. Adolescent binge drinking increases expression of the danger signal receptor agonist HMGB1 and toll-like receptors in the adult prefrontal cortex. *Neuroscience*, 2012, Vol. 226, pp. 475-488.
52. Vivien D., Ali C. Transforming growth factor- β signalling in brain disorders. *Cytokine Growth Factor Rev.*, 2006, Vol. 17, pp. 121-128.
53. Vizueté A.F.K., Mussulini B.H., Zenki K.C., Baggio S., Pasqualotto A., Rosemberg D.B., Bogo M.R., Oliveira D.L., Rico E.P. Prolonged ethanol exposure alters glutamate uptake leading to astrogliosis and neuroinflammation in adult zebrafish brain. *Neurotoxicology*, 2021, Vol. 88, pp. 57-64.
54. Wang P., Liu B.Y., Wu M.M., Wei X.Y., Sheng S., You S.W., Shang L.X., Kuang F. Moderate prenatal alcohol exposure suppresses the TLR4-mediated innate immune response in the hippocampus of young rats. *Neurosci. Lett.*, 2019, Vol. 699, pp. 77-83.
55. Wang X., Grace P.M., Pham M.N., Cheng K., Strand K.A., Smith C., Li J., Watkins L.R., Yin H. Rifampin inhibits Toll-like receptor 4 signaling by targeting myeloid differentiation protein 2 and attenuates neuropathic pain. *FASEB J.*, 2013, Vol. 27, no. 7, pp. 2713-2722.

56. Woods R.M., Lorusso J.M., Potter H.G., Neill J.C., Glazier J.D., Hager R. Maternal immune activation in rodent models: A systematic review of neurodevelopmental changes in gene expression and epigenetic modulation in the offspring brain. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, 2021, Vol. 129, pp. 389-421.

57. Zahednasab H., Firouzi M., Kaboudanian-Ardestani S., Mojallal-Tabatabaei Z., Karampour S., Keyvani H. The protective effect of rifampicin on behavioral deficits, biochemical, and neuropathological changes in a cuprizone model of demyelination. *Cytokine*, 2019, Vol. 113, pp. 417-426.

58. Zhou X., Spittau B., Kriegelstein K. TGF β signalling plays an important role in IL4-induced alternative activation of microglia. *J. Neuroinflammation*, 2012, Vol. 9, 210.

Авторы:

Айрапетов М.И. — к.м.н., доцент, ведущий научный сотрудник лаборатории биохимической фармакологии ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины»; преподаватель кафедры патологической физиологии ФГБВОУ ВО «Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова», Санкт-Петербург, Россия

Ереско С.О. — научный сотрудник лаборатории химии и фармакологии лекарственных средств ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

Михайлова А.А. — студент 4-го курса ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

Суханова Д.Д. — студент 4-го курса ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

Игнатова П.Д. — студент 5-го курса ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

Лебедев А.А. — д.б.н., профессор, заведующий лабораторией общей фармакологии ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

Бычков Е.Р. — д.м.н., заведующий лабораторией химии и фармакологии лекарственных средств ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

Шабанов П.Д. — д.м.н., профессор кафедры фармакологии ФГБВОУ ВО «Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова»; заведующий отделом нейрофармакологии имени С.В. Аничкова ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

Authors:

Airapetov M.I., PhD (Medicine), Associate Professor, Leading Research Associate, Laboratory of Biochemical Pharmacology, Institute of Experimental Medicine; Lecturer, Department of Pathological Physiology, S. Kirov Military Medical Academy, St. Petersburg, Russian Federation

Eresko S.O., Research Associate, Laboratory of Chemistry and Pharmacology of Drugs, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

Mikhailova A.A., 4th year Student, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

Sukhanova D.D., 4th year Student, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

Ignatova P.D., 5th year Student, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

Lebedev A.A., PhD, MD (Biology), Professor, Head, Laboratory of General Pharmacology, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

Bychkov E.R., PhD, MD (Medicine), Head, Laboratory of Chemistry and Pharmacology of Drugs, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

Shabanov P.D., PhD, MD (Medicine), Professor, Department of Pharmacology, S. Kirov Military Medical Academy; Head, S. Anichkov Department of Neuropharmacology, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

Поступила 20.11.2023
Отправлена на доработку 23.11.2023
Принята к печати 09.03.2024

Received 20.11.2023
Revision received 23.11.2023
Accepted 09.03.2024

ГЕН-ГЕННЫЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ЦИТОКИНОВ И С-РЕАКТИВНОГО БЕЛКА ПРИ ПСОРИАЗЕ У ЖИТЕЛЕЙ КЕМЕРОВСКОЙ ОБЛАСТИ

Романова Е.Л.¹, Шабалдин А.В.¹, Белов Е.Г.², Стрига Л.В.²,
Яковлева А.А.¹, Шевченко Е.А.², Шабалдина Е.В.³

¹ ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный университет», г. Кемерово, Россия

² ГБУЗ «Кузбасский клинический кожно-венерологический диспансер», г. Кемерово, Россия

³ ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный медицинский университет», г. Кемерово, Россия

Резюме. Псориаз является наиболее распространенным воспалительным заболеванием кожи, которым страдает в среднем 2–4% населения Земли. Согласно современным представлениям, псориаз является мультифакториальным заболеванием, возникающим у генетически предрасположенных лиц под воздействием различных факторов окружающей среды, которые запускают нарушение иммунного ответа с серией сложных воспалительных каскадов. Заболевание инициируется и поддерживается взаимным взаимодействием клеток врожденного и адаптивного иммунитета, прежде всего дендритных клеток, Т-лимфоцитов и кератиноцитов, ведущая роль которых на разных стадиях заболевания чередуется и заключается в основном в IL-23/Th17-пути. На сегодняшний день описано множество полиморфизмов генов (SNP), связанных с развитием псориаза. Для понимания патофизиологии псориаза, как сложного аутовоспалительного заболевания, представляется интересным изучение межгенных взаимодействий полиморфных вариантов генов цитокинов и С-реактивного белка в отношении риска развития псориаза. Цель работы — изучить межгенные взаимодействия полиморфных вариантов генов *IL1β* (rs16944), *IL6* (rs1554606), *IL8* (rs2227306), *IL10* (rs1800896), *TNFα* (rs361525), *CRP* (rs1205) связанных с риском развития псориаза у жителей Кемеровской области. Обследовано 175 пациентов с обыкновенным папулезно-бляшечным псориазом, с прогрессирующим течением в средней степени тяжести. Контрольная группа (n = 155) сформирована из условно-здоровых доноров того же возрастного интервала. Генотипирование осуществляли с помощью метода ПЦР с использованием TaqMan зондов (Thermo Fisher Scientific, США) на детектирующем амплификаторе ViiATM 7 Real-Time PCR System (Life Technologies, США) следующих полиморфных вариантов генов: *IL1β* (rs16944), *IL6* (rs1554606), *IL8* (rs2227306), *IL10* (rs1800896), *TNFα* (rs361525), *CRP* (rs1205). Анализ межгенных взаимодействий осуществляли при помощи метода сокращения многофакторной размерности (Multifactor Dimensionality Reduction, MDR). Установлено, что детерминирование

Адрес для переписки:

Романова Елизавета Леонидовна
ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный
университет»
650000, Россия, г. Кемерово, ул. Красная, 6.
Тел.: 8 (3842) 58-01-66.
E-mail: Rom11elizaveta@yandex.ru

Address for correspondence:

Elizaveta L. Romanova
Kemerovo State University
6 Krasnaya St
Kemerovo
650000 Russian Federation
Phone: +7 (3842) 58-01-66.
E-mail: Rom11elizaveta@yandex.ru

Образец цитирования:

Е.Л. Романова, А.В. Шабалдин, Е.Г. Белов,
Л.В. Стрига, А.А. Яковлева, Е.А. Шевченко,
Е.В. Шабалдина «Ген-генные взаимодействия
цитокинов и С-реактивного белка при псориазе у
жителей Кемеровской области» // Медицинская
иммунология, 2025. Т. 27, № 1. С. 87–96.
doi: 10.15789/1563-0625-GGI-2937

© Романова Е.Л. и соавт., 2025

Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

E.L. Romanova, A.V. Shabaldin, E.G. Belov, L.V. Striga,
A.A. Yakovleva, E.A. Shevchenko, E.V. Shabaldina
“Gene-gene interactions of cytokines and C-reactive protein
in psoriasis in residents of Kemerovo Region”, *Medical
Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2025,
Vol. 27, no. 1, pp. 87–96.
doi: 10.15789/1563-0625-GGI-2937

© Romanova E.L. et al., 2025

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

DOI: 10.15789/1563-0625-GGI-2937

обыкновенного папулезно-бляшечного псориаза связано как с отдельными полиморфными вариантами генов цитокинов и С-реактивного белка, так и ген-генными взаимодействиями. Для отдельных полиморфных вариантов генов сила (% энтропии) ассоциации с обыкновенным папулезно-бляшечным псориазом была следующая: *TNFα_rs361525* (16,99% энтропии), *IL1β_rs16944* (6,40% энтропии), *CRP_rs1205* (2,55% энтропии), *IL6_rs1554606* (1,11% энтропии), *IL10_rs1800896* (0,57% энтропии), *IL8_rs2227306* (0,30% энтропии). Выявлено, что выраженным синергизмом обладали *IL6* (rs1554606) и *IL8* (rs2227306); умеренным синергизмом *CRP* (rs1205) и *IL10* (rs1800896) и выраженным антагонизмом *IL1β* (rs16944) и *TNFα* (rs361525).

Ключевые слова: псориаз, *IL1β* (rs16944), *IL6* (rs1554606), *IL8* (rs2227306), *IL10* (rs1800896), *TNFα* (rs361525), *CRP* (rs1205), метод сокращения многофакторной размерности

GENE-GENE INTERACTIONS OF CYTOKINES AND C-REACTIVE PROTEIN IN PSORIASIS IN RESIDENTS OF KEMEROVO REGION

Romanova E.L.^a, Shabaldin A.V.^a, Belov E.G.^b, Striga L.V.^b,
Yakovleva A.A.^a, Shevchenko E.A.^b, Shabaldina E.V.^c

^a Kemerovo State University, Kemerovo, Russian Federation

^b Kuzbass Clinical Skin and Venereological Dispensary, Kemerovo, Russian Federation

^c Kemerovo State Medical University, Kemerovo, Russian Federation

Abstract. Psoriasis is the most common inflammatory skin disease, affecting on average 2-4% of the world's population. Currently, psoriasis is considered a multifactorial disease occurring in genetically predisposed individuals under the influence of various environmental factors that trigger a disrupted immune response *via* complex inflammatory cascades. The disease is initiated and maintained by the mutual interaction of cells of innate and adaptive immunity, primarily, dendritic cells, T lymphocytes and keratinocytes. Their leading role may alternate at different stages of the disease and proceeds, mainly, at the IL-23/Th17 pathway. To date, many gene polymorphisms (SNPs) associated with the development of psoriasis have been described. To understand the pathophysiology of psoriasis as a complex autoinflammatory disease, it seems interesting to study the intergenic interactions between polymorphic gene variants of cytokines and C-reactive protein related to the risk of psoriasis development. The aim of our study was to investigate intergenic interactions of polymorphic variants of *IL1β* (rs16944), *IL6* (rs1554606), *IL8* (rs2227306), *IL10* (rs1800896), *TNFα* (rs361525), *CRP* (rs1205) genes associated with altered risk of psoriasis development among the Kemerovo Region residents. We examined 175 patients with ordinary papular plaque psoriasis of moderate severity, with progressive course of the disorder. The control group (n = 155) was recruited from conditionally healthy, age-matched donors. Genotyping was performed by PCR using TaqMan probes (Thermo Fisher Scientific, USA), by means of the detection amplifier ViiA™ 7 Real-Time PCR System (Life Technologies, USA), for the following polymorphic variants of genes: *IL1β* (rs16944), *IL6* (rs1554606), *IL8* (rs2227306), *IL10* (rs1800896), *TNFα* (rs361525), *CRP* (rs1205). Intergenic interactions were analyzed using Multifactor Dimensionality Reduction (MDR). The common papulosis-plaque psoriasis was found to be associated with individual polymorphic variants of cytokine and *CRP* genes as well as with gene-gene interactions. Concerning individual polymorphic gene variants, the association strength (% entropy) with common papulosis-plaque psoriasis was as follows: *TNFα_rs361525* (16.99% entropy), *IL1β_rs16944* (6.40% entropy), *CRP_rs1205* (2.55% entropy), *IL6_rs1554606* (1.11% entropy), *IL10_rs1800896* (0.57% entropy), *IL8_rs2227306* (0.30% entropy). We have found that *IL6* (rs1554606) and *IL8* (rs2227306) showed marked synergism, as well as moderate synergism of *CRP* (rs1205) and *IL10* (rs1800896), and pronounced antagonism of *IL1β* (rs16944) and *TNFα* (rs361525).

Keywords: psoriasis, *IL1β* (rs16944), *IL6* (rs1554606), *IL8* (rs2227306), *IL10* (rs1800896), *TNFα* (rs361525), *CRP* (rs1205), Multifactor Dimensionality Reduction

Введение

Псориаз — распространенное воспалительное заболевание кожи, характеризующееся аномальной пролиферацией эпидермальных кератиноцитов и массивной инфильтрацией воспалительными клетками [36]. Псориаз является наиболее распространенным воспалительным заболеванием кожи, которым страдает в среднем 2–4% населения Земли. Согласно современным представлениям, псориаз является мультифакториальным заболеванием, возникающим у генетически предрасположенных лиц под воздействием различных факторов окружающей среды, которые запускают нарушение иммунного ответа с серией сложных воспалительных каскадов. Заболевание инициируется и поддерживается взаимным взаимодействием клеток врожденного и адаптивного иммунитета, прежде всего дендритных клеток, Т-лимфоцитов и кератиноцитов, ведущая роль которых на разных стадиях заболевания чередуется и заключается в основном в IL-23/Th17-пути. Воспалительные явления приводят к последующим изменениям эпидермиса и дермы и эволюции характерного псориазического фенотипа соответственно [34].

На сегодняшний день описано множество полиморфизмов генов (SNP), связанных с развитием псориаза, в частности: SNP rs28947206, rs28947207 и rs28947211 в гене *L36G* [33]; SNP rs30187 и rs27524 в гене *ERAPI* [37]; SNP rs763780 в гене *IL-17F* и rs4819554 в гене *IL-17RA* [26]; SNP rs361525 и rs1799724 в гене *TNFα* [28]; SNP rs2066965 и rs34367357 в гене *CARD14* [32] и др.

Выявление полиморфизмов и факторов окружающей среды, ассоциированных с распространенными сложными заболеваниями, является сложной задачей. Отчасти это связано с тем, что эффект одной генетической вариации может зависеть от других генетических вариаций (ген-генное взаимодействие или эпистаз) и факторов окружающей среды (генно-средовое взаимодействие). Выявление и характеристика взаимодействий между многочисленными факторами представляет собой как статистическую, так и вычислительную задачу. Для решения этой проблемы используют метод сокращения многофакторной размерности (MDR), позволяющий сворачивать высокоразмерные генетические данные в одно измерение, что дает возможность выявлять взаимодействия на относительно небольших выборках [18, 25]. С помощью многократных перекрестных пересчетов исходных первичных данных выбирается оптимальная модель межгенного взаимодействия, с наибольшей точностью и, соответственно, с наименьшей ошибкой предсказывающая наличие или отсутствие предрасположенности к изучаемой патологии [8].

Для понимания патофизиологии псориаза, как сложного заболевания представляется интересным изучение межгенных взаимодействий полиморфных вариантов генов цитокинов и С-реактивного белка в отношении риска развития псориаза.

Цель работы — изучить межгенные взаимодействия полиморфных вариантов генов *IL1β* (rs16944), *IL6* (rs1554606), *IL8* (rs2227306), *IL10* (rs1800896), *TNFα* (rs361525), *CRP* (rs1205) связанных с риском развития псориаза у жителей Кемеровской области.

Материалы и методы

Для выполнения поставленной цели было обследовано 175 пациентов с обыкновенным папулезно-бляшечным псориазом, с прогрессирующим течением, в средней степени тяжести, с обязательным поражением волосистой части головы, находящихся на лечении в отделении Кузбасского клинического кожно-венерологического диспансера. Средний возраст пациентов составил $46,15 \pm 3,85$ года, из них было 105 мужчин и 70 женщин. Весенне-осенняя форма наблюдалась у 103 пациентов. Впервые выявленный псориаз был у 43 пациентов. Постоянная персистирующая форма диагностировалась у 29 пациентов. Поражение суставов выявлено у 37 пациентов. У всех пациентов было получено информированное согласие на участие в исследовании генетических особенностей псориаза и коморбидных состояний.

Контрольная группа ($n = 155$) была сформирована из условно-здоровых доноров того же возрастного интервала (средний возраст был равен $41,4 \pm 2,9$ года), с соответствующим соотношением мужчин и женщин (98 мужчин и 57 женщин).

Молекулярно-генетическое исследование

В качестве материала использована геномная ДНК, выделенная из лейкоцитов периферической крови. Выделение геномной ДНК производили методом фенол-хлороформной экстракции по стандартному протоколу. У всех участников исследования (опытная и контрольная группы) проводился забор крови из локтевой вены в пробирку, содержащую этилендиаминтетрауксусную кислоту (ЭДТА, Becton Dickinson Vacutainer, США). Далее кровь алиquotировали по 700 мкл в пробирки 1,5 мл типа «Эппендорф» (Axugen, США) с плотно закрывающимися крышками. Все образцы биологического материала маркировали соответствующим образом и хранили при -80°C до даты проведения исследования. Концентрацию выделенной ДНК измеряли на спектрофотометре NanoDrop ND-2000C (Thermo, США). Выбор однонуклеотидных полиморфных сайтов для молекулярно-генетического типирования был обусловлен локализацией в генах по-

ТАБЛИЦА 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ПОЛИМОРФНЫХ ВАРИАНТОВ ИССЛЕДУЕМЫХ ГЕНОВ

TABLE 1. CHARACTERIZATION OF POLYMORPHIC VARIANTS OF THE STUDIED GENES

Ген Gene	Название кодируемого белка Name encoded protein	Полиморфный вариант Polymorphic variant	Хромосомная позиция Chromosomal position	Частота минорного аллеля Frequency of the minor allele (MAF)*
IL1β	Interleukin-1 beta	rs16944	chr2:112837290	G = 0,490615
TNFα	Tumor necrosis factor	rs361525	chr6:31575324	A = 0,060903
IL10	Interleukin-10	rs1800896	chr1:206773552	C = 0,272165
IL8	Interleukin-8	rs2227306	chr4:73741338	T = 0,259385
IL6	Interleukin-6	rs1554606	chr7:22729088	T = 0,249401
CRP	C-reactive protein	rs 1205	chr1:159712443	T = 0,338259

Примечание. * – SNPedia [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://www.snpedia.com/index.php/Rs>; dbSNP [Электронный ресурс] // National Library of Medicine. Режим доступа: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>.

Note. *, SNPedia [Electronic resource]. Available at: <https://www.snpedia.com/index.php/Rs>; dbSNP [Electronic resource] // National Library of Medicine. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>.

лиморфных участков. Для однонуклеотидных замен (SNP) распространенность минорного аллеля полиморфного сайта в популяции, по данным НарМар, была не более 5%. По открытым научным данным для выбранных SNP оценивались предполагаемые или доказанные последствия на молекулярном уровне в детерминировании воспалительного ответа. Всего отобрано шесть полиморфных вариантов генов, представленных в таблице 1.

Генотипирование осуществляли с помощью метода ПЦР с использованием TaqMan зондов (Thermo Fisher Scientific, США) на детектирующем амплификаторе ViiATM 7 Real-Time PCR System (Life Technologies, США). Достоверность полученных данных оценивалась посредством повторного генотипирования 10% образцов из общей выборки. Воспроизводимость результатов составила 100.

Статистическую обработку полученных результатов проводили при помощи следующих программ: SNPstats (<http://bioinfo.iconcologia.net/SNPstats>) для проверки соответствия наблюдаемых частот генотипов равновесному распределению Харди–Вайнберга и для поиска ассоциаций однонуклеотидных вариантов с псориазом.

Анализ межгенных взаимодействий осуществляли при помощи метода сокращения многофакторной размерности (Multifactor Dimensionality Reduction, MDR) с использованием программного обеспечения MDR (<http://sourceforge.net/projects/mdr>). MDR – это непараметрический статистический метод обнаружения и характеристики нелинейных взаимодействий. Основная идея метода заключается в уменьшении размерности мультилокусной информации путем объединения мультилокусных генотипов в группы с высоким и низким риском, что позво-

ляет свести их к одномерной переменной. Для оценки способности классифицировать и прогнозировать состояние заболевания используется перекрестная валидация (CV) и пермутационное тестирование. Для CV данные разбиваются на k примерно одинаковых по размеру частей. Модели MDR разрабатываются для каждого из возможных $k - 1/k$ индивидуумов (обучающие наборы) и используются на каждом из оставшихся $1/k$ индивидуумов (тестирующие наборы) для прогнозирования состояния заболевания [16]. В результате MDR анализа выявляются наилучшие модели для $2n, 3n, 4n$ и т. д. сочетаний SNP, имеющие наибольший показатель согласованности (CVC) и наименьшую ошибку предсказания (наибольшую точность предсказания модели). Модель считается валидированной, если ее согласованность выше или равна $9/10$ [4].

MDR анализ был выполнен для всей основной группы в сравнении с контролем. Различия считались статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты

На первом этапе исследования был проведен анализ выборки на ее соответствие распределению Харди–Вайнберга. Данный анализ показал отсутствие значимых отклонений частот наблюдаемых генотипов от ожидаемых, рассчитанных по формуле $a^2 + 2ab + b^2 = 1$. Соответственно, дальнейшее сравнение частот аллелей и генотипов исследуемых полиморфизмов основной и контрольной групп было правомочно.

При помощи программы MDR (Multifactor Dimensionality Reduction) была проведена оценка SNP*SNP взаимодействия полиморфных вариантов генов цитокинов и С-реактивного белка с псориазом в целом без разделения на группы. Ха-

рактир межгенных взаимодействий (синергизм, антагонизм и аддитивные взаимодействия) представлен на рисунках 1 и 2.

Из рисунка 1 видно, что детерминирование псориаза связано с двумя кластерами межгенных взаимодействий. Первый кластер связан с выраженным синергизмом двух полиморфных вариантов: это *IL6* (rs1554606) и *IL8* (rs2227306), т. е. сочетание любых генотипов этих полиморфизмов (гомозиготный дикий, гетерозиготный, гомозиготный мутантный) детерминируют формирование обыкновенного папулезно-бляшечного псориаза. Второй кластер был связан с умеренным синергизмом *CRP* (rs 1205) и *IL10* (rs1800896). В данном случае сочетание мажорных (диких) гомозиготных генотипов в большей степени влияют на манифестацию этой формы псориаза. В то же время эти два сочетания находятся достаточно далеко друг от друга, хотя и связаны между собой аддитивными взаимодействиями, т. е. гетерозиготы этих полиморфных вариантов генов не влияют на формирование псориаза, а гомозиготы как по дикому или мутантному типу оказывают доминирующее влияние на проявление фенотипа (развитие псориаза). В центре этой дендограммы находятся два полиморфных варианта гена это *IL1β* (rs16944) и *TNFα* (rs361525), которые между собой находятся в выраженном антагонизме, т. е. любое сочетание генотипов этих полиморфизмов является протективным в отношении развития псориаза. Умеренно синергичный кластер *CRP* (rs1205) с *IL10* (rs1800896) связан умеренным антагонизмом с выраженно антагонистическим кластером *IL1β* (rs16944) и *TNFα* (rs361525). Именно такие взаимодействия полиморфных вариантов геном детерминируют обыкновенный папулезно-бляшечный псориаз.

На рисунке 2 эти взаимодействия представлены в виде круговых (сетевых) взаимосвязей с оценкой их силы и направленности в % энтропии. В данном контексте % энтропии указывал на силу связи отдельных полиморфных вариантов генов с псориазом, а знак перед показателями обозначал предикторные или протекторные свойства полиморфизма или межгенной связи. Соответственно, из рисунка видно, что выраженными предикторными свойствами обладал полиморфный вариант гена *TNFα* (rs361525), для которого сила связи достигала 16,99% энтропии, а вторым по силе связи с псориазом был полиморфный вариант гена *IL1β* (rs16944) с величиной 6,40% энтропии. Сопоставимой с этим отдельным влиянием была синергичная межгенная связь *IL6* (rs1554606) и *IL8* (rs2227306) равная 5,47% энтропии. Протекторные характеристики антагонистической связи *IL1β* (rs16944) и *TNFα* (rs361525) были очень выраженными и равнялись 8,34% энтропии.

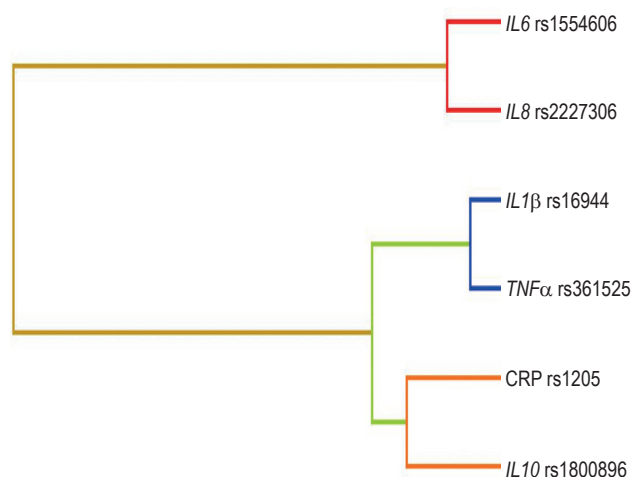


Рисунок 1. Дендограмма взаимодействий полиморфных локусов генов цитокинов и С-реактивного белка (CRP)

Примечание. Направленность взаимодействий между генами-кандидатами при формировании фенотипа обозначаются линиями разного цвета: красного – выраженный синергизм, оранжевого – умеренный синергизм, синего – выраженный антагонизм, зеленого – умеренный антагонизм, коричневого – аддитивное взаимодействие.

Figure 1. Dendrogram of interactions between polymorphic loci of cytokine and CRP genes

Note. The directionality of interactions between candidate genes during phenotype formation is indicated by lines of different colors: red, pronounced synergy; orange, moderate synergy; blue, pronounced antagonism; green, moderate antagonism; brown, additive interaction.

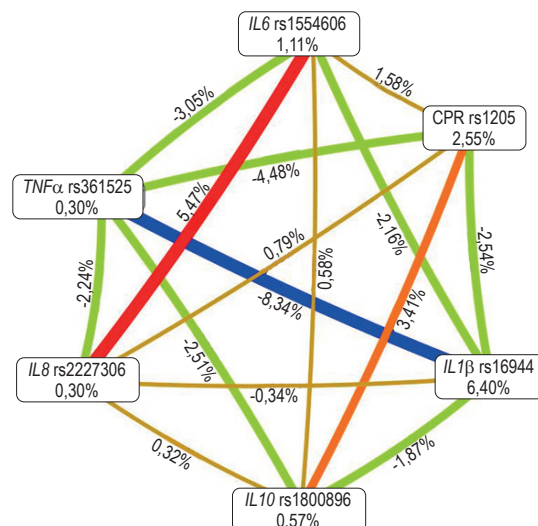


Рисунок 2. Граф взаимодействий полиморфных локусов генов цитокинов и С-реактивного белка (CRP)

Примечание. См. примечание к рисунку 1. Сила и направленность взаимодействий представлены в % энтропии.

Figure 2. Graph of interactions between polymorphic loci of cytokine and CRP genes

Note. As for Figure 1. The strength and directionality of interactions are presented in % entropy.

ТАБЛИЦА 2. ПОЛИМОРФНЫЕ ВАРИАНТЫ ГЕНОВ ЦИТОКИНОВ И С-РЕАКТИВНОГО БЕЛКА, УЧАСТВУЮЩИХ В ДЕТЕРМИНИРОВАНИИ ПСОРИАЗА

TABLE 2. POLYMORPHIC VARIANTS OF CYTOKINE AND CRP GENES INVOLVED IN THE DETERMINATION OF PSORIASIS

Модель Model	Тренировочная сбалансированная точность Training balanced accuracy	Тестируемая сбалансированная точность Tested balanced accuracy	Чувствительность Sensitivity	Специфичность Specificity	Повторяемость результата Repeatability of the result	Точность модели Model accuracy
<i>TNFα_rs361525,</i> <i>IL1β_rs16944,</i> <i>CRP_rs1205,</i> <i>IL6_rs1554606,</i> <i>IL10_rs1800896,</i> <i>IL8_rs2227306</i>	0,88	0,68	0,8	0,97	10/10	0,97

В целом эта сеть межгенных взаимодействий укладывается в модель генной регуляторной сети детерминирования обыкновенного папулезно-бляшечного псориаза, эффективность которой представлена в таблице 2.

Из таблицы 2 видно, что модель обладает высокой тренировочной сбалансированной точностью, чувствительностью, специфичностью, повторяемостью и значимой точностью модели ($p = 0,03$).

Особенности детерминирования обыкновенного папулезно-бляшечного псориаза через взаимодействия изученных полиморфных вариантов генов представлено в обсуждении.

Обсуждение

В научных публикациях уделяется большое внимание вопросу о роли полиморфных вариантов генов, как факторов риска развития заболеваний, в том числе с позиции их взаимодействия.

В проведенном исследовании высокой силой (% энтропии) в детерминировании обыкновенного папулезно-бляшечного псориаза обладал полиморфный вариант гена *TNF α* (rs361525), что является не случайной находкой. Так, в большинстве исследований обсуждается связь полиморфных вариантов генов *TNF α* , с генетической предрасположенностью к псориазу, а также их влияние на различные аспекты течения болезни. М.М. Нагаг и соавт. изучали частоты генотипов и распределение аллелей гена *TNF α* -238 (rs361525) у пациентов и лиц контрольной группы. Ими установлено, что гетерозиготный генотип *TNF α* -238 G/A (rs 361525) достоверно чаще встречался у пациентов по сравнению с контролем [17]. Аксилар Р. и соавт. установили связь гомозиготного минорного генотипа полиморфного варианта гена *TNF α* -238G>A (rs361525) с повышенной ча-

стотой развития псориаза. Также ими выявлено, что у больных псориазом частота встречаемости аллеля А и генотипа АА была выше, чем в контрольной группе, и псориаз был связан с генотипом АА (OR = 4,25; 95% CI = 1,37-13,1; $p = 0,008$) и аллелем А (OR = 1,55; 95% CI = 1,01-2,34; $p = 0,04$). У пациентов с семейным анамнезом псориаза наблюдалось увеличение частоты генотипа АА по сравнению с генотипами GG и GA (46,7%, 36,7% и 16,7%, $p = 0,003$ соответственно). Кроме того, больные псориазом с генотипом АА чаще выявлялись среди лиц моложе 30 лет и мужчин, чем с генотипами GG и GA, однако различия не были статистически значимыми [7]. Shen C. и соавт. в своем метаанализе обнаружили ассоциацию между полиморфизмом 238 G/A и риском развития псориаза в зависимости от этнической принадлежности [29]. Точный механизм этнического неравенства неясен, но изучение вариаций генетической базы, включая риск развития определенных заболеваний и социальных особенностей (различная культура, образ жизни) этнически разных популяций может иметь важное значение. Dapra V. с соавт. изучали ассоциации полиморфизмов *TNF α* (-238 [rs361525], -308 [rs1800629], -857 [rs1799724], -1031 [rs1799964]) с тяжестью, зудом, ранним началом заболевания или ответом на лекарственную терапию псориаза у кавказских итальянских пациентов. Ими установлена значимая ассоциация между вариантом -857(G) и индексом VAS-зуд ($p = 0,03$) и VAS-боль ($p = 0,006$), OR = 0,2 (0,04-0,98) и OR = 0,12 (0,02-0,59). Значимой ассоциации между генотипами или аллелями SNPs *TNF α* с другими клинико-патологическими параметрами или ответом на лечение препаратом этанерцептом (ингибитор фактора некроза опухоли) не наблюдалось [13].

В нашем исследовании вторым по силе ассоциации с обыкновенным папулезно-бляшечным

псориазом был полиморфный вариант гена *IL1β* (rs16944). Эта связь вполне укладывается в патогенез псориаза, как аутовоспалительного заболевания. В ряде исследований было показано, что мутантный аллель -511C/T (rs16944) гена *IL1β* влияет на развитие многих воспалительных заболеваний [1, 5, 23].

В научной литературе имеются весьма скудные сообщения об ассоциации полиморфизмов гена *IL1β* с псориазом. В частности имеются сообщения об ассоциации SNPs (rs16944) с псориазом у пациентов старше 50 лет [6, 11]. Н.Л. Hébert и соавт. установили, что два генетических варианта *IL1β*, rs16944 и rs2853550, ассоциированы с поздним началом псориаза, который возникает у пациентов старше 40 лет и является легким проявлением заболевания [19]. О.Б. Немчиновой и соавт. изучена роль полиморфизма -511C/T (rs16944) гена *IL1β* в развитии псориаза и экземы в популяции Западной Сибири. В своем исследовании авторам не удалось установить связь полиморфизма -511C/T (rs16944) гена *IL-1b* с развитием псориаза. Однако ими установлено, что носительство генотипа C/T повышает риск развития экземы у женщин [3].

В настоящем исследовании сам факт высокого процента энтропии *IL1β* (rs16944) говорит о том, что это полиморфизм, с одной стороны, оказывает влияние на формирование псориаза, а, с другой, межгенная связь между *IL1β* (rs16944) и *TNFα* (rs361525) является выраженной антагонистической (-8,34% энтропии) и протектирует формирование псориаза. Именно поэтому большинство исследователей не увидели значимых ассоциаций *IL1β* (rs16944) с псориазом.

В настоящем исследовании показан выраженный синергизм (5,47% энтропии) двух полиморфных вариантов: это *IL6* (rs1554606) и *IL8* (rs2227306), т. е., как уже говорилось выше, сочетание любых генотипов этих полиморфизмов (гомозиготный дикий, гетерозиготный, гомозиготный мутантный) детерминируют формирование обыкновенного папулезно-бляшечного псориаза. В то же время по отдельности *IL6* (rs1554606) проявлял силу ассоциации с псориазом равной 1,11% энтропии, а *IL8* (rs2227306) — всего 0,3% энтропии. В этом примере проявляется сила межгенных взаимодействий, связанная с патогенезом воспаления. Так, *IL6* является ведущей провоспалительной молекулой, а *IL8* — доминирующим провоспалительным хемокином [2]. В то же время в литературных источниках не было найдено исследований, посвященных взаимосвязям полиморфизмов *IL6* (rs1554606) и *IL8* (rs2227306) с псориазом, хотя роль самих молекул в патогенезе псориаза доказана [10, 24]. Однако известно, что псориаз имеет общие патофизиологические механизмы с другими аутоиммунными заболеваниями, такими как псориатический артрит (ПсА),

ревматоидный артрит (РА), болезнь Крона (БК) и др. Было найдено несколько исследований о взаимосвязи полиморфизмов *IL6* (rs1554606) и *IL8* (rs2227306) с аутоиммунными заболеваниями. Установлена связь между полиморфизмом *IL6* (rs1554606) и риском развития ожирения в молодой популяции Саудовской Аравии [9]; установлены корреляции между полиморфизмами *IL8* (rs2227306 и rs4073) и предрасположенностью к первичному подагрическому артриту в китайской популяции [12]; выявлена связь между полиморфизмом гена *IL8* (rs2227306) и ревматоидным артритом [14]; между SNPs CXCL8 и сахарным диабетом 2-го типа и пародонтитом [30].

Проведенное нами исследование еще раз доказывает, что именно межгенные взаимодействия детерминируют формирование псориаза, а генетические полиморфные варианты по отдельности вносят менее существенный вклад в развитие этого заболевания.

В нашем исследовании умеренным синергизмом в детерминировании обыкновенного папулезно-бляшечного псориаза обладали два полиморфных варианта гена, это *CRP* (rs 1205) и *IL10* (rs1800896) с величиной 3,41% энтропии. По отдельности *CRP* (rs 1205) имел значимую силу ассоциации, равное 2,55% энтропии, для *IL10* (rs1800896) эта величина равнялась 0,57%. Эти данные также укладываются в общую картину патогенеза псориаза, как аутовоспалительного заболевания и, соответственно, С-реактивный белок, как гуморальный фактор врожденного системного иммунитета, является значимым в развитии и поддержании воспаления. В целом, градация изучаемых полиморфных вариантов генов по силе ассоциации с обыкновенным папулезно-бляшечным псориазом была следующей: *TNFα* (rs361525) — 16,99% энтропии, *IL1β* (rs16944) — 6,40% энтропии, *CRP* (rs1205) — 2,55% энтропии, *IL6* (rs1554606) — 1,11% энтропии, *IL10* (rs1800896) — 0,57% энтропии, *IL8* (rs2227306) — 0,30% энтропии.

Анализ литературных данных показал, что С-реактивный белок (*CRP*) является хорошим маркером воспаления. Полиморфизм *CRP* rs1205 связан с уровнем циркулирующего плазменного *CRP*. В отношении исследуемого фенотипа найдено лишь одно исследование, изучающее ассоциацию SNP rs1205 с предрасположенностью к псориазу. Это исследование А. Sudhesan, который с соавторами изучил ассоциацию генетического варианта rs1205 в гене *CRP* с предрасположенностью к заболеванию и уровнем белка у южноиндийских тамиллов, больных псориазом (группа участников 600 чел., включающая 300 больных псориазом и 300 здоровых людей). Авторами установлено, что генетическая вариация *CRP* rs1205 не была связана с риском развития псориаза в исследуемой южноиндийской тамильской

популяции. Однако уровень циркулирующего *hs-CRP* был значительно выше у пациентов с псориазом по сравнению с контрольной группой ($p < 0,0001$), и уровень белка был значительно связан с тяжестью заболевания, оцененной по индексу PASI [31].

Другой ген этого синергизма был *IL10* (rs1800896). *IL10*, благодаря своим противовоспалительным свойствам, находится в центре внимания исследователей. Установлено, что относительный дефицит *IL10* играет основную роль в иммунопатогенезе псориаза. Изучение экспрессии *IL10* позволит лучше понять его роль в патогенезе псориаза. Анализ роли *IL10* и полиморфизма его промоторного гена в патогенезе псориаза приводился лишь в нескольких исследованиях. Isac L. и Jiquan S. в своем обзоре рассмотрели полиморфизм промоторного гена *IL10* в различных популяциях. В ходе исследования было установлено, что среди трех изученных полиморфизмов, -1082 G/A (rs 1800896) является наиболее распространенным полиморфизмом, связанным с риском развития псориаза среди египетского, азиатского, индийского и европейского населения [21]. Karam R.A. и соавт. генотипировали 110 пациентов с бляшечным псориазом на *IL10* – 1082A > G (rs1800896). Полученные результаты показали увеличение частоты аллеля G у пациентов с псориазом для варианта *IL10*, что свидетельствует о его связи с заболеванием [22]. Ряд исследователей сообщают, что -1082 A/G не ассоциируется с риском развития псориаза в тайской и южноиндийской тамильской популяциях [20, 35]. Qiao J. и соавт., проведя метаанализ 13 исследований, также не выявили ассоциацию SNPs rs1800896, rs3021097 и rs1800872 *IL10* с риском развития псориаза у азиатов и европеоидов [27].

Galimova E. и соавт. изучили ген-генные взаимодействия с применением обобщенного многофакторного анализа с понижением размерности (GMDR). Ими установлено, что сочетание двух SNP – *IL10* (rs1554286) и *IL20* (rs1518108) – ассоциировано со снижением риска развития псориаза. Авторы делают вывод, что генетические варианты иммуномодулирующих генов *IL10* и *IL20* могут оказывать протективный эффект у европейцев из России [15].

Соответственно, представленное нами исследование согласуется с ранее проведенными исследованиями иммуногенетики псориаза, в частности о значимости ген-генных взаимодействий в детерминировании этой аутовоспалительной патологии.

Заключение

Проведенное исследование показало, что детерминирование обыкновенного папулезно-бляшечного псориаза связано как с отдельными полиморфными вариантами генов цитокинов и С-реактивного белка, так и с межгенными (ген-генными) взаимодействиями. Для отдельных полиморфных вариантов генов сила (% энтропии) ассоциации с обыкновенным папулезно-бляшечным псориазом была следующая: *TNFA* (rs361525) – 16,99% энтропии, *IL1β* (rs16944) – 6,40% энтропии, *CRP* (rs1205) – 2,55% энтропии, *IL6* (rs1554606) – 1,11% энтропии, *IL10* (rs1800896) – 0,57% энтропии, *IL8* (rs2227306) – 0,30% энтропии. Выявлено, что выраженным синергизмом обладали *IL6* (rs1554606) и *IL8* (rs2227306); умеренным синергизмом – *CRP* (rs1205) и *IL10* (rs1800896) и выраженным антагонизмом *IL1β* (rs16944) и *TNFA* (rs361525).

Список литературы / References

1. Максимова Ю.В., Свечникова Е.В., Максимов В.Н., Колесник К.Н., Лыкова С.Г. Полиморфизм -511C/T гена *IL1B* и атопический дерматит // Иммунопатология, аллергология, инфектология, 2015. № 2. С. 35-38. [Maximova Yu.V., Svechnikova E.V., Maximov V.N., Kolesnik K.N., Lykova S.G. Polymorphism -511C/T gene *IL1B* and atopic dermatitis. *Immunopathologia, allergologia, infektologia* = *Immunopathology, Allergology, Infectology*, 2015, no. 2, pp. 35-38. (In Russ.)]
2. Меняйло М.Е., Малащенко В.В., Шмаров В.А., Газатова Н.Д., Мелашченко О.Б., Гончаров А.Г., Селедцова Г.В., Селедцов В.И. Роль интерлейкина-8 в непосредственной регуляции функциональной активности Т-лимфоцитов // Медицинская иммунология, 2017. Т. 19, № 5. С. 529-536. [Menailo M.E., Malashchenko V.V., Shmarov V.A., Gasatova N.D., Melashchenko O.B., Goncharov A.G., Seledtsova G.V., Seledtsov V.I. A role for interleukin-8 in direct regulation of T cell functional activity. *Meditsinskaya immunologiya* = *Medical Immunology (Russia)*, 2017, Vol. 19, no. 5, pp. 529-536. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2017-5-529-536.
3. Немчанинова О.Б., Мальченко Е.Е., Максимов В.Н., Лыкова С.Г. Ассоциация однонуклеотидного полиморфизма -511C/T (rs16944) гена *IL-1b* с псориазом и экземой // Медицинский альманах, 2018. № 4 (55). С. 178-180. [Nemchaninova O.B., Malchenko E.E., Maksimov V.N., Lykova S.G. Association of single nucleotide polymorphism -511C/T (rs16944) of *IL-1b* gene with psoriasis and eczema. *Meditsinskiy almanakh* = *Medicine Almanac*, 2018, Vol. 4, no 55, pp. 178-180. (In Russ.)]
4. Пономаренко И.В. Использование метода Multifactor Dimensionality Reduction (MDR) и его модификаций для анализа ген-генных и генно-средовых взаимодействий при генетико-эпидемиологических исследованиях (обзор) // Научные результаты биомедицинских исследований. 2019. Т. 5, № 1. С. 4-21. [Ponomarenko I.V. Using the method of Multifactor Dimensionality Reduction (MDR) and its modifications for

analysis of gene-gene and gene-environment interactions in genetic-epidemiological studies (review). *Nauchnye rezultaty biomeditsinskih issledovaniy = Research Results in Biomedicine*, 2019, Vol. 5, no. 1, pp. 4-21. (In Russ.)]

5. Шевченко А.В., Голованова О.В., Коненков В.И., Воевода М.И., Максимов В.Н. Полиморфизм промоторного региона гена IL-1 β у пациентов с острым инфарктом миокарда в анамнезе // Медицинская иммунология, 2010. Т.12, № 3.С. 219-226. [Shevchenko A.V., Golovanova O.V., Konenkov V.I., Voevoda M.I., Maksimov V.N. Polimorfizm promotornogo regiona gena IL-1 β u pacientov s ostrym infarktom miokarda v anamneze. *Meditsinskaya Immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2010, Vol. 12, no. 3, pp. 219-226. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2010-3-219-226.

6. Acikbas I., Sanli B., Tepeli E., Ergin S., Aktan S., Bagci H. Vitamin D receptor gene polymorphisms and haplotypes (Apa I, Bsm I, Fok I, Taq I) in Turkish psoriasis patients. *Med. Sci. Monit.*, 2012, Vol. 18, no. 11, pp. CR661CR 666.

7. Akcilar R., Dizen Namdar N., Yükcü F., Arslan Utku S. TNF- α gene -238G>A polymorphism is associated with psoriasis patients. *J. Cosmet. Dermatol.*, 2022, Vol. 21, no. 6, pp. 2662-2667.

8. AlBosale A.H., Mashkina E.V. Association between TP53, MDM2 and NQO1 gene polymorphisms and viral load among women with human papillomavirus. *Vavilovskii Zhurnal Genet. Seleksii*, 2022, Vol. 26, no. 1, pp. 59-64.

9. Alharbi K.K., Syed R., Khan I.A. Association of interleukin-6 polymorphisms with obesity and metabolic alterations in young Saudi population. *Mol. Biol. Rep.*, 2014, Vol. 41, no. 3, pp. 1519-1523.

10. Arican O., Aral M., Sasmaz S., Ciragil P. Serum levels of TNF-alpha, IFN-gamma, IL-6, IL-8, IL-12, IL-17, and IL-18 in patients with active psoriasis and correlation with disease severity. *Mediators Inflamm.*, 2005, Vol. 5, pp. 273-279.

11. Cramer C., Link E., Horster M., Koletzko S., Bauer C.P., Berdel D., von Berg A., Lehmann I., Herbarth O., Borte M., Schaaf B., Behrendt H., Chen C.M., Sausenthaler S., Illig T., Wichmann H.E., Heinrich J., Krämer U.; LISApplus Study Group and the GINIplus Study Group. Elder siblings enhance the effect of filaggrin mutations on childhood eczema: results from the 2 birth cohort studies LISApplus and GINIplus. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2010, Vol. 125, no. 6, pp. 1254-1260.e5.

12. Cui Y.X., Zhao H., Guo H.Q. Role of IL-8 rs4073 and rs2227306 polymorphisms in the development of primary gouty arthritis in a Chinese population. *Genet. Mol. Res.*, 2016, Vol. 15, no. 4, gmr15048511. doi: 10.4238/gmr15048511.

13. Daprà V., Ponti R., Lo Curcio G., Archetti M., Dini M., Gavatora M., Quaglino P., Fierro M.T., Bergallo M. Functional study of TNF- α as a promoter of polymorphisms in psoriasis. *Ital. J. Dermatol. Venerol.*, 2022, Vol. 157, no. 2, pp. 146-153.

14. Emonts M., Hazes M.J.M.W., Houwing-Duistermaat J.J., van der Gaast-de Jongh C.E., de Vogel L., Han H.K.H., Wouters J.M.G.W., Laman J.D., Dolhain R.J.E.M. Polymorphisms in genes controlling inflammation and tissue repair in rheumatoid arthritis: A case control study. *BMC Med. Genet.*, 2011, Vol. 12, 36. doi: 10.1186/1471-2350-12-36.

15. Galimova E., Rätsep R., Traks T., Kingo K., Escott-Price V., Kõks S. Interleukin-10 family cytokines pathway: genetic variants and psoriasis. *Br. J. Dermatol.*, 2017, Vol. 176, no. 6, pp. 1577-1587.

16. Gola D., Mahachie John J.M., van Steen K., König I.R. A roadmap to multifactor dimensionality reduction methods. *Brief. Bioinform.*, 2016, Vol. 17, no. 2, pp. 293-308.

17. Hagag M.M., Ghazy M.M., Elhelbawy N.G. Tumor necrosis factor- α gene promoter -308 and -238 polymorphisms and its serum level in psoriasis. *Biochem. Biophysics Rep.*, 2021, Vol. 27, 101050. doi: 10.1016/j.bbrep.2021.101050.

18. Hahn L.W., Ritchie M.D., Moore J.H. Multifactor dimensionality reduction software for detecting gene-gene and gene-environment interactions. *Bioinformatics*, 2003, Vol. 19, no. 3, pp. 376-382.

19. Hébert H.L., Bowes J., Smith R.L., McHugh N.J., Barker J.N.W.N., Griffiths C.E.M., Barton A., Warren R.B. Polymorphisms in IL-1B distinguish between psoriasis of early and late onset. *J. Invest. Dermatol.*, 2014, Vol. 134, no. 5, pp. 1459-1462.

20. Indhumathi S., Rajappa M., Chandrashekar L., Hariharan Ananthanarayanan P., Thappa D. M., Negi V. S. T helper-2 cytokine/regulatory T-cell gene polymorphisms and their relation with risk of psoriasis in a South Indian Tamil cohort. *Hum. Immunol.*, 2017, Vol. 78, pp. 209-215.

21. Isac L., Jiquan S. Interleukin 10 promotor gene polymorphism in the pathogenesis of psoriasis. *Acta Dermatovenerol. Alp. Pannonica Adriat.*, 2019, Vol. 28, no. 3, pp. 119-123.

22. Karam R.A., Zidan H.E., Khater M.H. Polymorphisms in the TNF- α and IL-10 gene promoters and risk of psoriasis and correlation with disease severity. *Cytokine*, 2014, Vol. 66, no. 2, pp. 101-105.

23. Lin N., Lu H., Cheng X., Zhao Y., Wan Q., Luo Y., Miao Y., Bai X., Liu D., Wang C. Association between the interleukin-1B polymorphism at rs16944 T>C and diabetic retinopathy. *Int. J. Immunogenet.*, 2023, Vol. 50, no. 1, pp. 34-40.

24. Ogawa E., Sato Y., Minagawa A., Okuyama R. Pathogenesis of psoriasis and development of treatment. *J. Dermatol.*, 2018, Vol. 45, no. 3, pp. 264-272.

25. Park M., Jeong H.B., Lee J.H., Park T. Spatial rank-based multifactor dimensionality reduction to detect gene-gene interactions for multivariate phenotypes. *BMC Bioinformatics*, 2021, Vol. 22, no. 1, 480. doi: 10.1186/s12859-021-04395-y.

26. Puşcaş A.D., Morar I.I., Vesa Ş.C., Cătană A., Puşcaş C., Ilieş R.F., Orasan R.-I. Association between IL-17F, IL-17RA gene polymorphisms and response to biological drugs in psoriasis and beyond. *Genes*, 2023, Vol. 14, no. 5, 1123. doi: 10.3390/genes14051123.

27. Qiao J., Jia Q.-N., Jin H.-Z. Lack of association of the IL-1RN and IL-10 polymorphisms with risk of psoriasis: A meta-analysis. *Mol. Genet. Genomic Med.*, 2019, Vol. 7, no. 1, e00512. doi.org/10.1002/mgg3.512.
28. Sadafi S., Ebrahimi A., Sadeghi M., Emami Aleagha O. Association between tumor necrosis factor- α polymorphisms (rs361525, rs1800629, rs1799724, 1800630, and rs1799964) and risk of psoriasis in studies following Hardy-Weinberg equilibrium: A systematic review and meta-analysis. *Heliyon*, 2023, Vol. 9, no. 7, e17552. doi: 10.1016/j.heliyon.2023.e17552.
29. Shen C., Wang H., Song Q., Zhang B., Liu X., Li J. Tumor Necrosis Factor- α 308 G/A polymorphism and psoriasis risk: a pooled analysis in different populations. *Medicine*, 2020, Vol. 99, no. 47, e22339. doi: 10.1097/MD.00000000000022339.
30. Silva B.R.D., Cirelli T., Nepomuceno R., Theodoro L.H., Orrico S.R.P., Cirelli J.A., Barros S.P., Scarel-Caminaga R.M. Functional haplotype in the Interleukin8 (CXCL8) gene is associated with type 2 Diabetes Mellitus and Periodontitis in Brazilian population. *Diabetes Metab. Syndr.*, 2020, Vol. 14, no. 6, pp.1665-1672.
31. Sudhesan A., Rajappa M., Chandrashekar L., Ananthanarayanan P.H., Thappa D.M., Satheesh S., Chandrasekaran A., Devaraju P. Association of C-reactive protein (rs1205) gene polymorphism with susceptibility to psoriasis in south indian tamils. *J. Clin. Diagn. Res.*, 2016, Vol. 10, no. 10, pp. GC01-GC04.
32. Suleman S., Chhabra G., Raza R., Hamid A., Qureshi J.A., Ahmad N. Association of CARD14 Single-Nucleotide Polymorphisms with Psoriasis. *Int. J. Mol. Sci.* 2022, Vol. 23, no. 16, 9336. doi: 10.3390/ijms23169336.
33. Traks T., Keermann M., Prans E., Karelson M., Loite U., Kõks G., Silm H., Kõks S., Kingo K. Polymorphisms in IL36G gene are associated with plaque psoriasis. *BMC Med. Genet.*, 2019, Vol. 20, no. 1, 10. doi: 10.1186/s12881-018-0742-2.
34. Vičić M., Kaštelan M., Brajac I., Sotošek V., Massari L.P. Current concepts of psoriasis immunopathogenesis. *Int. J. Mol. Sci.*, 2021, Vol. 22, no. 21, 11574. doi: 10.3390/ijms222111574.
35. Wongpiyabovorn J., Hirankarn N., Ruchusatsawat K., Yooyongsatit S., Asawanonda P., Poovorawan Y. Association of the interleukin-10 distal promoter (-2763A/C) polymorphism with late-onset psoriasis. *Clin. Exp. Dermatol.*, 2008, Vol. 23, no. 2, pp. 186-189.
36. Wu M., Dai C., Zeng F. Cellular mechanisms of psoriasis pathogenesis: a systemic review. *Clin. Cosmet. Investig. Dermatol.*, 2023, Vol. 16, pp. 2503-2515.
37. Wu X., Zhao Z. Associations between ERAP1 gene polymorphisms and psoriasis susceptibility: a meta-analysis of case-control studies. *Biomed Res. Int.*, 2021, Vol. 2021, 5515868. doi: 10.1155/2021/5515868.

Авторы:

Романова Е.Л. — аспирантка кафедры генетики и фундаментальной медицины ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный университет», г. Кемерово, Россия

Шабалдин А.В. — д.м.н., доцент, профессор кафедры генетики и фундаментальной медицины ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный университет», г. Кемерово, Россия

Белов Е.Г. — главный врач ГБУЗ «Кузбасский клинический кожно-венерологический диспансер», г. Кемерово, Россия

Стрига Л.В. — к.м.н., заместитель главного врача по медицинской части ГБУЗ «Кузбасский клинический кожно-венерологический диспансер», г. Кемерово, Россия

Яковлева А.А. — инженер кафедры генетики и фундаментальной медицины ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный университет», г. Кемерово, Россия

Шеченко Е.А. — заведующая микологическим отделением № 1 ГБУЗ «Кузбасский клинический кожно-венерологический диспансер», г. Кемерово, Россия

Шабалдина Е.В. — д.м.н., доцент, заведующая кафедрой оториноларингологии ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный медицинский университет», г. Кемерово, Россия

Authors:

Romanova E.L., Postgraduate Student, Department of Genetics and Fundamental Medicine, Kemerovo State University, Kemerovo, Russian Federation

Shabaldin A.V., PhD, MD (Medicine), Associate Professor, Professor, Department of Genetics and Fundamental Medicine, Kemerovo State University, Kemerovo, Russian Federation

Belov E.G., Chief Physician, Kuzbass Clinical Skin and Venereological Dispensary, Kemerovo, Russian Federation

Striga L.V., PhD (Medicine), Deputy Chief Physician for Medicine, Kuzbass Clinical Skin and Venereological Dispensary, Kemerovo, Russian Federation

Yakovleva A.A., Engineer, Department of Genetics and Fundamental Medicine, Kemerovo State University, Kemerovo, Russian Federation

Shevchenko E.A., Head, Mycological Department No. 1, Kuzbass Clinical Skin and Venereological Dispensary, Kemerovo, Russian Federation

Shabaldina E.V., PhD, MD (Medicine), Associate Professor, Head, Department of Otorhinolaryngology, Kemerovo State Medical University, Kemerovo, Russian Federation

СОПРЯЖЕННОСТЬ КЛЕТОЧНОЙ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ ОПУХОЛИ С ЦИТОКИНПРОДУЦИРУЮЩИМ РЕЗЕРВОМ ПРИ ЛЮМИНАЛЬНЫХ И НЕЛЮМИНАЛЬНЫХ ПОДТИПАХ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Мангазеева Е.Д.¹, Студеникина А.А.^{1,2}, Рыжикова С.Л.³,
Аутеншлюс А.И.^{1,2}

¹ ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет», г. Новосибирск, Россия

² Научно-исследовательский институт молекулярной биологии и биофизики ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины», г. Новосибирск, Россия

³ АО «Вектор-Бест», г. Новосибирск, Россия

Резюме. Существует прямая взаимосвязь между выраженностью функционального, морфологического и биохимического атипизма клеток опухоли и степенью ее злокачественности. Выделяют пять молекулярно-генетических подтипов рака молочной железы. При этом известно, что наиболее агрессивным течением характеризуются нелюминальные подтипы, в особенности — тройной негативный рак молочной железы. Целью работы явилось определение сопряженности между относительным содержанием клеток различной степени дифференцировки с продукцией цитокинов биоптатами рака молочной железы при люминальных и нелюминальных подтипах рака молочной железы. Материалом исследования служили биоптаты 49 женщин с инвазивной карциномой молочной железы неспецифического типа, средний возраст которых составил 59 лет. Пациенты были разделены на три группы в зависимости от принадлежности к тому или иному молекулярно-генетическому подтипу опухоли. В I группу включены пациенты с люминальным подтипом А, во вторую — с люминальным В и в III — с нелюминальными подтипами рака молочной железы. Изучали спонтанную и стимулированную поликлональными активаторами продукцию цитокинов. Значение цитокинпродуцирующего резерва биоптатов выражали с помощью индекса влияния поликлональных активаторов ввиду его точности, позволяющей избежать ошибки за счет одинаковых размеров биоптата каждого пациента и условий их инкубирования. Относительное содержание опухолевых клеток различной степени дифференцировки в образцах оценивали с помощью светооптической микроскопии с учетом Ноттингемской градирующей системы. При оценке спонтанной и стимулированной продукции цитокинов, а также степени дифференцировки клеток образцов опухоли выявлены прямые и обратные корреляционные связи между исследуемыми группами. Наиболее важным показателем оказался индекс влияния поликлонального активатора на продукцию биоптатами IL-10 и VEGF-A. Благодаря этому мы

Адрес для переписки:

Мангазеева Екатерина Дмитриевна
ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный
медицинский университет»
630091, Россия, г. Новосибирск, Красный пр., 52.
Тел./факс: 8 (383) 226-35-60.
E-mail: lpciip@211.ru

Address for correspondence:

Ekaterina D. Mangazeeva
Novosibirsk State Medical University
52 Krasnyy Ave
Novosibirsk
630091 Russian Federation
Phone/fax: +7 (383) 226-35-60.
E-mail: lpciip@211.ru

Образец цитирования:

Е.Д. Мангазеева, А.А. Студеникина, С.Л. Рыжикова,
А.И. Аутеншлюс «Сопряженность клеточной
дифференцировки опухоли с цитокинпродуцирующим
резервом при люминальных и нелюминальных подтипах
рака молочной железы» // Медицинская иммунология,
2025. Т. 27, № 1. С. 97–106.
doi: 10.15789/1563-0625-AOT-2989

© Мангазеева Е.Д. и соавт., 2025

Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

E.D. Mangazeeva, A.A. Studenikina, S.L. Ryzhikova,
A.I. Autenshlyus "Association of tumor cell differentiation
with cytokine-producing reserve in luminal and non-luminal
subtypes of breast cancer", Medical Immunology (Russia)/
Meditsinskaya Immunologiya, 2025, Vol. 27, no. 1,
pp. 97–106.
doi: 10.15789/1563-0625-AOT-2989

© Mangazeeva E.D. et al., 2025

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

DOI: 10.15789/1563-0625-AOT-2989

можем представить персонифицированные сведения по каждому пациенту по этим двум цитокинам еще до начала лечения. Анализ ROC-кривых показал хорошее качество и оптимальные значения точек отсечения концентраций цитокинов и относительного содержания низкодифференцированных клеток, которые могли бы наилучшим образом предсказать наличие неблагоприятных неопластических подтипов рака молочной железы. Основываясь на полученных нами данных, можно сделать вывод о том, что цитокинпродуцирующий резерв сопряжен с клеточной дифференцировкой и зависит от молекулярно-генетического подтипа опухоли.

Ключевые слова: рак молочной железы, биоптаты, цитокины, молекулярно-генетические подтипы, клеточная дифференцировка, поликлональный активатор

ASSOCIATION OF TUMOR CELL DIFFERENTIATION WITH CYTOKINE-PRODUCING RESERVE IN LUMINAL AND NON-LUMINAL SUBTYPES OF BREAST CANCER

Mangazeeva E.D.^a, Studenikina A.A.^{a,b}, Ryzhikova S.L.^c, Autenshlyus A.I.^{a,b}

^a Novosibirsk State Medical University, Novosibirsk, Russian Federation

^b Institute of Molecular Biology and Biophysics, Federal Research Center of Fundamental and Translational Medicine, Novosibirsk, Russian Federation

^c Vector-Best JSC, Novosibirsk, Russian Federation

Abstract. There is a direct association between the functional, morphologic and biochemical atypic features of cellular tumor expression and malignancy. Five molecular-genetic subtypes of breast cancer are recognized. The most aggressive course is known to be characterized by non-luminal subtypes, in particular, a triple-negative breast cancer. The aim of this research is to determine the association between the percentage of the cells showing distinct differentiation types, and cytokine production by breast cancer biotates in both luminal and non-luminal breast cancer subtypes. Biopates of 49 women with the invasive breast carcinoma of non-specific type, at the average age of 59 years, were used as the material for the study. The patients were divided into three groups according to the molecular-genetic subtype of cancer. Group I included patients with luminal subtype A, group II – with luminal B and group III – with non-luminal subtypes of breast cancer. Spontaneous and *in vitro* stimulated by polyclonal activators production of cytokines was evaluated. The level of cytokine-producing reserve by the biopsy specimens was expressed as the influence index of polyclonal activators, due to its accuracy, thus making it possible to avoid errors due to the similar sizes of biopates from each patient and their incubation conditions. The percentage of tumor cells of varying degrees of differentiation in the samples was assessed using light microscopy by means of the Nottingham grading system. When assessing spontaneous and stimulated production of cytokines, as well as degree of cell differentiation of tumor samples, direct and reverse correlations were revealed between the study groups. The most important parameter was the influence index of the polyclonal activator which characterized production of IL-10 and VEGF-A by the biopates. Therefore, we can provide personalized information for each patient, in particular, for these two cytokines, even before starting the treatment. The analysis of ROC-curves showed good quality and optimal level of cytokine concentration and percentage of low-differentiated cells. This approach could predict the presence of unfavorable non-luminal breast cancer subtypes in the best way. In general, we can make a conclusion that cytokine-producing reserve is connected with cellular differentiation and depends on molecular-genetic subtype of the tumor.

Keywords: breast cancer, tumor biopsies, cytokines, molecular subtypes, cell differentiation, polyclonal activator

Введение

Согласно современным научным данным сформировалось представление о неоднозначной роли цитокинов в прогрессии и метастазировании опухолей. Известно, что цитокины, являясь важнейшими факторами связанного с раком воспаления, формируют сети, активирующие клеточные сигнальные пути, способствующие вы-

живанию, пролиферации, инвазии и миграции опухолевых клеток [2, 11, 21]. Так, например, показано, что IL-6, IL-8, IL-18, IL-1 и его рецепторный антагонист IL-1ra продуцируются опухолевыми клетками и клетками микроокружения и посредством активации ангиогенеза, способствуют скорейшему метастазированию [2, 9, 10]. Представители семейства широкоизученных

регуляторов ангиогенеза VEGF-A способны повышать сосудистую проницаемость и обеспечивать образование новых кровеносных сосудов в опухоли, соответственно концентрация VEGF-A должна быть сопряжена с прогрессированием опухолевого процесса [5, 19]. Согласно последним литературным данным, гранулоцитарный колониестимулирующий фактор G-CSF способствует эпителиально-мезенхимальному переходу, представляющим собой начальный этап метастазирования [14, 16].

Известно, что опухоли обладают морфологическим атипизмом — тканевым и клеточным. При этом тканевый атипизм, характеризующийся нарушением гистотипической дифференцировки, встречается и при доброкачественных заболеваниях, тогда как клеточный отражает нарушение цитотипической дифференцировки и может быть выражен в разной степени вплоть до крайней степени катаплазии, когда строение опухоли упрощается и она становится однородной по клеточному составу [3, 23]. Именно такие низко- и недифференцированные опухоли характеризуются наибольшей степенью злокачественности [3, 7, 23].

В настоящее время выделяют 5 основных молекулярно-генетических подтипов рака молочной железы (РМЖ), которые предоставляют прогностическую информацию и определяют терапевтический подход: люминальный А (LumA); люминальный В HER2-отрицательный (LumB⁻); люминальный В HER2-положительный (LumB⁺); HER2-положительный, не люминальный (HER2⁺) и тройной негативный РМЖ (TNBC) [4, 17].

При этом известно, что люминальные подтипы, в особенности люминальный А, обладают наилучшим прогнозом, тогда как нелюминальные, в частности тройной негативный — наихудшим среди других молекулярных подтипов [4, 17, 20].

В нашей лаборатории были определены взаимосвязи цитокинпродуцирующего резерва опухоли с такими иммуногистохимическими параметрами, как экспрессия эстрогена, прогестерона и маркера пролиферации Ki-67. Также анализировались гистопатологические параметры [1, 2]. Полученные данные свидетельствуют о сложных механизмах, опосредованных цитокинами, обеспечивающими инвазивный рост злокачественной опухоли. Тем не менее в литературе нет данных о сопряженности относительного содержания клеток различной степени дифференцировки с цитокинпродуцирующим резервом биоптатов, в том числе и при различных молекулярно-генетических подтипах РМЖ.

Цель исследования — определить сопряженность между относительным содержанием клеток различной степени дифференцировки с продукцией цитокинов биоптатами инвазивной карци-

номы молочной железы неспецифического типа (ИКНТ) при люминальных и нелюминальных подтипах РМЖ.

Материалы и методы

Материалом исследования служили биоптаты 49 женщин в возрасте 39-77 лет с ИКНТ II и III степени злокачественности и супернатанты, полученные при их культивировании *in vitro*, проходивших лечение в Новосибирском областном онкологическом диспансере. Все исследования были проведены в соответствии с Хельсинкской декларацией после получения письменного информированного добровольного согласия каждого пациента на получение биопсии опухоли и дальнейшее проведение исследования. (Бразилия, Форталеза, 2013) [22]. Этический комитет Научно-исследовательского института молекулярной биологии и биофизики дал разрешение на проведение этого исследования, протокол № 2016-3 от 15.03.2016 г.

Критерием включения в исследования являлся впервые выявленный РМЖ. Критериями исключения — наличие отдаленных метастазов, обострение хронических заболеваний, проведение неoadъювантной терапии.

Пациенты были разделены на 3 группы в соответствии с принадлежностью к тому или иному молекулярно-генетическому подтипу опухоли. Ввиду небольшого количества испытуемых и сходных терапевтических и прогностических подходов было решено объединить люминальные В «+» и В «-», а также HER2⁺ и тройной негативный РМЖ.

В итоге в первую группу были включены 12 больных с люминальным подтипом А. Вторую группу составили 30 пациентов с люминальным подтипом В. Третья группа — 7 пациентов с нелюминальными подтипами (HER2⁺ и тройной негативный).

Для оценки цитокинпродуцирующего резерва опухоли и ее микроокружения применяли комплекс поликлональных активаторов (ПА), состоящий из фитогемагглютинаина в концентрации 4 мкг/мл, конканавалина А в концентрации 4 мкг/мл и липополисахарида в концентрации 2 мкг/мл. В исследовании использовали стандартизованный набор реагентов «ЦИТОКИН-СТИМУЛ-БЕСТ» производства АО «Вектор-Бест». Биоптаты опухолей, полученные методом трепанобиопсии, объемом 8 мм³, помещали в 2 стеклянных флакона, в одном из которых находилась только питательная среда DMEM-F12 (спонтанная продукция), а в другом — раствор ПА в таком же объеме среды (продукция, индуцированная ПА). Далее биоптаты ИКНТ извлекали из среды и фиксировали в нейтральном растворе формалина для проведения дальнейшего патогистологического исследования. С целью

получения очищенного от клеток супернатанта оставшиеся клетки опухоли осаждали центрифугированием при 2000 об/мин в течение 15 мин. После осаждения клеток опухоли с помощью иммуноферментного анализа определяли концентрацию цитокинов (IL-2, IL-6, IL-8, IL-10, IL-17, IL-18, IL-1 β , IL-1 α , TNF α , IFN γ , G-CSF, GM-CSF, VEGF-A, MCP-1) с использованием наборов реагентов производства АО «Вектор-Бест». Индекс влияния поликлонального активатора (ИВПА) на продукцию цитокинов опухолью и клетками ее микроокружения высчитывали по формуле: ИВПА = А/Б, где А – концентрация цитокина в супернатанте биоптата после стимуляции опухоли поликлональными активаторами, Б – спонтанная продукция цитокина в супернатанте биоптата без стимуляции [2, 8].

Для проведения патогистологического исследования зафиксированные в формалине биоптаты ИКНТ обезвоживали и заключали в парафин с последующим приготовлением гистологических срезов толщиной 4–5 мкм. Процессы депарафинизации и регидратации образцов ИКНТ проводили по стандартной методике с использованием проводки ксилол-этанол. Полученные срезы окрашивались гематоксилином и эозином по стандартной методике. Исследование проводили с помощью световой микроскопии с использованием объектива $\times 40$.

Степень дифференцировки опухолевых клеток в образцах ИКНТ оценивали по определенным цитоморфологическим критериям: степени выраженности клеточного, в частности ядерного полиморфизма, и ядерной атипии (ядерно-цитоплазматического отношения) с учетом Ноттингемской градирующей системы [18]. Для высокодифференцированных клеток (ВД) был характерен фенотип, приближенный к нормальным клеткам ткани молочной железы: ядра незначительно крупнее по сравнению с нормальными структурами, с ровными контурами, небольшой вариацией в размерах, отмечалось преобладание цитоплазмы над ядром. Низкодифференцированные клетки (НД), напротив, отличались выраженными различиями в форме и размерах ядер (полиморфизмом), часто с заметными ядрышками, высоким ядерно-цитоплазматическим отношением, наличием большого количества митозов, включая патологические. Умеренно дифференцированные (УД) характеризовались как тип клеток, занимающих промежуточное положение между ВД и НД по наличию и степени выраженности перечисленных признаков [12]. Оценка клеток проводилась в 10 полях зрения с последующим подсчетом относительно содержания клеток с той или иной степенью дифференцировки.

Уровень статистической значимости различий между группами определялся с помощью непар-

аметрического критерия Вилкоксона–Манна–Уитни. Показатели выражали в виде медианы (Me), нижнего и верхнего квартилей ($Q_{0,25}$ – $Q_{0,75}$). Вычисления медиан и нижнего и верхнего квартилей, корреляционный анализ по Спирмену с учетом его достоверности (p), а также ROC-анализ для определения точки отсчета концентрации цитокинов и для оценки качества моделей проводили с помощью пакета программ IBM SPSS Statistics v. 22.0.

Результаты

Исследование показало, что спонтанная продукция IL-1 α в группе III более чем в три раза превышает аналогичный показатель в группах I и II. При воздействии ПА такая закономерность сохраняется, однако различия в группах менее существенны, хоть и достоверны. При оценке ИВПА на продукцию этого цитокина в исследуемых группах достоверных различий не получено. Группы I и III характеризовались более высокой спонтанной продукцией IL-10 и G-CSF, при оценке влияния ПА на продукцию G-CSF в группах также отмечаются достоверные различия. Показатели ИВПА на продукцию G-CSF и GM-CSF снижены в группе III по сравнению с группой II, что указывает на истощение резерва синтеза данных цитокинов у пациентов с нелюминальными подтипами РМЖ. Напротив, ИВПА на продукцию VEGF-A повышен у пациентов третьей группы по сравнению с группой II. При сравнении между люминальными подтипами РМЖ (группа I и II) выявлена исходно высокая спонтанная продукция MCP-1 при люминальном А-подтипе, достоверно большая стимулированная ПА продукция IL-10 и G-CSF. При оценке ИВПА на продукцию цитокинов было выявлено различие между исследуемыми группами по IL-2, IL-17, IFN γ (табл. 1).

При оценке относительного содержания клеток различной степени дифференцировки выявлен достоверно больший процент НД в группе III (Me = 30; $Q_{0,25}$ = 12; $Q_{0,75}$ = 35) по сравнению с группами I (Me = 10; $Q_{0,25}$ = 2; $Q_{0,75}$ = 23,25; p = 0,04) и II (Me = 15; $Q_{0,25}$ = 4,75; $Q_{0,75}$ = 25; p = 0,04), что подтверждает более злокачественное течение заболевания у пациентов с нелюминальными подтипами РМЖ.

При анализе сопряженности между относительным содержанием клеток различной степени дифференцировки и продукцией цитокинов в исследуемых группах, были выявлены определенные корреляционные связи. В частности установлено, что в группе I имеется отрицательная корреляционная связь между процентом НД и спонтанной продукцией VEGF-A и IL-6, а также положительная корреляционная связь между относительным содержанием ВД и стимулированной ПА продукцией IFN γ . При оценке ИВПА на

ТАБЛИЦА 1. СПОНТАННАЯ И СТИМУЛИРОВАННАЯ ПОЛИКЛОНАЛЬНЫМИ АКТИВАТОРАМИ (ПА) ПРОДУКЦИИ ЦИТОКИНОВ, А ТАКЖЕ ИВПА НА ПРОДУКЦИЮ ЦИТОКИНОВ БИОПТАТАМИ ИНВАЗИВНОЙ КАРЦИНОМЫ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ НЕСПЕЦИФИЧЕСКОГО ТИПА (ИКНТ) В ИССЛЕДУЕМЫХ ГРУППАХ

TABLE 1. SPONTANEOUS AND STIMULATED BY POLYCLONAL ACTIVATORS (PA) PRODUCTION OF CYTOKINES, AS WELL AS IPAE ON THE PRODUCTION OF CYTOKINES IN BIOPATES OF INVASIVE BREAST CARCINOMA OF A NONSPECIFIC TYPE (ICNT) IN THE STUDY GROUPS

Цитокины Cytokine	Группы пациентов с ИКНТ Group of patients with ICNT			p		
	Группа I Group I	Группа II Group II	Группа III Group III	Группы I и II Groups I and II	Группы I и III Groups I and III	Группы II и III Groups II and III
	Спонтанная продукция цитокинов (пг/мл), Ме ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$) Spontaneous production of cytokines (pg/mL), Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)					
IL-10	19,95 (7,85-40,13)	8,00 (3,25-13,48)	16,3 (12,40-43,30)	0,004	n*	0,009
IL-1ra	7957,5 (5455,0-9950,0)	6525 (1637,68-16710,00)	21375 (15855,0-36055,0)	n*	0,001	0,018
G-CSF	3096,75 (954,38-3695,38)	1503,5 (599,85-2654,75)	2850,5 (2767,5-2974,5)	0,008	n*	0,002
MCP-1	10088,5 (2592,25-13570,18)	1971,05 (1123,70-5785,58)	6524 (3840,3-9241,6)	0,002	n*	n*
	Стимулированная ПА продукция цитокинов (пг/мл), Ме ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$) PA-stimulated cytokine production (pg/mL), Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)					
IL-10	76,8 (10,88-223,63)	9,65 (2,38-23,53)	33,0 (10,10-86,60)	0,003	n*	n*
IL-1ra	17015,0 (11651,13-27025,00)	15087,8 (10058,75-30545,00)	35120 (21010,0-50985,0)	n*	0,028	0,01
G-CSF	2986,5 (2025,38-3720,50)	2487,5 (1275,9-2850,5)	2939,0 (1897,0-3077,0)	0,021	n*	0,048
	ИВПА на продукцию цитокинов, Ме ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$) IPAE on cytokine production, Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)					
IL-2	3,6 (1,96-9,16)	1,23 (1,00-2,67)	6,0 (0,71-13,80)	0,02	n*	n*
IL-17	3,19 (1,24-11,81)	1,05 (0,71-1,75)	1,5 (0,84-3,90)	0,013	n*	n*
IFN γ	0,47 (0,21-2,79)	1,34 (0,84-2,90)	1,47 (0,60-9,45)	0,025	n*	n*
G-CSF	1,09 (0,95-3,36)	1,57 (0,98-2,13)	0,98 (0,70-1,04)	n*	n*	0,038
GM-CSF	3,18 (2,24-7,73)	5,0 (1,88-10,30)	1,2 (1,05-3,75)	n*	n*	0,030
VEGF	0,66 (0,34-1,10)	0,5 (0,30-0,88)	1,2 (0,5-1,7)	n*	n*	0,018

Примечание. n* – недостоверные различия ($p \geq 0,05$); группа I – люминальный А, группа II – люминальный В, группа III – нелюминальные молекулярные подтипы.

Note. n*, unreliable differences ($p \geq 0.05$); group I, luminal A; group II, luminal B; group III, non-luminal subtypes.

продукцию G-CSF обнаружена обратная зависимость с процентом ВД. Выявлены пять вариантов корреляционных связей между спонтанной продукцией IL-2, IL-18, IL-1 β , IL-1ra, G-CSF и содержанием НД и УД, пять вариантов между

стимулированной ПА продукцией IL-2, IL-18, GM-CSF и процентом УД и НД в группе II. При оценке ИВПА в этой группе пациентов обнаружены прямые корреляционные связи между относительным содержанием УД и IL-8, IL-1ra,

ТАБЛИЦА 2. КОРРЕЛЯЦИОННЫЕ СВЯЗИ МЕЖДУ СПОНТАННОЙ, СТИМУЛИРОВАННОЙ ПОЛИКЛОНАЛЬНЫМИ АКТИВАТОРАМИ (ПА) ПРОДУКЦИИ ЦИТОКИНОВ, ИВПА НА ПРОДУКЦИЮ ЦИТОКИНОВ БИОПТАТАМИ ИНВАЗИВНОЙ КАРЦИНОМЫ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ НЕСПЕЦИФИЧЕСКОГО ТИПА (ИКНТ) И ОТНОСИТЕЛЬНОГО СОДЕРЖАНИЯ КЛЕТОК РАЗНОЙ СТЕПЕНИ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ В ИССЛЕДУЕМЫХ ГРУППАХ

TABLE 2. CORRELATIONS BETWEEN SPONTANEOUS, STIMULATED BY POLYCLONAL ACTIVATORS (PA) CYTOKINE PRODUCTION, IPAЕ ON CYTOKINE PRODUCTION IN BIOPATES OF INVASIVE NONSPECIFIC BREAST CARCINOMA (ICNT) AND THE PERCENTAGE OF THE CELLS HAVING VARIOUS DIFFERENTIATION IN THE STUDY GROUPS

Группа пациентов Patient group	Выявленные корреляции Identified correlations	Коэффициент корреляции, r Correlation coefficient, r	p
Группа I Group I (n = 12)	IL-6/% НД / IL-6/% LD	-0,581	0,047
	VEGF/% НД / VEGF/% LD	-0,599	0,040
	ПА IFNγ/% ВД / PA IFNγ/% HD	0,626	0,030
	ИВПА G-CSF/% ВД / IPAЕ G-CSF/% HD	-0,604	0,038
Группа II Group II (n = 30)	IL-2/% НД / IL-2/% LD	-0,400	0,029
	IL-18/% НД / IL-18/% LD	0,524	0,003
	IL-1β/% НД / IL-1β/% LD	0,327	0,043
	IL-1ra/% УД / IL-1ra/% MD	-0,493	0,006
	G-CSF/% УД / G-CSF/% MD	-0,376	0,041
	ПА IL-2/% НД / PA IL-2/% LD	-0,386	0,035
	ПА IL-2/% УД / PA IL-2/% MD	0,493	0,006
	ПА IL-18/% НД / PA IL-18/% LD	0,504	0,005
	ПА GM-CSF/% НД / PA GM-CSF/% LD	-0,440	0,015
	ПА GM-CSF/% УД / PA GM-CSF/% MD	0,493	0,006
	ИВПА IL-8/% УД / IPAЕ IL-8/% MD	0,468	0,009
	ИВПА IL-1ra/% УД / IPAЕ IL-1ra/% MD	0,458	0,011
	ИВПА G-CSF/% УД / IPAЕ G-CSF/% MD	0,430	0,018
Группа III Group III (n = 7)	IL-1β/% УД / IL-1β/% MD	-0,815	0,025
	ПА IL-6/% УД / PA IL-6/% MD	-0,775	0,041
	ПА IL-8/% УД / PA IL-8/% MD	-0,075	0,041
	ПА IFNγ/% УД / PA IFNγ/% MD	-0,793	0,033
	ИВПА IL-17/% УД / IPAЕ IL-17/% MD	-0,778	0,039

Примечание. Группа I – люминальный А, группа II – люминальный В, группа III – нелюминальные молекулярные подтипы; НД – низкодифференцированные клетки, УД – умеренно дифференцированные клетки, ВД – высокодифференцированные клетки опухолей.

Note. Group I, luminal A; group II, luminal B; group III, non-luminal molecular subtypes; LD, low-differentiated cells; MD, moderate-differentiated cells; HD, high-differentiated cells.

G-CSF. В группе III выявлена обратная зависимость между спонтанной продукцией IL-1 β и процентом УД, три отрицательные корреляционные связи между стимулированной ПА продукцией IL-6, IL-8 и IFN γ с относительным содержанием УД и отрицательная связь между ИВПА на IL-17 и процентом УД (табл. 2).

Полученные статистически значимые различия между группами позволили предположить, что по уровню спонтанной и стимулированной ПА продукции определенных цитокинов, а также по относительному содержанию клеток различной степени дифференцировки можно с высокой

степенью вероятности отнести пациента к тому или иному молекулярно-генетическому подтипу и, следовательно, определить прогноз в каждом индивидуальном случае. Для подтверждения нашего предположения в группах был проведен ROC-анализ полученных данных в каждой испытуемой группе (табл. 3).

ROC-кривые позволили оценить качество моделей по эффективности разделения всех пациентов на группы в зависимости от принадлежности к люминальному А, люминальному В или нелюминальному подтипу.

ТАБЛИЦА 3. ОЦЕНКА СПОНТАННОЙ, СТИМУЛИРОВАННОЙ ПОЛИКЛОНАЛЬНЫМИ АКТИВАТОРАМИ (ПА) ПРОДУКЦИИ ЦИТОКИНОВ, ИВПА НА ПРОДУКЦИЮ ЦИТОКИНОВ БИОПТАТАМИ ИНВАЗИВНОЙ КАРЦИНОМЫ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ НЕСПЕЦИФИЧЕСКОГО ТИПА (ИКНТ), А ТАКЖЕ ОТНОСИТЕЛЬНОГО СОДЕРЖАНИЯ КЛЕТОК РАЗНОЙ СТЕПЕНИ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ В ИССЛЕДУЕМЫХ ГРУППАХ ПРИ ПОМОЩИ РОС-АНАЛИЗА

TABLE 3. ASSESING OF SPONTANEOUS AND STIMULATED BY POLYCLONAL ACTIVATORS (PA) PRODUCTION OF CYTOKINES, IPAЕ ON THE PRODUCTION OF CYTOKINES IN BIOPATES OF INVASIVE BREAST CARCINOMA OF A NONSPECIFIC TYPE (ICNT), AS WELL AS THE PERCENTAGE OF THE CELLS HAVING VARIOUS DIFFERENTIATION IN THE STUDY GROUPS USING ROC ANALYSIS

Группа Group	Показатель Mark	Площадь под кривой Area under the curve (AUC)	Пороговые значения (пг/мл) или % Limit (pg/mL) or %	Чувстви- тельность (%) Sensitivity (%)	Специ- фичность (%) Specificity (%)	p
Спонтанная продукция цитокинов (пг/мл) или % клеток различной степени дифференцировки в образцах из флакона с питательной средой Spontaneous production of cytokines (pg/mL) or % of cells having various differentiation in samples from a bottle with a nutrient medium						
I	IL-10	0,738	15,5	67	73	0,014
	G-CSF	0,739	2882,25	67	81	0,014
	MCP	0,775	6732,5	66,7	78,4	0,005
II	УД	0,695	55,5	70	63,2	0,023
III	IL-1ra	0,837	15820,0	86	79	0,005
	НД (LD)	0,775	26,5	71,4	85,7	0,032
Стимулированная ПА продукция цитокинов (пг/мл) или % клеток различной степени дифференцировки в образцах из флакона с ПА PA-stimulated production of cytokines (pg/mL) or % of cells having various differentiation in samples from a bottle with PA						
I	IL-10	0,757	20,80	75	67,6	0,008
II	не получены удовлетворительные модели no satisfactory models have been obtained					
III	IL-1ra	0,813	21002,5	86	71	0,009
	НД (LD)	0,735	22,5	71,4	71,4	0,044
ИВПА на продукцию цитокинов IPAЕ on the production of cytokines						
I	IL-17	0,727	1,65	66,7	70,3	0,019
II	не получены удовлетворительные модели no satisfactory models have been obtained					
III	VEGF	0,767	0,85	71,4	71,4	0,025

Примечание. Группа I – люминальный А, группа II – люминальный В, группа III – нелюминальные молекулярные подтипы; при оценке площади под кривой учитывалось: AUC = 1,0-0,9 – отличное, 0,9-0,8 – очень хорошее, 0,8-0,7 – хорошее, 0,7-0,6 – среднее, 0,6-0,5 – неудовлетворительное качество модели.

Note. Group I, luminal A; group II, luminal B; group III, non-luminal molecular subtypes; when assessing the area under the curve, the following were taken into account: AUC = 1.0-0.9, excellent; 0.9-0.8, very good; 0.8-0.7, good; 0.7-0.6, average; 0.6-0.5, unsatisfactory quality of the model.

Установлено, что наиболее качественные модели, характеризующие отличие образцов ИКНТ пациентов группы I формируются при использовании в качестве параметров сравнения спонтанной продукции IL-10, G-CSF, MCP-1, стимулированной ПА продукции IL-10 и ИВПА IL-17 (табл. 2, рис. 1А). При оценке этих показателей получены модели хорошего качества (AUC > 0,7).

Величины AUC для концентрации IL-1ra, стимулированной ПА продукции IL-1ra и ИВПА на продукцию VEGF-А в группе III составили 0,837; 0,813 и 0,767 соответственно, что свидетельствует об очень хорошем (AUC > 0,8) или хорошем (AUC > 0,7) качестве моделей (табл. 2, рис. 1Б).

Величины AUC для относительного содержания НД клеток в биоптатах пациентов, относя-

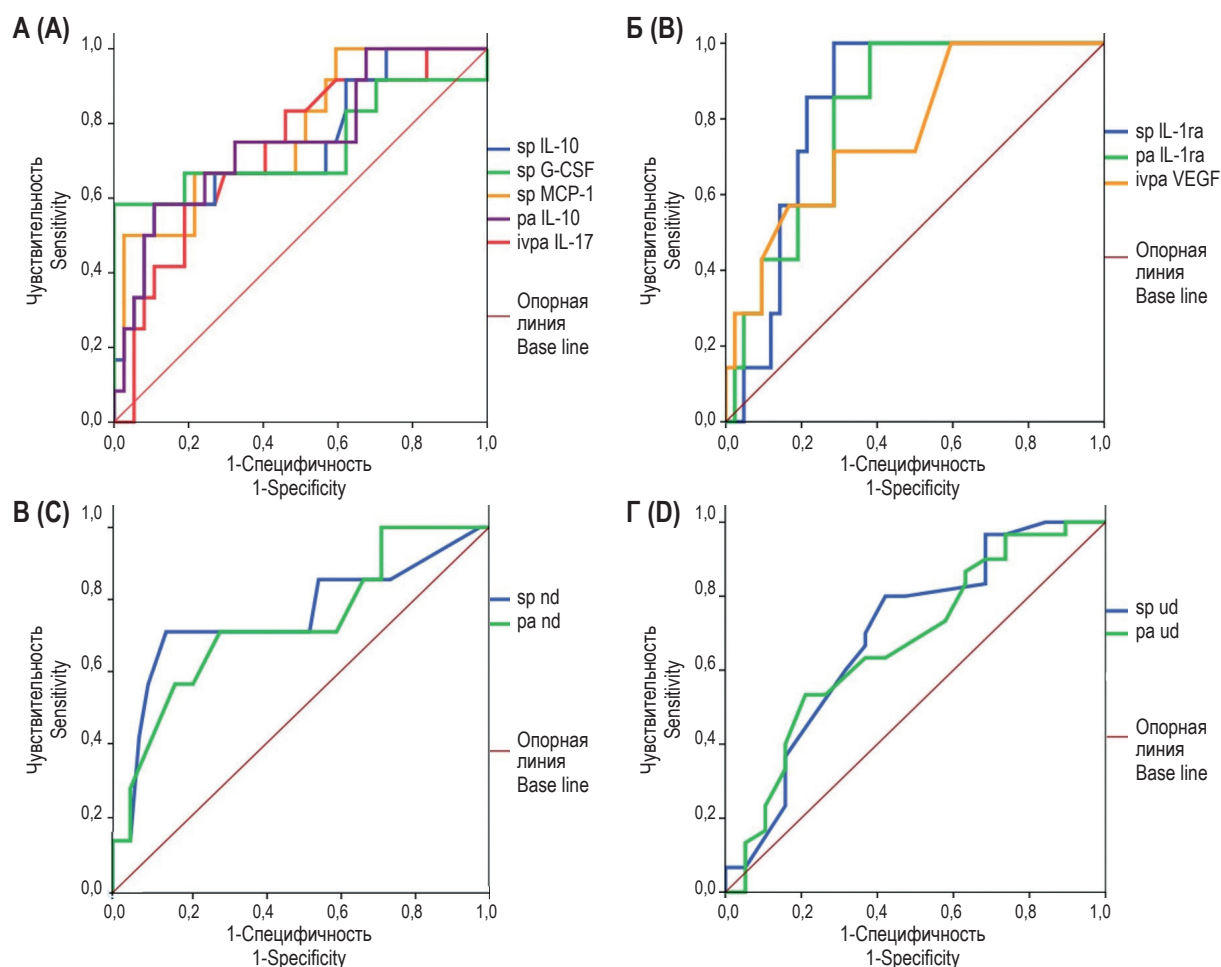


Рисунок 1. ROC-кривые, характеризующие качество ROC-моделей в группах в зависимости от принадлежности к молекулярно-генетическим подтипам РМЖ

Примечание. sp – спонтанная продукция цитокинов; pa – продукция цитокинов после воздействия ПА; ivpa – индекс влияния поликлонального активатора; sp nd – % НД в биоптатах только с питательной средой; sp ud – % УД в биоптатах только с питательной средой; pa nd – % НД в биоптатах с ПА; pa ud – % УД в биоптатах с ПА; А – группа I, Б – группа III, В – группа III, Г – группа II.

Figure 1. ROC-curves characterizing the quality of ROC models in groups according to the molecular-genetic subtype of breast cancer

Note. sp, spontaneous production of cytokines; pa, production of cytokines after exposure to PA; ivpa, index of the polyclonic activators effect; sp nd, % LD in biotates with nutrient medium only; sp ud, % MD in biotates with nutrient medium only; pa nd, % LD in biotates with PA; pa ud, % MD in biotates with PA. A, group I; B, group III; C, group III; D, group II.

щихся к группе III, как инкубированных только в питательной среде, так и в среде с добавлением ПА, составили 0,775 и 0,735, что также соответствует хорошему качеству моделей (табл. 2, рис. 1В). В то же время величина AUC для относительного содержания УД клеток в биоптатах пациентов, относящихся к люминальному В-подтипу, соответствовала удовлетворительному качеству модели и составила 0,695, что приближало ее к хорошему качеству (табл. 2, рис. 1Г).

Обсуждение

Исследование показало, что при всех полученных данных наиболее значимыми явились показатели ИВПА на продукцию биоптатами ци-

токинов, так как этот показатель является наиболее точным, потому что при всех вариантах исследования позволяет избежать ошибки за счет одинаковых размеров биоптата каждого пациента и условий их инкубирования, благодаря чему мы можем представить персонифицированные сведения по каждому пациенту, в частности по двум цитокинам: IL-10 и VEGF-A. ИВПА на продукцию IL-10 при люминальном подтипе А отражает повышенный резерв IL-10, который, несмотря на неоднозначность функции [5, 12], при люминальном подтипе А оказывает противовоспалительный эффект и препятствует ангиогенезу, не исключено, что именно этим обусловлена более редкая встречаемость гематогенного ме-

тастазирования при этом подтипе [13]. Анализируя ИВПА на продукцию VEGF-A при нелюминальном подтипе, выявлено его достоверное повышение по сравнению с другими группами, что свидетельствует о высоком резерве продукции этого цитокина, отвечающего за ангиогенез, а, следовательно, и прогрессирование процесса, инвазивность, метастазирование и худший прогноз [6, 5, 19].

Заключение

Таким образом, основываясь на полученных нами данных, можно сделать вывод о том, что цитокинпродуцирующий резерв сопряжен с точной дифференцировкой, которая в свою очередь зависит от молекулярно-генетического подтипа опухоли.

Список литературы / References

1. Аутеншлюс А.И., Архипов С.А., Михайлова Е.С., Архипова В.В., Вараксин Н.А. Сопряженность цитокинового профиля супернатанта инвазивной карциномы молочной железы с ее молекулярными и гистопатологическими характеристиками // Сибирский онкологический журнал, 2023. Т. 22, № 6. С. 92-102. [Autenshlyus A.I., Arkhipov S.A., Mikhaylova E.S., Arkhipova V.V., Varaksin N.A. Relationship between the cytokine profile of supernatants of invasive breast carcinoma and its molecular and histopathological characteristics. *Sibirskiy onkologicheskii zhurnal = Siberian Journal of Oncology*, 2023, Vol. 22, no. 6, pp. 92-102. (In Russ.)]
2. Архипов С.А., Михайлова Е.С., Кунц Т.А., Карпукхина К.В., Могильная Е.Д., Соловьев К.А., Вараксин Н.А., Аутеншлюс А.И. Цитокинпродуцирующий резерв иммунокомпетентных клеток крови и инвазивного протокового рака молочной железы, его взаимосвязь с патогистологическими и иммуногистохимическими параметрами злокачественного новообразования // Медицинская иммунология, 2016. Т. 1, № 5. С. 459-468. [Arkhipov S.A., Mikhaylova E.S., Kunts T.A., Karpukhina K.V., Mogilnaya E.D., Solovyev K.A., Varaksin N.A., Autenshlyus A.I. Cytokine-producing reserve of immunocompetent cells from blood and invasive ductal breast cancer tissues: its correlation with histopathological and immunohistochemical parameters of malignant neoplasia. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2016, Vol. 1, no. 5, pp. 459-468. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2016-5-459-468.
3. Пауков В.С. Клиническая патология. М.: Литтерра, 2018. 768 с. [Paukov V.S. Clinical pathology]. Moscow: Litterra, 2018. 768 p.
4. Поспехова Н.И., Головина Д.А., Филиппова М.Г., Семьянихина А.В., Дранко С.Л., Данишевич А.М., Строганова А.М. Молекулярно-биологические подтипы рака молочной железы у носителей мутаций в гене BRCA1 // Успехи молекулярной онкологии, 2020. Т. 7, № 4. С. 29-36. [Pospekhova N.I., Golovina D.A., Filippova M.G., Semyanikhina A.V., Dranko S.L., Danishevich A.M., Stroganova A.M. Molecular biological subtypes of breast cancer in brca1 mutation carriers. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology*, 2020, Vol. 7, no. 4, pp. 29-36. (In Russ.)]
5. Соснина А.В., Великая Н.В., Вараксин Н.А., Гришаев М.П., Аутеншлюс А.И. Роль цитокинов в патогенезе злокачественных новообразований. Новосибирск: Офсет, 2014. 128 с. [Sosnina A.V., Velikaya N.V., Varaksin N.A., Grishaev M.P., Autenshlyus A.I. The role of cytokines in the pathogenesis of malignant neoplasms]. Novosibirsk: Ofset, 2014. 128 p.
6. Al Kawas H., Saaid I., Jank P., Westhoff C.C., Denkert C., Pross T., Weiler K.B.S., Karsten M.M. How VEGF-A and its splice variants affect breast cancer development – clinical implications. *Cell. Oncol. (Dordr.)*, 2022, Vol. 45, no. 2, pp. 227-239.
7. Abelev G.I. Differentiation mechanisms and malignancy. *Biochemistry (Mosc.)*, 2000, Vol. 65, no. 1, pp. 107-116.
8. Autenshlyus A., Arkhipov S., Mikhaylova E., Marinkin I., Arkhipova V., Mogilnaya E., Varaksin N., Rukavishnikov M. Cytokine production in mammary adenocarcinoma and its microenvironmental cells in patients with or without metastases in regional lymph nodes. *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.*, 2017, Vol. 30, no. 3, pp. 308-314.
9. Faria S.S., Costantini S., de Lima V.C.C., de Andrade V.P., Rialland M., Cedric R., Budillon A., Magalhães K.G. NLRP3 inflammasome-mediated cytokine production and pyroptosis cell death in breast cancer. *J. Biomed. Sci.*, 2021, Vol. 28, no. 1, 26. doi: 10.1186/s12929-021-00724-8.
10. Felcher C.M., Bogni E.S., Kordon E.C. IL-6 Cytokine Family: A putative target for breast cancer prevention and treatment. *Int. J. Mol. Sci.*, 2022, Vol. 23, no. 3, 1809. doi: 10.3390/ijms23031809.
11. Habanjar O., Bingula R., Decombat C., Diab-Assaf M., Caldefie-Chezet F., Delort L. Crosstalk of Inflammatory Cytokines within the Breast Tumor Microenvironment. *Int. J. Mol. Sci.*, 2023, Vol. 24, no. 4, 4002. doi: 10.3390/ijms24044002.
12. Hamidullah, Changkija B., Konwar R. Role of interleukin-10 in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*, 2012, Vol. 133, no. 1, pp. 11-21.
13. Holm-Rasmussen E.V., Jensen M.B., Balslev E., Kroman N., Tvedskov T.F. Reduced risk of axillary lymphatic spread in triple-negative breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.*, 2015, Vol. 149, no. 1, pp. 229-236.
14. Liu L., Wu Y., Zhang C., Zhou C., Li Y., Zeng Y., Zhang C., Li R., Luo D., Wang L., Zhang L., Tu S., Deng H., Luo S., Chen Y.G., Xiong X., Yan X. Cancer-associated adipocyte-derived G-CSF promotes breast cancer malignancy via Stat3 signaling. *J. Mol. Cell Biol.*, 2020, Vol. 12, no. 9, pp. 723-737.
15. Mesa-Eguizaray I., Wild S.H., Rosenberg P.S., Bird S.M., Brewster D.H., Hall P.S., Cameron D.A., Morrison D., Figueroa J.D. Distinct temporal trends in breast cancer incidence from 1997 to 2016 by molecular subtypes: a population-based study of Scottish cancer registry data. *Br. J. Cancer*, 2020, Vol. 123, no. 5, pp. 852-859.
16. Mouchemore K.A., Anderson R.L., Hamilton J.A. Neutrophils, G-CSF and their contribution to breast cancer metastasis. *FEBS J.*, 2018, Vol. 285, no. 4, pp. 665-679.

17. Nielsen T.O., Jensen M.B., Burugu S., Gao D., Jørgensen C.L., Balslev E., Ejlersen B. High-risk premenopausal luminal a breast cancer patients derive no benefit from adjuvant cyclophosphamide-based chemotherapy: results from the DBCG77B Clinical Trial. *Clin. Cancer Res.*, 2017, Vol. 23, no. 4, pp. 946-953.
18. Rakha E.A., Reis-Filho J.S., Baehner F., Dabbs D.J., Decker T., Eusebi V., Fox S.B., Ichihara S., Jacquemier J., Lakhani S.R., Palacios J., Richardson A.L., Schnitt S.J., Schmitt F.C., Tan P.H., Tse G.M., Badve S., Ellis I.O. Breast cancer prognostic classification in the molecular era: the role of histological grade. *Breast Cancer Res.*, 2010, Vol. 12, no. 4, 207. doi: 10.1186/bcr2607.
19. Smolanka I.I., Bagmut I.Y., Movchan O.V., Sheremet M.I., Bilyi O.M., Lyashenko A.O., Dosenko I.V., Loboda A.D., Ivankova O.M., Kolisnyk I.L. Features of VEGF and IL-6 expression in patients with inflammatory breast cancer considering molecular-biological characteristics. *J. Med. Life*, 2023, Vol. 16, no. 1, pp. 153-159.
20. Sørli T., Perou C.M., Tibshirani R., Aas T., Geisler S., Johnsen H., Hastie T., Eisen M.B., van de Rijn M., Jeffrey S.S., Thorsen T., Quist H., Matese J.C., Brown P.O., Botstein D., Lønning P.E., Børresen-Dale A.L. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 2001, Vol. 98, no. 19, pp. 10869-10874.
21. Tan C., Hu W., He Y., Zhang Y., Zhang G., Xu Y., Tang J. Cytokine-mediated therapeutic resistance in breast cancer. *Cytokine*, 2018, Vol. 108, pp. 151-159.
22. World Medical Association. World Medical Association Declaration of Helsinki: ethical principles for medical research involving human subjects. *JAMA*, 2013, Vol. 310, no. 20, pp. 2191-2194.
23. Yan R., Ren F., Li J., Rao X., Lv Z., Zheng C., Zhang F. Nuclei-Guided Network for Breast Cancer Grading in HE-Stained Pathological Images. *Sensors (Basel)*, 2022, Vol. 22, no. 11, 4061. doi: 10.3390/s22114061.

Авторы:

Мангазеева Е.Д. — младший научный сотрудник центральной научно-исследовательской лаборатории ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет», г. Новосибирск, Россия

Студеникина А.А. — к.м.н., научный сотрудник центральной научно-исследовательской лаборатории ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет»; научный сотрудник, Научно-исследовательский институт молекулярной биологии и биофизики ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины», г. Новосибирск, Россия

Рыжикова С.Л. — начальник лаборатории АО «Вектор-Бест», г. Новосибирск, Россия

Аутеншлюс А.И. — д.б.н., профессор, заведующий центральной научно-исследовательской лабораторией ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет»; главный научный сотрудник, Научно-исследовательский институт молекулярной биологии и биофизики ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины», г. Новосибирск, Россия

Authors:

Mangazeeva E.D., Research Associate, Central Research Laboratory, Novosibirsk State Medical University, Novosibirsk, Russian Federation

Studenikina A.A., PhD (Medicine), Research Associate, Central Research Laboratory, Novosibirsk State Medical University; Research Associate, Institute of Molecular Biology and Biophysics, Federal Research Center of Fundamental and Translational Medicine, Novosibirsk, Russian Federation

Ryzhikova S.L., Head of Laboratory, Vector-Best JSC, Novosibirsk, Russian Federation

Autenshlyus A.I., PhD, MD (Biology), Professor, Head, Central Research Laboratory, Novosibirsk State Medical University; Chief Research Associate, Institute of Molecular Biology and Biophysics, Federal Research Center of Fundamental and Translational Medicine, Novosibirsk, Russian Federation

Поступила 11.04.2024
Отправлена на доработку 29.05.2024
Принята к печати 14.09.2024

Received 11.04.2024
Revision received 29.05.2024
Accepted 14.09.2024

ВЛИЯНИЕ МНОГОЭТАПНОЙ ИЗОЛЯЦИИ НЕЙТРОФИЛОВ НА ИХ КОЛИЧЕСТВО И ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ

Швыдченко И.Н.^{1, 2}, Быковская Е.Ю.³, Голубцов В.В.²

¹ ФГБОУ ВО «Кубанский государственный университет физической культуры, спорта и туризма»,

г. Краснодар, Россия

² ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ,

г. Краснодар, Россия

³ ГБУЗ «Детская краевая клиническая больница» Министерства здравоохранения Краснодарского края,

г. Краснодар, Россия

Резюме. Несмотря на множество разнообразных методов выделения нейтрофилов из периферической крови, сохраняется актуальной проблема получения достаточного количества жизнеспособной клеточной популяции высокой степени чистоты для количественного определения нейтрофильных цитокинов и экспрессии их мРНК. Рекомендуемые многоэтапные способы очистки нейтрофилов значительно увеличивают по времени продолжительность процесса выделения, могут приводить к активации или апоптозу клеток и сопровождаются их значительными потерями. Наиболее критичным по продолжительности и количеству дополнительных разнообразных манипуляций с клетками является этап предварительной очистки нейтрофилов. В связи с этим актуальным вопросом является сравнение различных методов предварительной изоляции нейтрофилов и выбор наиболее оптимального из них для получения достаточного количества жизнеспособных периферических нейтрофилов, что и явилось целью данной работы. Нами были изучены особенности влияния трех различных протоколов предварительного выделения клеточной взвеси (центрифугирование цельной крови на одинарном градиенте плотности с последующим осаждением эритроцитов декстраном; центрифугирование цельной крови на двойном градиенте плотности; быстрое выделение лейкоцитов с использованием реагента, способствующего агрегации эритроцитов) на количество и жизнеспособность нейтрофилов, очищенных на заключительном этапе с использованием негативной иммуномагнитной селекции. Установлено, что процедура предварительного выделения нейтрофилов для последующей иммуномагнитной изоляции влияет на их количество и жизнеспособность: максимальное количество жизнеспособных нейтрофилов получается при их выделении традиционным методом центрифугирования крови на градиенте плотности с последующим осаждением эритроцитов декстраном. В то же время исследуемые нами три разных метода предварительного выделения нейтрофилов не показали статистически значимых различий по количественному выходу жизнеспособных клеток после иммуномагнитной изоляции, что предполагает использование любого из этих методов в зависимости от возможностей и предпочтений исследователей. В целом наша работа подтверждает данные литературы о том, что многоступенчатый процесс изоляции нейтрофилов позволяет получить клеточную

Адрес для переписки:

Швыдченко Ирина Николаевна
ФГБОУ ВО «Кубанский государственный
университет физической культуры, спорта и туризма»
350015, Россия, г. Краснодар, ул. Буденного, 161.
Тел.: 8 (918) 456-74-63.
E-mail: irina27shv@gmail.com

Address for correspondence:

Irina N. Shvydchenko
Kuban State University of Education, Sport and Tourism
161 Budenny St
Krasnodar
350015 Russian Federation
Phone: +7 (918) 456-74-63.
E-mail: irina27shv@gmail.com

Образец цитирования:

И.Н. Швыдченко, Е.Ю. Быковская, В.В. Голубцов
«Влияние многоэтапной изоляции нейтрофилов
на их количество и жизнеспособность» // Медицинская
иммунология, 2025. Т. 27, № 1. С. 107-118.
doi: 10.15789/1563-0625-EOM-2948

© Швыдченко И.Н. и соавт., 2025
Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

I.N. Shvydchenko, E.Yu. Bykovskaya, V.V. Golubtsov "Effect
of multistage isolation of neutrophils on their counts and
viability", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya
Immunologiya, 2025, Vol. 27, no. 1, pp. 107-118.
doi: 10.15789/1563-0625-EOM-2948

© Shvydchenko I.N. et al., 2025
The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License
DOI: 10.15789/1563-0625-EOM-2948

взвесь высокой степени чистоты (> 99,1%), которую можно использовать в дальнейшем для исследования их цитокин-секретирующей активности. Однако такая многоступенчатая изоляция значительно снижает количество нейтрофилов, что может быть критичным при исходно малых объемах крови.

Ключевые слова: нейтрофилы, цитокин-секретирующая активность, изоляция, градиентное центрифугирование, иммуномагнитная селекция, декстран, гидроксипропилкрахмал

EFFECT OF MULTISTAGE ISOLATION OF NEUTROPHILS ON THEIR COUNTS AND VIABILITY

Shvydchenko I.N.^{a, b}, Bykovskaya E.Yu.^c, Golubtsov V.V.^b

^a Kuban State University of Education, Sport and Tourism, Krasnodar, Russian Federation

^b Kuban State Medical University, Krasnodar, Russian Federation

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

Abstract. Despite numerous separation methods of neutrophils from peripheral blood, isolation of sufficient quantities of high-purity viable cells for quantitative determination of neutrophil cytokines and their mRNA expression still remains an actual issue. The recommended multi-step purification methods significantly prolong the cell isolation process, potentially leading to cell activation or apoptosis and resulting in significant cell loss. Preliminary purification of neutrophils is the most critical stage in terms of time spent, and several additional manipulations with cells. To address this challenge, our study aimed to compare various methods of preliminary neutrophil isolation in order to select the optimal approach to obtaining a sufficient number of viable peripheral neutrophils.

We studied the effects of three different protocols for preliminary isolation of cell suspensions: (a) centrifugation of whole blood at a single-step density gradient followed by sedimentation of red blood cells with dextran; (b) centrifugation of whole blood on a double density gradient; (c) rapid isolation of leukocytes using a reagent that promotes red blood cell aggregation. The cell counts and viability of purified neutrophils were tested at the final stage using negative immunomagnetic selection. Our study has shown that the methods used for preliminary neutrophil isolation significantly affect both the number and viability of the cells. The highest number of viable neutrophils was obtained using a conventional method of blood centrifugation at a density gradient followed by dextran sedimentation of red blood cells. However, the three studied methods of preliminary neutrophil isolation did not show statistically significant differences with respect to quantitative yield of viable cells after immunomagnetic isolation. These findings suggest that any of these methods may be applied, depending on capabilities and preferences of the researchers. In summary, our findings confirm previous studies indicating that the multistep process of neutrophil isolation allows for obtaining a high-purity cell suspension (> 99.1%) which can be used in future studies of their cytokine-secreting activity. However, such multi-stage isolation significantly reduces the yield of neutrophils, thus being critical for studying of initially small blood volumes.

Keywords: neutrophils, cytokine-secreting activity, isolation, gradient centrifugation, immunomagnetic selection, dextran, hydroxyethyl starch

Работа была частично поддержана грантом РФФИ и Министерством образования и науки Краснодарского края, № 16-44-230391p_a.

Введение

Функционирование нейтрофилов, количественно преобладающей популяции лейкоцитов в острой фазе развития воспаления, имеет критическое значение в антибактериальной защите [9, 28, 33, 34]. Наряду с эфферентными функциями

нейтрофилы являются важным фактором регуляции врожденного и адаптивного иммунитета, благодаря своей способности синтезировать и секретировать широкий спектр цитокинов и хемокинов. Цитокин-продуцирующая активность нейтрофилов обеспечивает также их функциональное участие в различных физиологических и патологических процессах, таких как кроветворение, ангиогенез, тканевая репарация, аутоиммунные и опухолевые заболевания [11, 13, 17, 29, 30, 31, 32].

В настоящее время методология исследований цитокин-секретирующей функции нейтрофилов широко описана в научной литературе [43]. При этом сохраняется актуальной проблема стандартизации и валидации методов выделения жизнеспособной клеточной взвеси для количественного определения нейтрофильных цитокинов.

Изучение нейтрофилов периферической крови *ex vivo* всегда сталкивается с методологическими проблемами, обусловленными их физиологическими особенностями, такими как ограниченная продолжительность жизни и невозможность длительного культивирования *in vitro*, вследствие нахождения на терминально дифференцированной стадии клеточного развития [6, 42]. Кроме того, нейтрофилы являются чрезвычайно чувствительными клетками и активируются при воздействии практически любых физико-химических раздражителей и даже следовых количеств таких агентов, как липополисахарид (ЛПС). В связи с этим процесс выделения нейтрофилов из периферической крови должен быть по возможности очень быстрым и проходить с тщательно подобранными условиями (апиrogenная посуда и реагенты, полипропиленовые пробирки, физиологическое рН среды и отсутствие двухвалентных катионов, температура, параметры центрифугирования и пр.) для исключения искусственной активации и/или апоптоза клеток [7, 21, 24, 26].

Кроме ограниченной жизнеспособности и потенциальной возможности активации и/или апоптоза нейтрофилов в процессе выделения при изучении механизмов нейтрофильной секреции цитокинов и экспрессии их мРНК перед исследователями встает еще одна не менее важная проблема, связанная с чистотой выделенной нейтрофильной взвеси. Данная проблема обусловлена тем, что нейтрофилы человека содержат в 10–20 раз меньше общей РНК, чем другие лейкоциты [44], и, соответственно, в пересчете на одну клетку обычно секретируют чрезвычайно мало цитокинов, в отличие от основных продуцентов — моноцитов/макрофагов, лимфоцитов или дендритных клеток [46, 50]. Установлено, что 1% мононуклеарных клеток в нейтрофильной взвеси дает 30% контаминирующей РНК [44]. Исключения составляют такие цитокины, как антагонист рецептора интерлейкина 1 (interleukin-1 receptor antagonist, IL-1ra), В-клеточный активирующий фактор (B-cell activating factor, BAFF), фактор роста эндотелия сосудов (vascular endothelial growth factor, VEGF), и хемокиновые (C-C) лиганды 19 и 23 (chemokine (C-C motif) ligand, CCL19, CCL23), секреция которых нейтрофилами может быть довольно значительной [4, 38, 39, 40]. В связи с этим показано, что для правильной и надежной количественной оценки профилей продуциру-

емых цитокинов, или генов, экспрессируемых нейтрофилами в состоянии покоя или при их активации, обязательна работа с клеточными популяциями чрезвычайно высокой чистоты [12, 43].

Самым первым и наиболее распространенным из известных методов выделения нейтрофилов является метод, предложенный в 1968 г. Boyum A. и соавт. [10], который был в последующем модифицирован Ferrante A. и Thong Y.H. (1980) [16]. Процедура состоит из наложения цельной крови на среду с градиентом плотности раствора полисахарида, центрифугирования, отделения слоя нейтрофилов от эритроцитов при помощи декстрановой седиментации и лизиса остаточных эритроцитов. Принцип данного метода лежит в основе разнообразных последующих модификаций, включающих, в том числе использование двойного градиента плотности для более быстрого и чистого отделения нейтрофилов [1, 2, 3, 14, 18]. Одностадийное центрифугирование цельной крови на градиенте плотности с использованием коммерчески доступных сред, таких как Фиколл-Пак (Ficoll-Paque) или Полиморфпреп (Polymorphprep), представляющих собой смесь метризоата натрия и декстрана, позволяет получить нейтрофилы с чистотой клеточной взвеси приблизительно 94–98% [15, 27, 35]. Достаточно низкий процент (2–6%) контаминирующих клеток, присутствующих в суспензиях нейтрофилов после использования методов изоляции на градиенте плотности, часто считается приемлемым уровнем загрязнения для большинства исследований, связанных с изучением их реактивности. В то же время данный уровень загрязнения представляет собой потенциальную проблему при количественном изучении цитокин-секретирующей функции нейтрофилов с использованием иммуноферментного анализа (ИФА) и таких высокотехнологических методов, как количественная полимеразная цепная реакция (ПЦР) или секвенирование РНК (RNA-Seq).

Основными контаминирующими клетками в нейтрофильной взвеси, выделенной с помощью градиентного центрифугирования, являются эозинофилы и лимфоциты, в меньшей степени — моноциты и другие гранулоциты [25, 47]. Уровень лейкоцитарной контаминации, кроме того, зависит от донора и часто также от технических навыков исследователя. Показано, что процент контаминирующих клеток в препаратах нейтрофилов, выделенных с использованием Polymorphprep, может варьировать от 1% до 17% в отдельных образцах крови здоровых людей [15].

Современные методы иммуномагнитной изоляции с использованием магнитных наночастиц, связанных с моноклональными антителами к нейтрофильным маркерам (позитивная иммуно-

магнитная селекция), или антителами к маркерам контаминирующих лейкоцитов (негативная иммуномагнитная селекция) позволяют быстро получать обогащенную нейтрофильную клеточную взвесь высокой степени чистоты [6, 25, 26]. В настоящее время использование негативной иммуномагнитной селекции нейтрофилов является общепризнанным подходом при проведении исследований, связанных с изучением нейтрофильной секреции цитокинов и экспрессии их мРНК [12, 43, 44, 45]. Различные коммерческие одноэтапные наборы, предназначенные для быстрой иммуномагнитной изоляции периферических нейтрофилов, в своих технических описаниях указывают чистоту нейтрофильной взвеси в диапазоне 98-99%. Однако даже такая чистота клеточной взвеси не всегда гарантирует отсутствие ложноположительных результатов. Так, анализируя экспрессию мРНК и продукцию цитокинов в ответ на R848 (синтетический имитатор вирусной одноцепочечной РНК, распознаваемой Toll-подобным рецептором (TLR) 8) нейтрофилами, выделенными с использованием метода одноэтапной иммуномагнитной очистки, F. Calzetti и соавт. (2017) получили много ложноположительных результатов, наиболее значимыми из которых являются продукция IL-10 и экспрессия IL-6 мРНК, источником которых, как выяснили авторы, оказались не нейтрофилы, а контаминирующие $\text{slan}^+\text{CD16}^+$ моноциты, присутствующие в клеточной взвеси в очень малом количестве (0,1%-0,6%) [12].

Значительную роль в «вопросе нейтрофильной контаминации» при оценке цитокин-секретирующей функции нейтрофилов играют стимулирующие условия. Показано, что процесс одноэтапной быстрой иммуномагнитной очистки оказывается вполне достаточным в отношении аккумуляции и продукции мРНК IL-8 или экспрессии мРНК фактора некроза опухоли альфа (tumor necrosis factor α , TNF α) при инкубации нейтрофилов с TNF α . А наиболее строгие требования к чистоте клеточной взвеси предъявляются при стимуляции нейтрофильных популяций агонистами TLRs [43]. В связи с этим в таких экспериментах настоятельно рекомендуется многоэтапная очистка нейтрофилов с предварительным выделением нейтрофильной взвеси на градиенте плотности и последующим этапом иммуномагнитной изоляции [12, 43].

Критическим моментом многоступенчатой очистки является появление дополнительных разнообразных манипуляций с клетками, что увеличивает по времени продолжительность процесса выделения и может влиять на жизнеспособность нейтрофилов и их активационный статус, приводя в итоге к значительной потере клеток.

В связи с этим актуальным вопросом является сравнение различных методов предварительной изоляции нейтрофилов и выбор наиболее оптимального из них для получения достаточного количества жизнеспособных периферических нейтрофилов, что и явилось целью данной работы.

Материалы и методы

Примечание: нейтрофилы были выделены из венозной крови здоровых доноров. Доноров крови невозможно было идентифицировать, не было никакого взаимодействия с живыми людьми или знания идентифицируемой личной информации.

Донорская кровь в вакуумных одноразовых пробирках с ЭДТА доставлялась в лабораторию не позднее 2-3 часов после ее забора. Процедуры по изоляции нейтрофилов проводили с использованием стерильных растворов, посуды и расходных материалов, полипропиленовых пробирок. Перед проведением негативной иммуномагнитной селекции обогащенную нейтрофилами клеточную взвесь выделяли из цельной крови, используя три различных протокола, а именно: 1) центрифугирование цельной крови на одинарном градиенте плотности (1,077 г/мл) с последующим осаждением эритроцитов декстраном — NeuG1/D; 2) центрифугирование цельной крови на двойном градиенте плотности (1,119/1,077 г/мл) — NeuG2; 3) быстрое выделение лейкоцитов с использованием реагента, способствующего агрегации эритроцитов, HetaSep (StemCell Technologies, Канада, #07906) — NeuHS.

1) Выделение нейтрофилов центрифугированием цельной крови на одинарном градиенте плотности (1,077 г/мл) с последующим осаждением эритроцитов декстраном (NeuG1/D), проводили с использованием модифицированного протокола, любезно предоставленного д-ром Federica Calzetti (Университет Вероны, Верона, Италия). Венозную кровь, предварительно разбавленную фосфатно-солевым раствором Дульбекко (DPBS, Gibco, #14190169) в соотношении 4 части крови к 1 части DPBS, наслаивали на Гистопак-1077 (Histopaque-1077, Sigma-Aldrich, США, #10771) в соотношении 4:3. Центрифугировали при 400 × g 30 мин при комнатной температуре. После удаления слоя мононуклеарных клеток собирали нейтрофилы, лежащие на поверхности эритроцитов, в пробирку, содержащую 5 мл DPBS. Клетки осаждали центрифугированием при 250 × g 5 мин при комнатной температуре, удаляли супернатант. Добавляли к осадку 8 мл DPBS и 2 мл 4%-ного раствора декстрана 500 (Sigma-Aldrich, США, #31392) в DPBS. Осторожно перемешивали переворачиванием пробирки и оставляли клеточную взвесь на 20-30 мин при комнатной температуре для седиментации эри-

троцитов. Обогащенный гранулоцитами супернатант переносили в новую пробирку и осаждали центрифугированием при $250 \times g$ 5 мин при комнатной температуре. Контаминирующие эритроциты удаляли осмотическим лизисом: клеточный осадок ресуспендировали в 1,5 мл 0,2% NaCl; осторожно перемешивали не более 50–60 сек, затем добавляли 4,5 мл 1,2% NaCl (растворы NaCl готовили из 5M NaCl Sigma, США, #s6316) и DPBS до 12 мл, центрифугировали при $250 \times g$ 5 мин при комнатной температуре и удаляли супернатант. При необходимости процедуру повторяли. Ресуспендировали клеточный осадок в 1 мл среды DPBS с 2% эмбриональной телячьей сывороткой (2%FCS) (StemCell Technologies, Канада, #07905) и 2мМ EDTA (Sigma-Aldrich, США, #ED2P).

2) Выделение нейтрофилов (гранулоцитов) центрифугированием цельной крови на двойном градиенте плотности (NeuG2) проводили согласно инструкции к Гистопак-1119 (Histopaque-1119, Sigma-Aldrich, США, #11191). В пробирку в соотношении 1:1:2 последовательно наслаивали Гистопак-1119, Гистопак-1077 и венозную кровь, предварительно разбавленную DPBS (1:1). Центрифугировали 40 мин при $400 \times g$ при комнатной температуре. После удаления слоя мононуклеарных клеток, на границе между двумя градиентами плотности собирали нейтрофильное «кольцо» в пробирку, содержащую 5 мл DPBS. Клетки осаждали центрифугированием при $250 \times g$ 5 мин при комнатной температуре, удаляли супернатант, повторно отмывали в 5 мл DPBS с последующим центрифугированием и удалением супернатанта. При неполном осаждении эритроцитов, проводили их удаление при помощи осмотического лизиса, аналогично способу, описанному выше. Ресуспендировали клеточный осадок в среде DPBS + 2%FCS + 2мМ EDTA.

3) Быстрое выделение лейкоцитов с использованием HetaSep (NeuHS). Данный метод рекомендуется производителями набора для негативной иммуномагнитной селекции нейтрофилов (StemCell Technologies, Канада). HetaSep содержит 6%-ный раствор гидроксиэтилкрахмала (ГЭК), стимулирующий агрегацию эритроцитов, и используется для быстрого отделения ядросодержащих клеток от эритроцитов в цельной крови. Согласно инструкции производителя, добавляли 2 мл HetaSep к 10 мл цельной крови (1:5) в 15-мл полипропиленовую пробирку и хорошо перемешивали. Центрифугировали при $110 \times g$ 6 мин при комнатной температуре. Оставляли на 10–15 мин для дальнейшего осаждения эритроцитов. Удаляли обогащенный лейкоцитами слой плазмы (приблизительно 40% объема) в другую пробирку и промывали, добавляя 4 части DPBS

на 1 часть плазмы с клетками. Центрифугировали при $500 \times g$ 10 мин при комнатной температуре. Удаляли супернатант, отмывали клетки для удаления тромбоцитов, добавляя 5 мл DPBS и центрифугируя при $120 \times g$ 10 мин при комнатной температуре. После удаления надосадочной жидкости остаточные эритроциты удаляли осмотическим лизисом, аналогично способу, описанному в первом протоколе. Ресуспендировали клеточный осадок в среде DPBS + 2%FCS + 2мМ EDTA.

Клеточная взвесь, выделенная одним из указанных выше способов, на следующем этапе подвергалась негативной иммуномагнитной селекции, которую проводили в соответствии с инструкцией производителя, используя набор для обогащения нейтрофилов человека EasySep Human Neutrophil Enrichment Kit (StemCell Technologies, Канада, #19257) и магнит PURPLE EASYSEP® MAGNET (StemCell Technologies, Канада, #18000). Набор содержит покрытые декстраном магнитные наночастицы и комбинацию моноклональных антител к поверхностным антигенам клеток крови человека (CD2, CD3, CD9, CD19, CD36, CD56, гликофорин А), биспецифичных к декстрану, что позволяет обеспечить «сшивку» контаминирующих клеток с магнитными наночастицами и их последующее «прилипание» к стенкам пробирки, помещенной в магнит. Очищенная таким образом от контаминирующих клеток нейтрофильная взвесь переносится в чистую пробирку.

Подсчет выделенных нейтрофилов с одновременной оценкой их жизнеспособности методом эксклюзии трипанового синего на автоматическом анализаторе клеток TC20 (Bio-Rad, США) осуществляли до и после иммуномагнитной изоляции. Количество клеток пересчитывали на 1 мл цельной крови, используемой для выделения нейтрофилов.

Чистоту клеточной взвеси после многоэтапного выделения оценивали с помощью FACS-окрашивания клеток на проточном цитофлюориметре BD FACSCanto II с флуоресцентно конъюгированными антителами к CD66b (BD Biosciences, США, #560995) и CD16 (BD Biosciences, США, #561927).

Статистический анализ полученных результатов проводился с использованием пакета прикладных программ Statistica 7.0 (StatSoft Inc., США). В связи с отсутствием нормального распределения данных в соответствии с критерием Шапиро–Уилка, центральные тенденции и дисперсии количественных признаков описывали медианой (Me) и интерквартильным интервалом (25-й и 75-й процентиля, $Q_{0,25}$ и $Q_{0,75}$). Сравнение групп по количественным признакам проводили с использованием непараметрических критериев

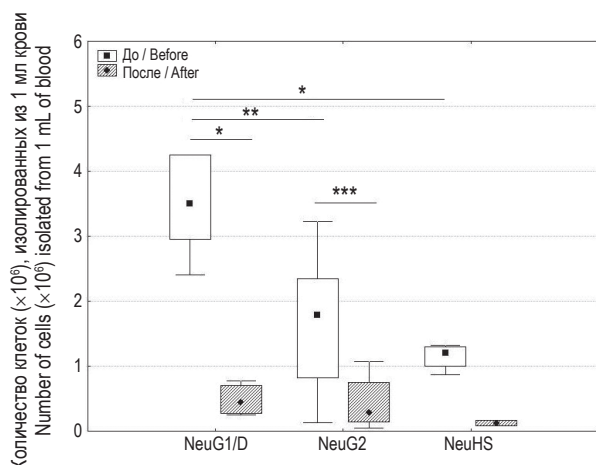


Рисунок 1. Количество нейтрофилов до и после отрицательной иммуномагнитной селекции в зависимости от разных методов предварительной изоляции клеточной взвеси

Примечание. Данные представлены в виде медианы и интерквартильного интервала. NeuG1/D – нейтрофилы, выделенные центрифугированием цельной крови на одинарном градиенте плотности с последующим осаждением эритроцитов декстраном; NeuG2 – нейтрофилы, выделенные центрифугированием цельной крови на двойном градиенте плотности; NeuHS – нейтрофилы (лейкоциты), выделенные с использованием HetaSep.

Figure 1. Number of neutrophils before and after negative immunomagnetic selection depending on different methods of preliminary isolation of cell suspension

Note. Data are presented as median and interquartile range. NeuG1/D, neutrophils isolated by centrifugation of whole blood on a single density gradient followed by sedimentation of red blood cells with dextran; NeuG2, neutrophils isolated by centrifugation of whole blood on a double density gradient; NeuHS, neutrophils (leukocytes) isolated using HetaSep.

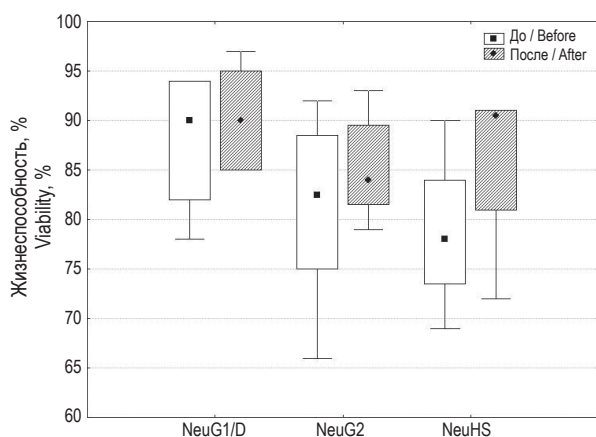


Рисунок 2. Жизнеспособность нейтрофилов до и после отрицательной иммуномагнитной селекции в зависимости от разных методов предварительной изоляции клеточной взвеси

Примечание. См. примечание к рисунку 1.

Figure 2. Viability of neutrophils before and after negative immunomagnetic selection depending on different methods of preliminary isolation of cell suspension

Note. As for Figure 1.

Краскела–Уоллиса для множественных сравнений и Манна–Уитни для сравнения независимых переменных попарно. Непараметрический критерий Вилкоксона использовали для сравнения связанных выборок (до и после иммуномагнитной изоляции). Наблюдаемые различия считались не случайными при $p < 0,05$.

Результаты

В первой серии экспериментов на большом количестве образцов крови была проведена сравнительная оценка влияния трех различных протоколов предварительной изоляции нейтрофилов на их количество и жизнеспособность. Анализ полученных результатов показал, что максимальное количество нейтрофилов получается при их выделении методом центрифугирования крови на градиенте плотности с последующим осаждением эритроцитов декстраном (NeuG1/D). Количество нейтрофилов NeuG1/D превышало в 2,07 раза ($p < 0,05$) количество клеток, выделенных с использованием двойного градиента плотности (NeuG2), и в 2,67 раза ($p < 0,05$) – с применением HetaSep (NeuHS). Кроме того, нейтрофилы NeuG1/D имели повышенную жизнеспособность (все $p < 0,05$) по сравнению с нейтрофилами NeuG2 и NeuHS (табл. 1).

Во второй серии экспериментов мы оценивали влияние исследуемых протоколов предварительного выделения нейтрофилов на их количество и жизнеспособность до и после проведения последующей иммуномагнитной изоляции. Аналогично первой серии экспериментов максимальное количество нейтрофилов на предварительном этапе очистки было получено при их выделении с использованием протокола центрифугирования крови на градиенте плотности с последующим осаждением эритроцитов декстраном: количество нейтрофилов NeuG1/D превышало в 1,96 раза ($p < 0,05$) количество нейтрофилов NeuG2, выделенных на двойном градиенте плотности, и в 2,92 раза ($p < 0,05$) – количество клеток NeuHS, выделенных при помощи HetaSep (табл. 2). После проведения иммуномагнитной изоляции количество нейтрофилов во всех трех исследуемых группах значительно уменьшилось: NeuG1/D – в 7,8 раза ($p < 0,05$), NeuG2 – в 6,7 раза ($p < 0,05$), NeuHS – в 10 раз ($p = 0,0679$). Несмотря на то, что количество нейтрофилов, выделенных на предварительном этапе с использованием первого протокола (с декстраном), после иммуномагнитной очистки также существенно превышало количество нейтрофилов, изолированных двумя другими методами, статистически значимые различия между группами по данному параметру отсутствовали (табл. 2, рис. 1).

ТАБЛИЦА 1. ВЛИЯНИЕ РАЗНЫХ МЕТОДОВ ПРЕДВАРИТЕЛЬНОЙ ИЗОЛЯЦИИ НЕЙТРОФИЛОВ НА ИХ КОЛИЧЕСТВО И ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ, Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)

TABLE 1. EFFECT OF DIFFERENT METHODS OF PRELIMINARY ISOLATION OF NEUTROPHILS ON THEIR NUMBER AND VIABILITY, Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)

Показатель Indicator	NeuG1/D n = 18 (1)	NeuG2 n = 59 (2)	NeuHS n = 7 (3)	p (Kruskal- Wallis ANOVA)	p (Mann-Whitney U Test)		
					1 ↔ 2	1 ↔ 3	2 ↔ 3
Количество клеток, выделенных из 1 мл крови ($\times 10^6$) Number of cells isolated from 1 mL of blood ($\times 10^6$)	2,75 (2,08- 3,20)	1,33 (1,05- 1,83)	1,03 (0,83- 1,56)	0,0000	0,0000	0,0009	0,2834
Жизнеспособность, % Viability, %	87,5 (82,0- 92,0)	84,0 (73,0- 88,0)	78,0 (76,0- 81,0)	0,0191	0,0182	0,0100	0,3169

ТАБЛИЦА 2. ВЛИЯНИЕ РАЗНЫХ МЕТОДОВ ПРЕДВАРИТЕЛЬНОГО ВЫДЕЛЕНИЯ КЛЕТОЧНОЙ ВЗВЕСИ НА КОЛИЧЕСТВО И ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ НЕЙТРОФИЛОВ ДО И ПОСЛЕ ИММУНОМАГНИТНОЙ СЕЛЕКЦИИ, Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)

TABLE 2. INFLUENCE OF DIFFERENT METHODS OF PRELIMINARY ISOLATION OF CELL SUSPENSION ON THE NUMBER AND VITABILITY OF NEUTROPHILS BEFORE AND AFTER IMMUNOMAGNETIC SELECTION, Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)

Показатель Indicator		NeuG1/D n = 6 (1)	NeuG2 n = 16 (2)	NeuHS n = 4 (3)	p (Kruskal- Wallis ANOVA)	p (Mann-Whitney U Test)		
						1 ↔ 2	1 ↔ 3	2 ↔ 3
Количество клеток, выделенных из 1 мл крови ($\times 10^6$) Number of cells isolated from 1 mL of blood ($\times 10^6$)	До Before	3,50 (2,95- 4,25)	1,79 (0,82- 2,34)	1,20 (1,00- 1,30)	0,0036	0,0017	0,0105	0,4497
	После After	0,45 (0,28- 0,70)	0,29 (0,18- 0,63)	0,12 (0,08- 1,70)	0,0870			
p (Wilcoxon Matched Pairs Test)		0,0277	0,0005	0,0679				
Жизнеспособность, % Viability, %	До Before	90,00 (82,00- 94,00)	82,50 (75,00- 88,50)	78,00 (73,50- 84,00)	0,1262			
	После After	90,00 (85,00- 95,00)	84,00 (81,50- 89,50)	90,50 (81,00- 91,00)	0,0894			
p (Wilcoxon Matched Pairs Test)		0,1730	0,2209	0,2851				

В отличие от количественного содержания жизнеспособность нейтрофилов не только сохранилась на высоком уровне у нейтрофилов NeuG1/D, но и наблюдались тенденции к ее повышению в двух других группах, особенно у нейтрофилов NeuHS после иммуномагнитной изоляции (рис. 2), в результате чего во второй серии экспериментов статистически значимые разли-

чия между группами по данному показателю также отсутствовали (табл. 2).

Независимо от способа предварительного выделения нейтрофилов, проведение многоэтапной очистки с использованием на заключительной стадии метода негативной иммуномагнитной селекции позволило получить клеточную взвесь высокой степени чистоты: содержание нейтро-

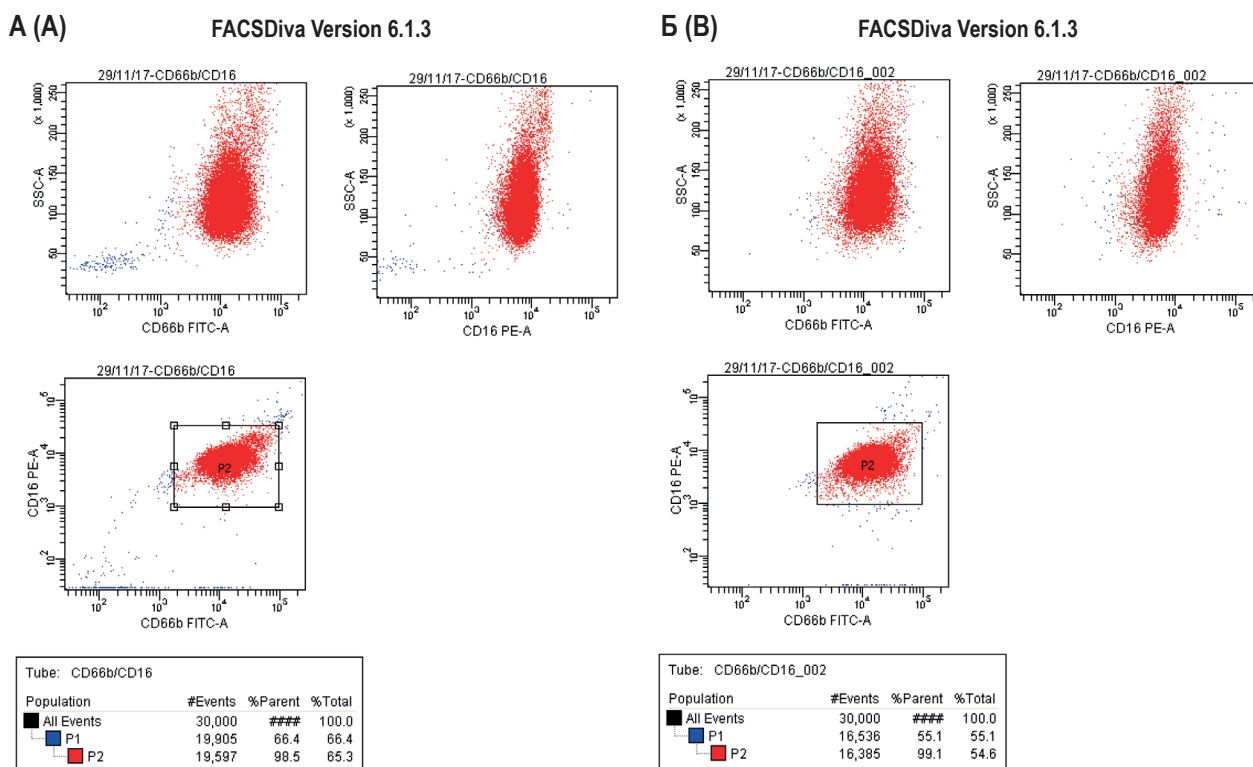


Рисунок 3. Оценка гомогенности нейтрофильной популяции методом проточной цитофлуориметрии

Примечание. Приведены данные для клеточной взвеси, полученной до (А) и после (Б) проведения отрицательной иммуномагнитной селекции. Внизу справа показана чистота обогащенной нейтрофильной взвеси: количество CD16⁺CD66b⁺ нейтрофилов составляет 98,5% до проведения иммуномагнитной селекции (А) и 99,1% – после (Б). CD16 и CD66b – специфические поверхностные маркеры нейтрофилов человека.

Figure 3. Assessment of homogeneity of the neutrophil population by flow cytometry

Note. Data are presented for the cell suspension obtained before (A) and after (B) negative immunomagnetic selection. The bottom right shows the purity of enriched neutrophil suspension: the number of CD16⁺CD66b⁺ neutrophils is 98.5% before immunomagnetic selection (A) and 99.1% after (B). CD16 and CD66b are specific surface markers of human neutrophils.

филов в обогащенной фракции превышало 99,1% (рис. 3).

Обсуждение

В данной работе мы сравнивали три различных способа предварительного выделения нейтрофилов: традиционный метод центрифугирования цельной крови на одинарном градиенте плотности с последующим осаждением эритроцитов декстраном – NeuG1/D; выделение нейтрофилов центрифугированием цельной крови на двойном градиенте плотности – NeuG2; быстрое выделение лейкоцитов с использованием NetaSep – NeuHS.

Анализ полученных результатов показал, что максимальное количество жизнеспособных клеток на предварительном этапе получается при выделении нейтрофилов с использованием одинарного градиента плотности и декстрана (NeuG1/D). После проведения дополнительной очистки нейтрофильной взвеси от контаминирующих клеток с помощью негативной иммуно-

магнитной селекции количество нейтрофилов значительно уменьшилось, независимо от используемого протокола их предварительного выделения. Тенденции к повышенному содержанию NeuG1/D сохранились, однако статистических различий между группами при окончательной оценке числа нейтрофилов обнаружено не было.

Точный механизм существенного уменьшения количества нейтрофилов после проведения негативной иммуномагнитной селекции при многоэтапной очистке неизвестен. Сравнительный анализ, проведенный V. Kremer и соавт. (2023), показывает, что одноэтапная негативная иммуномагнитная изоляция нейтрофилов дает наибольший выход клеток на 1 мл крови по сравнению с методами, использующими разные режимы градиентного центрифугирования [25], а также является наиболее быстрым и щадящим методом выделения нейтрофилов [6]. И хотя есть сведения о том, что данный метод ускоряет апоптоз нейтрофилов, это наблюдается только через 24 ч культивирования [20]. Наши результаты так-

же не подтверждают снижение жизнеспособности нейтрофилов.

Можно предположить, что причиной существенного уменьшения количества нейтрофилов при многоэтапной очистке является их активация в процессе предварительного выделения и последующее удаление при иммуномагнитной изоляции, вследствие возможного неспецифического связывания с магнитными наночастицами.

Влияние процесса выделения нейтрофилов на их функциональный статус широко описано в литературе. Уровень активации и дегрануляции нейтрофилов сильно коррелирует с количеством этапов и типами манипуляций, используемых во время выделения [14].

Известно, что методы выделения нейтрофилов на одинарном или двойном градиенте плотности с помощью центрифугирования дают самый высокий уровень их активации и дегрануляции [6, 14, 25, 49]. Нейтрофилы, изолированные с помощью градиентного центрифугирования, характеризуются отчетливым паттерном экспрессии нескольких маркеров, связанных с активацией, а именно — повышенной экспрессией CD11b (альфа-субъединица интегрина $\alpha M\beta 2$, MAC-1), CD63 (мембранный маркер азурофильных гранул), CD66b (гранулоцит-специфический маркер), CD177 (специфический маркер нейтрофильной активации), FPR1 (рецептор формилпептида-1), CD35 (рецептор комплемента-1) и CD32 (Fc γ -рецептор II, Fc γ RII), снижением уровня CD62L (L-селектин), CD16 (низко-аффинный Fc γ -рецептор III, Fc γ RIII), и BLTR1 (лейкотриена B4 рецептор-1) [6, 14, 25]. Кроме того, установлено, что нейтрофилы, выделенные на градиенте плотности, экспрессируют несколько атипичных маркеров, таких как CD11c (альфа-субъединица интегрина $\alpha X\beta 2$), CXCR3 и CXCR4 (хемокиновые рецепторы), FPR2 (рецептор формилпептида-2), CD14 (коррецептор TLR4) и антигенпрезентирующие молекулы HLA-DR и HLA-DQ, обычно отсутствующих на нейтрофилах, изолированных более щадящим иммуномагнитным методом [6].

Активация и дегрануляция нейтрофилов при центрифугировании на градиенте плотности может в свою очередь способствовать их неспецифическому связыванию с антителами и последующее удаление в процессе иммуномагнитной изоляции. Нейтрофилы содержат большое количество катионных белков, включая миелопероксидазу и дефенсину [8], которые могут опосредовать неспецифические связывающие взаимодействия с анионными областями конструкций антител [14, 23, 37, 41]. Еще одним из механизмов потери клеток в процессе иммуномагнитной изоляции нейтрофилов при много-

этапном выделении может быть их способность легко формировать комплексы с другими типами лейкоцитов, образуя нейтрофил-лейкоцитарные мультиплеты. Показано, что изоляция нейтрофилов с использованием как одинарного, так и двойного градиента плотности может увеличивать частоту образования мультиплетов на 46–73% [14].

Применение декстрана для седиментации эритроцитов (в первом протоколе) также может быть одной из причин потери клеток в процессе иммуномагнитной изоляции. Установлено, что седиментация эритроцитов с декстраном при выделении нейтрофилов стимулирует дегрануляцию специфических гранул, увеличивает экспрессию поверхностных молекул CD11b и CD16, усиливает адгезию и оксидазную активность, снижая при этом хемотаксис нейтрофилов [5, 36, 49]. Интересно, что стимулирующий эффект декстрана авторы наблюдали только тогда, когда седиментация эритроцитов предшествовала градиентному центрифугированию нейтрофилов, при проведении данных этапов в обратном порядке активирующего воздействия декстрана на нейтрофилы не обнаруживалось [5, 36]. Считается, что декстран оказывает опосредованное действие на нейтрофилы через активацию моноцитов и высвобождение ими TNF α [36], поэтому его активирующее влияние на нейтрофилы минимально в отсутствие моноцитов. В нашей работе мы проводили седиментацию с декстраном после градиентного центрифугирования, что должно было минимизировать активирующее влияние декстрана на нейтрофилы, опосредованное моноцитами. Однако не исключены стимулирующие эффекты градиентного центрифугирования, наличие контаминирующих моноцитов, а также вероятность неспецифических взаимодействий, обусловленных декстраном. Необходимо отметить, что декстран является важным компонентом набора для негативной иммуномагнитной селекции, и производитель (StemCell Technologies) не рекомендует использовать декстран в качестве седиментирующего эритроциты агента при подготовке клеточной взвеси.

Использование на предварительном этапе выделения нейтрофилов эритроцит-агрегирующего агента HetaSep (рекомендованного StemCell Technologies) также не обеспечило высокого выхода нейтрофилов после иммуномагнитной изоляции. В отличие от градиентного центрифугирования, при помощи данного метода изначально выделяется не нейтрофильная, а лейкоцитарная взвесь. Несмотря на довольно быструю процедуру, причиной потери клеток здесь также может быть их неспецифическое связывание с антителами вследствие активации. В данном случае

стимулирующим эффектом может обладать гидроксиэтилкрахмал (ГЭК), основной компонент HetaSep, несмотря на противоречивость сведений о его специфических влияниях на нейтрофилы. Известно, что ГЭК ингибирует адгезию нейтрофилов и трансэндотелиальную миграцию [19], но вызывает высвобождение эластазы [22]. На основании экспериментальных данных предполагают, что ГЭК может вести себя как физиологический субстрат для интегринов (MAC-1). Более того, связывание ГЭК с MAC-1 может активировать внутриклеточные сигнальные каскады (ГЭК способен активировать путь PI3K/Akt, не влияя на p38/MAPK), модулирующие ответы нейтрофилов, такие как жизнеспособность и окислительный «взрыв» [48]. Дополнительным негативным моментом при использовании этого метода является необходимость неоднократного проведения осмотического лизиса остаточных эритроцитов, количество которых оказывается довольно существенным (согласно инструкции производителя до 5-10% исходных эритроцитов могут не осаждаться и, таким образом, все еще оставаться в лейкоцитарной фракции). Лизис эритроцитов может провоцировать нейтрофилы к неспецифическому связыванию антител [14, 25].

В целом наша работа подтверждает данные литературы [12, 43, 44, 45] о том, что многоступенчатый процесс изоляции нейтрофилов позволяет получить клеточную взвесь высокой степени чистоты, которую можно использовать в дальнейшем для исследования их цитокин-секретирующей активности. Однако такая много-

ступенчатая изоляция значительно снижает их количество, что может быть критичным при исходно малых объемах крови. Исследуемые нами три разных метода предварительного выделения нейтрофилов не показали статистически значимых различий по количественному выходу жизнеспособных нейтрофилов после иммуномагнитной изоляции, что предполагает использование любого из этих методов в зависимости от возможностей и предпочтений исследователей. Тем не менее, основываясь на собственных полученных результатах, можно сделать вывод о том, что предварительная очистка нейтрофилов методом центрифугирования на одинарном градиенте плотности с последующей седиментацией эритроцитов декстраном, несмотря на все ее недостатки, обладает наиболее щадящим воздействием на клетки, что подтверждается повышенным выходом жизнеспособных нейтрофилов на этапе предварительного выделения и после иммуномагнитной очистки. Кроме того, этот метод является наиболее экономичным, из рассмотренных нами, в плане трудозатрат, времени и стоимости реактивов.

Благодарности

Авторы выражают огромную благодарность профессору Марко Кассателла (Marco A. Cassatella) и доктору Фредерике Калзетти (Federica Calzetti) из Университета Вероны (Верона, Италия) за предоставленный подробный протокол экспериментального выделения нейтрофилов и ценные практические советы.

Список литературы / References

1. Долгушин И.И., Рыжкова А.И., Савочкина А.Ю., Шишкова Ю.С. Способ выделения нейтрофильных гранулоцитов из периферической крови. Патент RU 2431836 C1, 20.10.2011. [Dolgushin I.I., Ryzhkova A.I., Savochkina A.Yu., Shishkova Yu.S. Method for isolating neutrophil granulocytes from peripheral blood. Patent RU 2431836 C1, October 20, 2011].
2. Ковальчук Л.В. Иммунология. Практикум / Под ред. Л.В. Ковальчука, Г.А. Игнатъевой, Л.В. Ганковской. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2010. 176 с. [Kovalchuk L.V. Immunology. Workshop. Eds. L.V. Kovalchuk, G.A. Ignatieva, L.V. Gankovskaya]. Moscow: GEOTAR-Media, 2010. 176 p.
3. Мамус М.А., Тихомирова Е.А., Трофименко А.С., Бедина С.А., Мозговая Е.Э., Спицина С.С., Зборовская И.А. Способ выделения нейтрофильных гранулоцитов из крови с использованием двухступенчатого градиента плотности йогексола. Патент RU 2739324 C1, 22.12.2020. [Mamus M.A., Tikhomirova E.A., Trofimenko A.S., Bedina S.A., Mozgovaya E.E., Spitsina S.S., Zborovskaya I.A. Method for isolating neutrophil granulocytes from blood using a two-step density gradient iohexol. Patent RU 2739324 C1. December 22, 2020].
4. Arruda-Silva F, Bianchetto-Aguilera F, Gasperini S, Polletti S, Cosentino E, Tamassia N, Cassatella M.A. Human neutrophils produce CCL23 in response to various TLR-agonists and TNFalpha. *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, 2017, Vol. 7, 176. doi: 10.3389/fcimb.2017.00176.
5. Berends C., Dijkhuizen B., de Monchy J.G., Gerritsen J., Kauffman H.F. Induction of low density and up-regulation of CD11b expression of neutrophils and eosinophils by dextran sedimentation and centrifugation. *J. Immunol. Methods*, 1994, Vol. 167, no 1-2, pp. 183-193.
6. Blanter M., Cambier S., De Bondt M., Vanbrabant L., Pörtner N., Salama S.A., Metzemaekers M., Marques P.E., Struyf S., Proost P., Gouwy M. Method matters: effect of purification technology on neutrophil phenotype and function. *Front. Immunol.*, 2022, Vol. 13, 820058. doi: 10.3389/fimmu.2022.820058.
7. Blanter M., Gouwy M., Struyf S. Studying neutrophil function in vitro: cell models and environmental factors. *J. Inflamm. Res.*, 2021, Vol. 14, pp. 141-162.

8. Borregaard N., Cowland J.B. Granules of the human neutrophilic polymorphonuclear leukocyte. *Blood*, 1997, Vol.89, no 10, pp. 3503-3521.
9. Borregaard N. Neutrophils, from marrow to microbes. *Immunity*, 2010, Vol. 33, no. 5, pp. 657-670.
10. Boyum A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood: isolation of mononuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, 1968, Suppl. 97, pp. 77-89.
11. Burn G.L., Foti A., Marsman G., Patel D.F., Zychlinsky A. The Neutrophil. *Immunity*, 2021, Vol. 54, Iss. 7, pp. 1377-1391.
12. Calzetti F., Tamassia N., Arruda-Silva F., Polletti S., Cosentino E., Tamassia N., Cassatella M.A. The importance of being “pure” neutrophils. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2017, Vol. 139, pp. 352-355.
13. Cassatella M.A., Östberg N.K., Tamassia N., Soehnlein O. Biological Roles of Neutrophil-Derived Granule Proteins and Cytokines. *Trends Immunol.*, 2019, Vol. 40, no. 7, pp. 648-664.
14. Connelly A.N., Huijbregts R.P.H., Pal H.C., Kuznetsova V., Davis M.D., Ong K.L., Fay C.X., Greene M.E., Overton E.T., Hel Z. Optimization of methods for the accurate characterization of whole blood neutrophils. *Sci. Rep.*, 2022, Vol. 12, 3667. doi: 10.1038/s41598-022-07455-2.
15. Degel J., Shokrani M. Validation of the efficacy of a practical method for neutrophils isolation from peripheral blood. *Clin. Lab. Sci.*, 2010, Vol. 23, pp. 94-98.
16. Ferrante A., Thong Y.H. Optimal conditions for simultaneous purification of mononuclear and polymorphonuclear leucocytes from human blood by the Hypaque-Ficoll method. *J. Immunol. Methods*, 1980, Vol. 36, no 2, pp. 109-117.
17. Ganesh K., Joshi M.B. Neutrophil sub-types in maintaining immune homeostasis during steady state, infections and sterile inflammation. *Inflamm. Res.*, 2023, Vol. 72, pp. 1175-1192.
18. Giudicelli J., Philip P.J.M., Delque P., Sudaka P. A single-step centrifugation method for separation of granulocytes and mononuclear cells from blood using discontinuous density gradient of percoll. *J. Immunol. Methods*, 1982, Vol. 54, pp. 43-46.
19. Handrigan M.T., Burns A.R., Donnachie E.M., Bowden R.A. Hydroxyethyl starch inhibits neutrophil adhesion and transendothelial migration. *Shock*, 2005, Vol. 24, no. 5, pp. 434-439.
20. Hsu A.Y., Peng Z., Luo H., Loison F. Isolation of Human Neutrophils from Whole Blood and Buffy Coats. *J. Vis. Exp.*, 2021, Vol. 175, e62837. doi: 10.3791/62837.
21. Hundhammer T., Gruber M., Wittmann S. Paralytic impact of centrifugation on human neutrophils. *Biomedicine*, 2022, Vol. 10, no. 11, 2896. doi: 10.3390/biomedicine10112896.
22. Jackson M.H., Millar A.M., Dawes J., Bell D. Neutrophil activation during cell separation procedures. *Nucl. Med. Commun.*, 1989, Vol. 10, no. 12, pp. 901-904.
23. Kolářová H., Vítěček J., Černá A., Černík M., Přibyl J., Skládal P., Potěšil D., Ihnatová I., Zdráhal Z., Hampl A., Klinke A., Kubala L. Myeloperoxidase mediated alteration of endothelial function is dependent on its cationic charge. *Free Radic. Biol. Med.*, 2020, Vol. 162, pp. 14-26.
24. Krabbe J., Beilmann V., Alamzad-Krabbe H., Böll S., Seifert A., Ruske N., Kraus T., Martin C. Blood collection technique, anticoagulants and storing temperature have minor effects on the isolation of polymorphonuclear neutrophils. *Sci. Rep.*, 2020, Vol. 10, no. 1, 14646. doi: 10.1038/s41598-020-71500-1.
25. Kremer V., Godon O., Bruhns P., Jönsson F., de Chaisemartin L. Isolation methods determine human neutrophil responses after stimulation. *Front. Immunol.*, 2023, Vol. 14, 1301183. doi: 10.3389/fimmu.2023.1301183.
26. Kremserova S., Nauseef W.M. Isolation of human neutrophils from venous blood. *Methods Mol. Biol.*, 2020, Vol. 2087, pp. 33-42.
27. Kuhns D.B., Priel D.A.L., Chu J., Zarembek K.A. Isolation and functional analysis of human neutrophils. *Curr. Protoc. Immunol.*, 2015, Vol. 111, pp. 7.23.1-7.23.16.
28. Liew P.X., Kubes P. The neutrophil's role during health and disease. *Physiol. Rev.*, 2019, Vol. 99, no. 2, pp. 1223-1248.
29. Mantovani A., Cassatella M.A., Costantini C., Jaillon S. Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. *Nat. Rev. Immunol.*, 2011, Vol. 11, no. 8, pp. 519-531.
30. Mayadas T.N., Cullere X., Lowell C.A. The multifaceted functions of neutrophils. *Annu. Rev. Pathol.*, 2014, Vol. 9, pp. 181-218.
31. Mócsai A. Diverse novel functions of neutrophils in immunity, inflammation, and beyond. *J. Exp. Med.*, 2013, Vol. 210, no. 7, pp. 1283-1299.
32. Nathan C. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nat. Rev. Immunol.*, 2006, Vol. 6, no. 3, pp. 173-182.
33. Nauseef W.M. Neutrophils, from cradle to grave and beyond. *Immunol. Rev.* 2016, Vol. 273, no. 1, pp. 5-10.
34. Nauseef W., Borregaard N. Neutrophils at work. *Nat. Immunol.*, 2014, Vol. 15, pp. 602-611.
35. Oh H., Siano B., Diamond S. Neutrophil isolation protocol. *J. Vis. Exp.*, 2008, Vol. 17, 745. doi: 10.3791/745.
36. Quach A., Ferrante A. The application of dextran sedimentation as an initial step in neutrophil purification promotes their stimulation, due to the presence of monocytes. *J. Immunol. Res.*, 2017, Vol. 2017, 1254792. doi: 10.1155/2017/1254792.
37. Rahman A.H., Tordesillas L., Berin M.C. Heparin reduces nonspecific eosinophil staining artifacts in mass cytometry experiments. *Cytometry A*, 2016, Vol. 89, pp. 601-607.

38. Scapini P., Calzetti F., Cassatella M.A. On the detection of neutrophil-derived vascular endothelial growth factor (VEGF). *J. Immunol. Methods*, 1999, Vol. 232, pp. 121-129.
39. Scapini P., Laudanna C., Pinardi C., Allavena P., Mantovani A., Sozzani S., Cassatella M.A. Neutrophils produce biologically active macrophage inflammatory protein-3alpha (MIP-3alpha)/CCL20 and MIP-3beta/CCL19. *Eur. J. Immunol.*, 2001, Vol. 31, pp. 1981-1988.
40. Scapini P., Nardelli B., Nadali G., Calzetti F., Pizzolo G., Montecucco C., Cassatella M.A. G-CSF-stimulated neutrophils are a prominent source of functional BlyS. *J. Exp. Med.*, 2003, Vol. 197, pp. 297-302.
41. Selsted M.E., Harwig S.S., Ganz T., Schilling J.W., Lehrer R.I. Primary structures of three human neutrophil defensins. *J. Clin. Invest.*, 1985, Vol. 76, pp. 1436-1439.
42. Summers C., Rankin S.M., Condliffe A.M., Singh N., Peters A.M., Chilvers E.R. Neutrophil kinetics in health and disease. *Trends Immunol.*, 2010, Vol. 31, no. 8, pp. 318-324.
43. Tamassia N., Bianchetto-Aguilera F., Arruda-Silva F., Gardiman E., Gasperini S., Calzetti F., Cassatella M.A. Cytokine production by human neutrophils: Revisiting the "dark side of the moon". *Eur. J. Clin. Invest.*, 2018, Vol. 48, Suppl. 2, e12952. doi: 10.1111/eci.12952.
44. Tamassia N., Cassatella M.A., Bazzoni F. Fast and accurate quantitative analysis of cytokine gene expression in human neutrophils. *Methods Mol. Biol.*, 2014, Vol. 1124, pp. 451-467.
45. Tamassia N., Zimmermann M., Castellucci M., Ostuni R., Bruderek K., Schilling B., Brandau S., Bazzoni F., Natoli G., Cassatella M.A. Cutting edge: an inactive chromatin configuration at the IL-10 locus in human neutrophils. *J. Immunol.*, 2013, Vol. 190, pp. 1921-1925.
46. Tecchio C., Micheletti A., Cassatella M.A. Neutrophil-derived cytokines: facts beyond expression. *Front. Immunol.*, 2014, Vol. 5, 508. doi: 10.3389/fimmu.2014.00508.
47. Thomas H.B., Moots R.J., Edwards S.W., Wright H.L. Whose gene is it anyway? The effect of preparation purity on neutrophil transcriptome studies. *PLoS ONE*, 2015, Vol. 10, no. 9, e0138982. doi: 10.1371/journal.pone.0138982.
48. Trentini A., Murganti F., Rosta V., Cervellati C., Manfrinato M.C., Spadaro S., Dallochio F., Volta C.A., Bellini T. Hydroxyethyl Starch 130/0.4 Binds to neutrophils impairing their chemotaxis through a mac-1 dependent interaction. *Int. J. Mol. Sci.*, 2019, Vol. 20, no. 4, 817. doi: 10.3390/ijms20040817.
49. Watson F., Robinson J.J., Edwards S.W. Neutrophil function in whole blood and after purification: changes in receptor expression, oxidase activity and responsiveness to cytokines. *Biosci. Rep.*, 1992, Vol. 12, no 2, pp. 123-133.
50. Zimmermann M., Aguilera F.B., Castellucci M., Rossato M., Costa S., Lunardi C., Ostuni R., Girolomoni G., Natoli G., Bazzoni F., Tamassia N., Cassatella M.A. Chromatin remodelling and autocrine TNFalpha are required for optimal interleukin-6 expression in activated human neutrophils. *Nat. Commun.*, 2015, Vol. 6, 6061. doi: 10.1038/ncomms7061.

Авторы:

Швыдченко И.Н. — к.б.н., доцент кафедры физиологии ФГБОУ ВО «Кубанский государственный университет физической культуры, спорта и туризма»; доцент кафедры нормальной физиологии ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Краснодар, Россия

Быковская Е.Ю. — к.б.н., биолог клинико-диагностической лаборатории ГБУЗ «Детская краевая клиническая больница» Министерства здравоохранения Краснодарского края, г. Краснодар, Россия

Голубцов В.В. — д.м.н., доцент, профессор кафедры анестезиологии, реаниматологии и трансфузиологии ФПК и ППС ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Краснодар, Россия

Authors:

Shvydchenko I.N., PhD (Biology), Associate Professor, Department of Physiology, Kuban State University of Education, Sport and Tourism; Associate Professor, Department of Normal Physiology, Kuban State Medical University, Krasnodar, Russian Federation

Bykovskaya E.Yu., PhD (Biology), Biologist, Clinical Diagnostic Laboratory, Children's Regional Clinical Hospital, Krasnodar, Russian Federation

Golubtsov V.V., PhD, MD (Medicine), Associate Professor, Professor, Department of Anesthesiology, Reanimatology and Transfusiology, Faculty of Advanced Training and Teaching Staff, Children's Regional Clinical Hospital, Krasnodar, Russian Federation

Поступила 06.01.2024
Принята к печати 09.03.2024

Received 06.01.2024
Accepted 09.03.2024

ОСОБЕННОСТИ IgE-ОТВЕТА НА БЕЛОК И ЖЕЛТОК КУРИНОГО ЯЙЦА У ДЕТЕЙ С ПИЩЕВОЙ АЛЛЕРГИЕЙ И АТОПИЧЕСКИМ ДЕРМАТИТОМ

Сновская М.А., Семикина Е.Л., Макарова С.Г., Петричук С.В.,
Курбатова О.В., Жужула А.А., Еreshko О.А., Галимова А.А.

ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей» Министерства здравоохранения
РФ, Москва, Россия

Резюме. Куриное яйцо является одним из наиболее важных источников аллергенов, сенсibilизация пациентов к которым чаще всего проявляется в виде пищевой аллергии (ПА) и/или атопического дерматита (АтД). Иммуногенными факторами куриного яйца являются молекулы, которые присутствуют как в белке, так и желтке.

Цель нашей работы состояла в сравнении частоты и интенсивности IgE-ответа на различные компоненты куриного яйца у детей в зависимости от их возраста и пола. Нами обследованы 3070 детей с симптомами пищевой аллергии и атопического дерматита, проведен анализ IgE-ответа на экстракт аллергенов белка куриного яйца (f1) и экстракт аллергенов желтка куриного яйца (f75) с учетом возраста и пола детей. Уровень IgE определен методом иммунофлюоресценции с помощью автоматического анализатора ImmunoCAP250.

Нами выявлена высокая частота сенсibilизации к куриному яйцу у детей с ПА и АтД: 31,07% (n = 954) пациентов имели клинически значимые уровни IgE. Частота сенсibilизации к белку была статистически значимо выше частоты сенсibilизации к желтку: 31,04% (n = 953) и 13,13% (n = 403) соответственно. Максимальная распространенность положительных IgE-ответов на белок и желток куриного яйца и выраженность сенсibilизации отмечалась у детей первого года жизни, а у детей старших возрастных групп наблюдалось значимое снижение этих показателей. В старших возрастных группах также наблюдалось уменьшение числа косенсibilизированных пациентов, в то время как число случаев моносенсibilизации к белку куриного яйца возрастало в группах детей 2–6 лет, а затем снижалось у детей старше 6 лет. У детей обоих полов частота позитивных IgE-ответов на экстракты аллергенов белка и желтка куриного яйца значимо не отличалась и имела сходную возрастную динамику. Статистически значимые различия между IgE-ответом мальчиков и девочек выявлены только в группах детей старше 14 лет и только в отношении IgE-ответа на аллергены белка куриного яйца. Нами показана крайне низкая частота моносенсibilизации к желтку: клинически значимые уровни

Адрес для переписки:

Сновская Марина Андреевна
ФГАУ «Национальный медицинский
исследовательский центр здоровья детей»
Министерства здравоохранения РФ
119991, Россия, Москва, Ломоносовский пр., 2, стр. 1.
Тел.: 8 (495) 967-14-20.
E-mail: snows@inbox.ru

Address for correspondence:

Marina A. Snovskaya
National Medical Research Center for Children's Health
2 Lomonosovsky Ave, Bldg 1
Moscow
119991 Russian Federation
Phone: +7 (495) 967-14-20.
E-mail: snows@inbox.ru

Образец цитирования:

М.А. Сновская, Е.Л. Семикина, С.Г. Макарова,
С.В. Петричук, О.В. Курбатова, А.А. Жужула,
О.А. Еreshko, А.А. Галимова «Особенности
IgE-ответа на белок и желток куриного яйца у детей
с пищевой аллергией и атопическим дерматитом»
// Медицинская иммунология, 2025. Т. 27, № 1.
С. 119-130. doi: 10.15789/1563-0625-FOT-2951

© Сновская М.А. и соавт., 2025

Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

M.A. Snovskaya, E.L. Semikina, S.G. Makarova,
S.V. Petrichuk, O.V. Kurbatova, A.A. Zhuzhula, O.A. Ereshko,
A.A. Galimova "Features of the IgE response to egg white and
yolk in children with food allergies and atopic dermatitis",
Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya,
2025, Vol. 27, no. 1, pp. 119-130.
doi: 10.15789/1563-0625-FOT-2951

© Snovskaya M.A. et al., 2025

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

DOI: 10.15789/1563-0625-FOT-2951

IgE к желтку при отсутствии антител к белку куриного яйца обнаружены у 0,1% пациентов с пищевой аллергией и атопическим дерматитом.

Высокая частота сенсибилизации к куриному яйцу у детей первых лет жизни свидетельствует о крайне раннем контакте пациента с аллергеном. Иммуногенная способность аллергенов белка и желтка различна, более выраженный IgE-ответ наблюдается в отношении белка куриного яйца. Снижение числа случаев положительного IgE-ответа на аллергены куриного яйца у детей может свидетельствовать о формировании иммунологической толерантности как к желтку, так и к белку к возрасту 8-10 лет. Однако остается открытым вопрос изучения иммунных механизмов аллергических реакций, поскольку, несмотря на значительное снижение распространенности аллергии на куриное яйцо у детей старшего возраста, ряд пациентов так и не достигает толерантности к данному пищевому продукту.

Ключевые слова: пищевая аллергия, атопический дерматит, сенсибилизация к белку куриного яйца, сенсибилизация к желтку куриного яйца, IgE-ответ

FEATURES OF THE IgE RESPONSE TO EGG WHITE AND YOLK IN CHILDREN WITH FOOD ALLERGIES AND ATOPIC DERMATITIS

Snovskaya M.A., Semikina E.L., Makarova S.G., Petrichuk S.V., Kurbatova O.V., Zhuzhula A.A., Ereshko O.A., Galimova A.A.

National Medical Research Center for Children's Health, Moscow, Russian Federation

Abstract. Chicken egg is among the most important sources of allergens. Sensitization to them is most often manifests as food allergy (FA), and/or atopic dermatitis (AD). Immunogenic substances of a chicken egg are present in both white egg and yolk.

The purpose of our work was to compare frequency and intensity of the IgE responses to various components of a chicken egg in children, depending on their age and gender. We examined 3070 children with symptoms of food allergies and atopic dermatitis, analyzed the IgE responses to chicken white egg allergens extract (f1) and yolk allergens extract (f75), taking into account the age and gender of children. The IgE levels were determined by immunofluorescence using an automatic ImmunoCAP 250 analyzer. We found a high incidence of sensitization to chicken egg in children with FA and AD: 31.07% (n = 954) of patients had clinically significant IgE levels. The frequency of sensitization to white egg was statistically significantly higher than the frequency of sensitization to yolk: 31.04% (n = 953) and 13.13% (n = 403), respectively. The maximum prevalence of positive IgE responses to white egg and yolk and more severe sensitization were observed in children of their first year of life. A significant decrease of these indices has been detected in groups of older children. In older age groups, there was also a decrease in the number of co-sensitized patients, whereas the number of monosensitization cases to chicken egg protein was increased in groups of children of 2 to 6 years old, and then decreased in children over 6 years old. The frequency of positive IgE responses to allergen extracts of white egg and yolk did not differ significantly and had similar age dynamics in children of both sexes. Statistically significant differences between the IgE responses of boys and girls were found only in groups of children over 14 years old, especially with IgE to allergens of white egg. We have shown an extremely low frequency of monosensitization to yolk: clinically significant levels of IgE to yolk in the absence of antibodies to egg protein were found in 0.1% of patients with food allergies and atopic dermatitis. High frequency of sensitization to chicken eggs in small children suggests an extremely early contact of the patients with allergens. The immunogenic ability of white egg and yolk allergens is different. Much more pronounced IgE response was observed towards white egg. A decreasing number of positive IgE response cases to chicken egg allergens in children may be due to development of immunological tolerance to both yolk and white egg at the age of 8-10 years. However, the issue of studying the allergic response mechanisms remains open, since, despite a significant decrease in prevalence of egg allergy in older children, a number of patients still do not achieve tolerance to this food product.

Keywords: food allergy, atopic dermatitis, sensitization to white egg, sensitization to egg yolk, IgE response

Введение

По данным различных исследований, куриное яйцо является одним из наиболее важных источников аллергенов [10, 14]. Сенсибилизация к нему происходит как при употреблении в пищу, так и при контакте с кожей, а также при вдыхании аллергенов, диспергированных в воздухе [4, 10]. Более того, даже дети, находящиеся на грудном вскармливании и не получавшие ранее прикорм, могут развивать IgE-ответ на аллергены куриного белка, которые получают с молоком матери [4]. По данным различных исследований, распространенность аллергии к куриному яйцу варьирует от 0,5% до 9% в популяции. Так, по данным J. Wei-Liang Tan и соавт., более 25% детей, страдающих atopическим дерматитом, имеют сенсибилизацию к куриному яйцу [4]. В работе Е.Е. Варламова и соавт. показано, что распространенность аллергии к куриному яйцу у детей первых 2 лет жизни составляет 1-2% [1]. По оценкам С.Л. Gray и соавт. распространенность аллергии на яйцо в раннем детском возрасте составляет 0,5-8,9% [6].

Аллергия на куриное яйцо проявляется различными симптомами. Распространенными из них являются эритема, крапивница, экзематозная сыпь, боли в животе, тошнота, рвота, боли в эпигастрии, диарея, отек слизистой ротовой полости, отек гортани, в редких случаях сенсибилизация к куриному яйцу может приводить к развитию анафилактической реакции [8, 11]. Сенсибилизация к куриному яйцу чаще всего манифестирует в виде пищевой аллергии и/или atopического дерматита. При этом у детей раннего возраста atopический дерматит представляет собой наиболее распространенное аллергическое заболевание.

Сенсибилизирующими факторами куриного яйца являются белки, которые в основном присутствуют в яичном белке, например, овальбумин, овомукоид, овотрансферрин и лизоцим. Однако яичный желток также обладает аллергенной активностью, за счет альфа-ливетина и гликопротеина 42 [8, 14].

Современные публикации приводят данные о разной роли компонентов яйца как сенсибилизирующих агентов у детей и у взрослых пациентов. В работе J. Kovacs-Nolan и соавт. показано, что аллергия на яичный желток преимущественно встречается у лиц старше 18 лет, в отличие от аллергии на яичный белок, которая распространена у маленьких детей [7]. В другой работе D.J. Palmer и соавт. показали, что у детей до года, имеющих аллергию на куриное яйцо, сенсибилизация в основном обусловлена яичным белком, а аллергия на желток встречается крайне редко [9]. Более важную роль белка куриного яйца как источника

аллергенов, по сравнению с желтком, описывает работа Р. Dhanapala и соавт. [5]. Вместе с тем роль желтка, как сенсибилизирующего агента остается недооцененной.

В связи с неоднозначной ролью компонентов куриного яйца в сенсибилизации пациента, различии данных о частоте аллергических реакций, отсутствия анализа возрастной динамики IgE-ответа у детей, сенсибилизированных к куриному яйцу, **цель нашей работы** состояла в сравнении частоты и интенсивности IgE-ответа на белок и желток куриного яйца у сенсибилизированных детей в зависимости от их возраста и пола.

Материалы и методы

Нами проведено одноцентровое сравнительное ретроспективное исследование IgE-ответов на компоненты куриного яйца (желтка и белка) в когорте пациентов из различных регионов России. В исследование были включены дети в возрасте от 6 месяцев до 18 лет, выбранные из регистра ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» Минздрава России. Все дети имели симптомы пищевой аллергии в сочетании с atopическим дерматитом, были консультированы аллергологом и направлены на определение в сыворотке крови концентрации аллерген-специфических антител (IgE) к широкой панели аллергенов с целью выявления триггерного фактора аллергических реакций.

В ходе исследования нами был осуществлен ретроспективный сбор и анализ данных; медицинского вмешательства не проводилось. Оценены истории болезни и результаты обследования 3070 детей (1487 девочек, 1583 мальчика) с симптомами пищевой аллергии, такими как тошнота, рвота, расстройство стула, развивающиеся после приема пищи, отеки слизистых, крапивница, экзема. У пациентов также отмечено наличие atopического дерматита, проявляющегося в сухости кожи, зудящей сыпи, развивающейся на разгибательных поверхностях рук и ног, лице, у ряда пациентов отмечены мокнутие и корки в местах поражения кожных покровов.

Анализ IgE-ответа на экстракт аллергенов белка куриного яйца (f1) и экстракт аллергенов желтка куриного яйца (f75) был проведен как для всей группы пациентов, так и в подгруппах с учетом возраста и пола пациентов. Для этого пациенты были разделены на 9 подгрупп в зависимости от возраста: 6-12 месяцев (275 детей), 1-2 года (526 детей), 2-4 года (832 ребенка), 4-6 лет (512 детей), 6-8 лет (329 детей), 8-10 лет (212 детей), 10-12 лет (151 ребенок), 12-14 лет (101 ребенок), 14-18 лет (132 ребенка).

Уровни аллерген-специфических IgE были определены с помощью иммунофлуоресцентного метода, реализованного на базе авто-

матического анализатора Phadia250 (Thermo Fisher Scientific, США). Пороговым значением, при превышении которого концентрация IgE в сыворотке крови считалась клинически значимой, был принят уровень 0,35 кЕ/л согласно данным производителя аналитической системы. Для интерпретации полученных результатов использовалось также разделение их на классы сенсибилизации: концентрация IgE = 0,35÷0,69 кЕ/л соответствовала I классу (слабая сенсибилизация); IgE = 0,70÷3,49 кЕ/л – II классу (умеренная); IgE = 3,5÷17,49 кЕ/л – III классу (средний уровень сенсибилизации), IgE = 17,5÷49,9 кЕ/л – IV классу (высокий уровень), IgE = 50,0÷99,90 кЕ/л – V классу (очень высокий уровень), IgE > 100 кЕ/л – VI классу (предельно высокий уровень).

Описательный и сравнительный статистический анализ данных выполнен с помощью программного обеспечения IBM SPSS Statistics (США) и программы Microsoft Office Excel (США), результаты представлены в виде сводных таблиц и графиков. Сравнительный анализ данных производили с использованием t-критерия Стьюдента, U-критерия Манна–Уитни, корреляционного анализа. Критический уровень значимости при проверке статистических гипотез принят $p = 0,05$.

Этическая экспертиза

На заседании локального независимого этического комитета ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» принято консенсусное решение одобрить проведение данного исследования и подготовить мате-

риалы работы для публикации (Протокол № 6 от 07.07.2022).

Результаты

У детей с пищевой аллергией и атопическим дерматитом обнаружена высокая частота сенсибилизации к куриному яйцу: 954 пациента (31,07%) из 3070 детей, включенных в исследование, имели клинически значимые уровни IgE к компонентам куриного яйца. Частота сенсибилизации к белку (953 пациента, 31,04%) была статистически значимо выше частоты сенсибилизации к желтку (403 пациента, 13,13%) ($p = 0,001$). Данные представлены на рисунке 1.

Среди обследованных пациентов практически отсутствовали случаи моносенсибилизации к желтку куриного яйца: из 3070 пациентов выявлен только один ребенок с клинически значимым уровнем IgE к экстракту аллергенов желтка куриного яйца (f75) при отсутствии антител к экстракту аллергенов белка (f1), т. е. 0,03% от всех обследованных детей, или 0,10% от пациентов, сенсибилизированных к яйцу. Важно отметить, что уровень IgE к желтку у данного пациента был невысоким – 0,97 кЕ/л, что соответствовало второму классу сенсибилизации. За исключением этого пациента у всех остальных детей, имеющих IgE к желтку (402 пациента, 13,09%), также были обнаружены клинически значимые уровни IgE к экстракту аллергенов белка. Таким образом, 13,09% обследованных детей были косенсибилизированы.

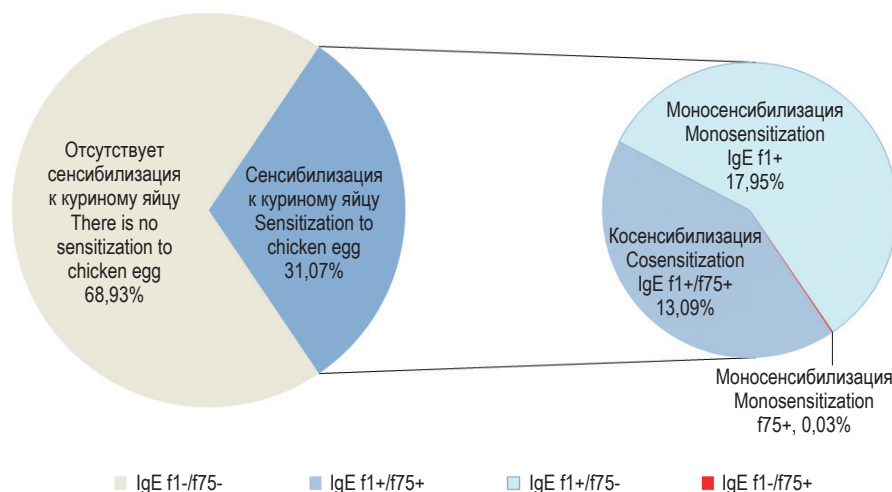


Рисунок 1. Сенсибилизация к куриному яйцу у пациентов с пищевой аллергией, где IgE f1+/f75+ – частота косенсибилизации к белку и желтку, IgE f1+/f75- – частота моносенсибилизации к белку, IgE f1-/f75+ – частота моносенсибилизации к желтку

Figure 1. Sensitization to chicken egg in patients with food allergy, where IgE f1+/f75+ is the frequency of sensitization to white and yolk together, IgE f1+/f75- is the frequency of monosensitization to white, IgE f1-/f75+ is the frequency of monosensitization to yolk

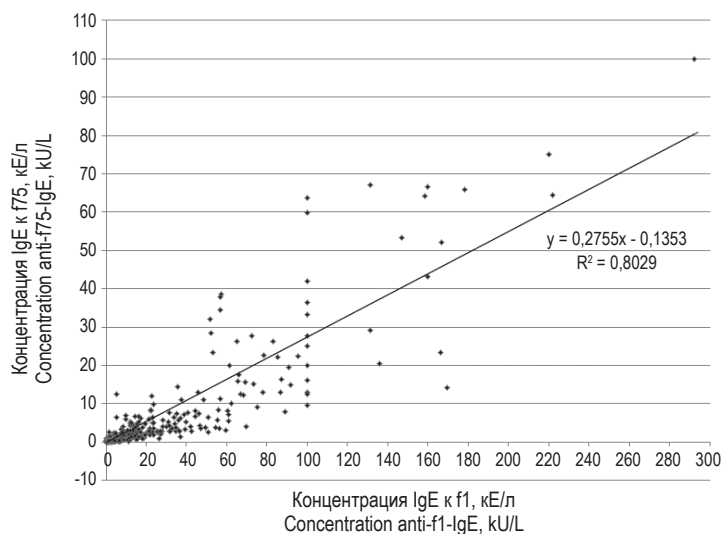


Рисунок 2. Корреляционная зависимость концентрации IgE к белку и желтку куриного яйца у детей с пищевой аллергией

Figure 2. Correlation of IgE concentration to different components of chicken eggs in children with food allergies

Среди обследованных пациентов наблюдалось значительное число детей, сенсibilизированных только к белку куриного яйца (моносенсибилизация): IgE к экстракту аллергенов белка при отсутствии IgE к экстракту аллергенов желтка обнаружена у 551 пациента (17,95%).

У пациентов, сенсibilизированных к обоим компонентам яйца одновременно, обнаружена статистически значимая положительная сильная корреляция концентрации IgE к экстракту аллергенов желтка (IgE к f75) и экстракту аллергенов белка (IgE к f1) (коэффициент корреляции Спирмена $r = 0,803$, $p = 0,001$). Корреляционная зависимость представлена на рисунке 2.

Нами было отмечено, что при уровне IgE к f1 (белку куриного яйца) в диапазоне 0,35÷49,9 кЕ/л (I-IV класс сенсibilизации) значения концентрации IgE к f75 (желтку куриного яйца), выявляемые у пациентов, находились в более узком диапазоне 0,0÷14,5 кЕ/л (0-III класс сенсibilизации). У пациентов с IgE к f1, соответствующим V-классу сенсibilизации (50,0÷99,9 кЕ/л), концентрация антител к желтку находилась в диапазоне 2,6÷38,7 кЕ/л (II-IV класс сенсibilизации). У пациентов с максимально высоким классом сенсibilизации к белку куриного яйца > 100,0 кЕ/л (VI класс сенсibilизации) диапазон уровней IgE к f75 был наиболее широким

ТАБЛИЦА 1. СТАТИСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ПАРАМЕТРА КОНЦЕНТРАЦИЯ IgE К ЖЕЛТКУ КУРИНОГО ЯЙЦА В ЗАВИСИМОСТИ ОТ СТЕПЕНИ СЕНСIBILИЗАЦИИ ПАЦИЕНТА К БЕЛКУ КУРИНОГО ЯЙЦА

TABLE 1. STATISTICAL CHARACTERISTICS OF THE IgE ANTIBODIES TO EGG YOLK CONCENTRATION, DEPENDING ON THE DEGREE OF PATIENT SENSITIZATION TO WHITE EGG

Класс сенсibilизации, IgE_f1 Sensitization class, IgE_f1	Среднее значение концентрации IgE_f75, кЕ/л Average IgE_f75 concentration value, kU/L	Стандартное отклонение, кЕ/л Standard deviation, kU/L	Минимум, кЕ/л Minimum, kU/L	Максимум, кЕ/л Maximum, kU/L	Медиана, кЕ/л Median, kU/L
I (0,35-0,66)	0,12	0,09	0,01	0,68	0,10
II (0,70-3,49)	0,30	0,28	0,03	2,69	0,22
III (3,50-17,49)	1,63	1,71	0,15	12,40	1,01
IV (17,5-49,9)	4,51	2,99	0,92	14,50	3,58
V (50,0-99,9)	16,01	10,04	2,67	38,70	14,90
VI (> 100)	42,24	24,10	9,65	100,00	39,25

(9,6÷100,0 кЕ/л), при этом встречались максимальные значения IgE к f75, что отсутствовало в других подгруппах. Статистические характеристики параметра IgE к f75 приведены в таблице 1 и на рисунке 3.

Таким образом, у косенсибилизированных пациентов, имеющих слабую или умеренную степень сенсibilизации к белку куриного яйца, сенсibilизация к желтку не превышала третьего класса сенсibilизации. С ростом интенсивности IgE-ответа на белок куриного яйца у пациентов росла выраженность ответа на желток. У детей с V классом сенсibilизации к белку концентрация IgE к желтку соответствовала преимущественно III и IV классу. А при максимальной степени сенсibilизации пациентов к белку снижалось количество детей со средним уровнем сенсibilизации к желтку и значительно увеличивалось количество пациентов с IV и V классами сенсibilизации.

При анализе возрастных особенностей сенсibilизации детей к куриному яйцу нами обнаружена зависящая от возраста динамика уровня IgE к экстрактам аллергенов куриного яйца. Наибольшее число сенсibilизированных пациентов выявлены в группе детей первого года жизни, а наименьшее число — у детей старше 14 лет.

Дети первого года жизни в 41,8% случаев имели клинически значимые уровни IgE к куриному яйцу, что статистически значимо чаще сенсibilизации в группах детей старших возрастных групп ($p = 0,001$). При этом у детей в возрасте 6-12 месяцев преобладала косенсибилизация (IgE к белку и желтку куриного яйца) — 26,5%, а моносенсибилизация к белку встречалась статистически значимо реже — 15,3% ($p < 0,05$). Данные представлены на рисунке 4.

В группе детей возраста 1-2 года общая частота сенсibilизации к куриному яйцу была статистически значимо меньше, чем у детей первого года жизни — 35,7% ($p = 0,034$), что связано с уменьшением числа косенсибилизированных пациентов (17,9% против 26,5%). Число моносенсибилизированных пациентов значимо не изменялось (17,9%) по сравнению с детьми первого года жизни. Таким образом, число моносенсибилизированных и косенсибилизированных пациентов в возрастной группе 1-2 года было равным ($p > 0,05$).

У детей 2-4 и 4-6 лет общая частота сенсibilизации к куриному яйцу значимо не изменялась (35,3% и 33,2%) по сравнению с детьми 1-2 лет (35,74%). При этом значимо изменялось соотношение числа косенсибилизированных и моносенсибилизированных пациентов. Статистически значимо преобладали пациенты с позитивным IgE-ответом на экстракт аллергенов белка куриного яйца (22,8% и 21,5% у детей 2-4 лет и 4-6 лет соответственно), а доля пациентов, имеющих IgE к белку и желтку одновременно,

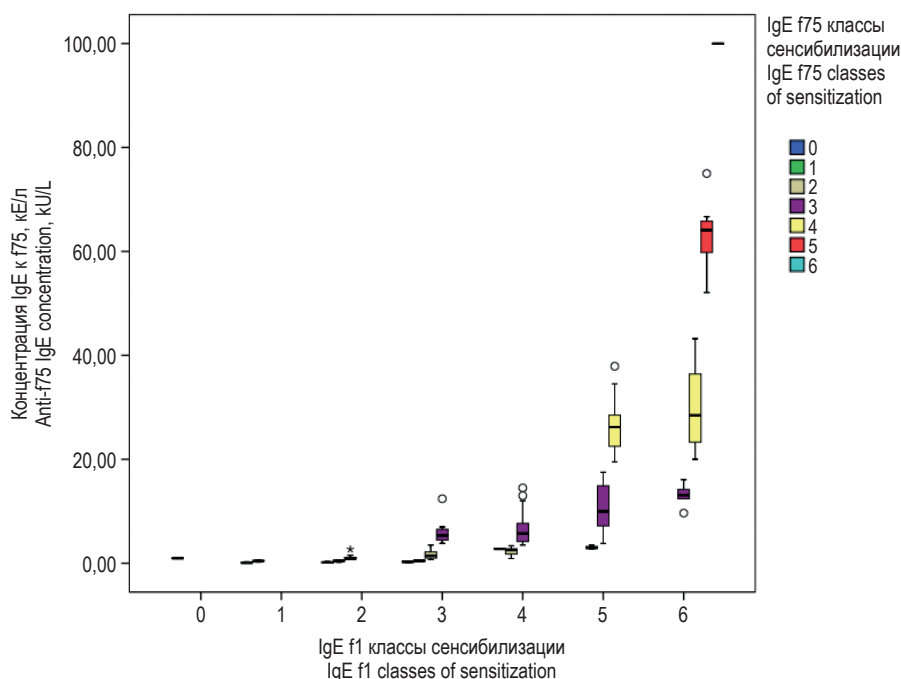


Рисунок 3. Соотношение позитивных IgE-ответов на желток и белок куриного яйца, выраженных в классах сенсibilизации

Figure 3. The ratio of positive IgE responses to egg yolk and egg white expressed in sensitization classes

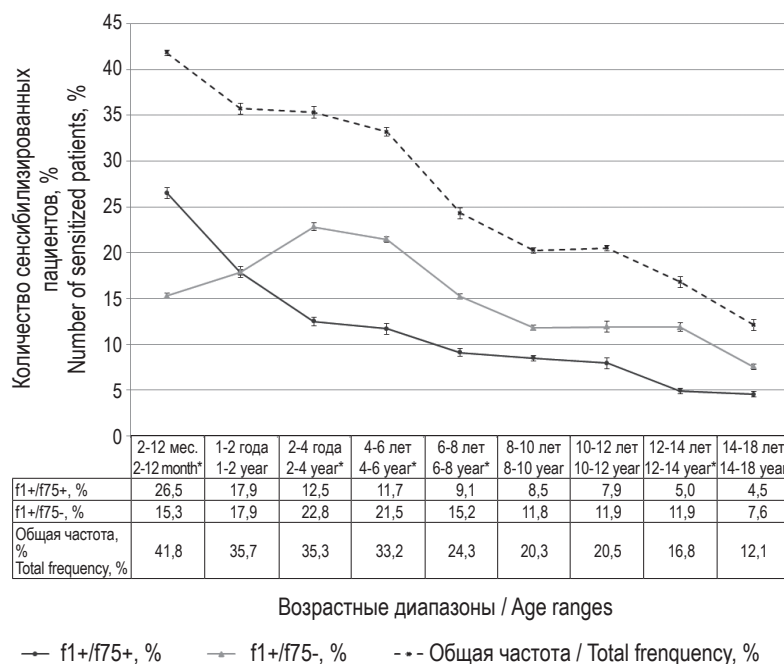


Рисунок 4. Возрастная динамика сенсibilизации детей к компонентам куриного яйца, где f1+/f75+ – частота ко-сенсibilизации к белку и желтку, f1+/f75- – частота моносенсibilизации к белку

Примечание. Также на рисунке указана суммарная частота сенсibilизации к куриному яйцу. * – статистически значимые различия частоты моно- и ко-сенсibilизации у пациентов одного возрастного диапазона.

Figure 4. Age dynamics of children sensitization to the components of a chicken egg, where f1+/f75+ is the frequency of sensitization to white and yolk together, f1+/f75- is the frequency of monosensitization to white

Note. The total frequency of sensitization to chicken egg are also shown at the figure. *, statistically significant differences in the frequency of mono- and co sensitization in patients of the same age range.

снижалась (12,5%, $p = 0,006$ и 11,7%, $p = 0,002$ соответственно) по сравнению с детьми 1-2 лет.

В группах детей старше 6 лет статистически значимо снижалась частота сенсibilизации к куриному яйцу по сравнению с детьми младшего возраста ($p < 0,05$ для всех групп пациентов), данные приведены на рисунке 4. Отмеченное изменение происходило как за счет уменьшения числа ко-сенсibilизированных, так и числа моносенсibilизированных пациентов (рис. 4). Наименьшее число пациентов, сенсibilизированных к желтку и белку куриного яйца, выявлено в группе детей старше 14 лет.

В отношении выраженности IgE-ответа на f1 и f75 также была показана возрастная динамика, направленная на снижение интенсивности уровня IgE с возрастом. Как ранее нами было описано [3], у детей старшего возраста число высокoпозитивных ответов на белок куриного яйца снижалось и увеличивалась доля пациентов со средним или низким уровнем IgE к f1. У детей старше 12 лет не встречались IgE к f1, соответствующие VI классу сенсibilизации ($\text{IgE} > 100,0 \text{ кЕ/л}$), а у детей старше 14 лет уровень данных антител не превышал 50,0 кЕ/л (V класс).

Аналогичная тенденция наблюдалась нами для параметра IgE к f75. Высокoпозитивный ответ (VI класс, $\text{IgE} > 100,0 \text{ кЕ/л}$) был крайне редкий, обнаружен только у одного пациента в возрасте 4,5 лет. Уровни антител, соответствующие V классу сенсibilизации (50,0-99,9 кЕ/л), не выявлялись у детей старше 8 лет и отсутствовали у детей первого года жизни. IV класс сенсibilизации (17,0-49,9 кЕ/л) также обнаружен преимущественно у детей младше 8 лет, не встречался у детей старше 14 лет. У пациентов старше 6 лет преобладали значения IgE к f75, не превышающие 3,5 кЕ/л.

Данные представлены на рисунке 5.

Анализ IgE-ответа на аллергены куриного яйца в зависимости от пола показал, что у детей обоих полов IgE-ответ на цельные экстракты аллергенов куриного яйца (белка, желтка) является сходным. Статистически значимые различия между IgE-ответом мальчиков и девочек выявлены только в группах детей старше 14 лет и только в отношении IgE-ответа на аллергены белка куриного яйца: частота позитивного IgE-ответа была статистически значимо ниже у девочек старше 14 лет по сравнению с мальчиками того

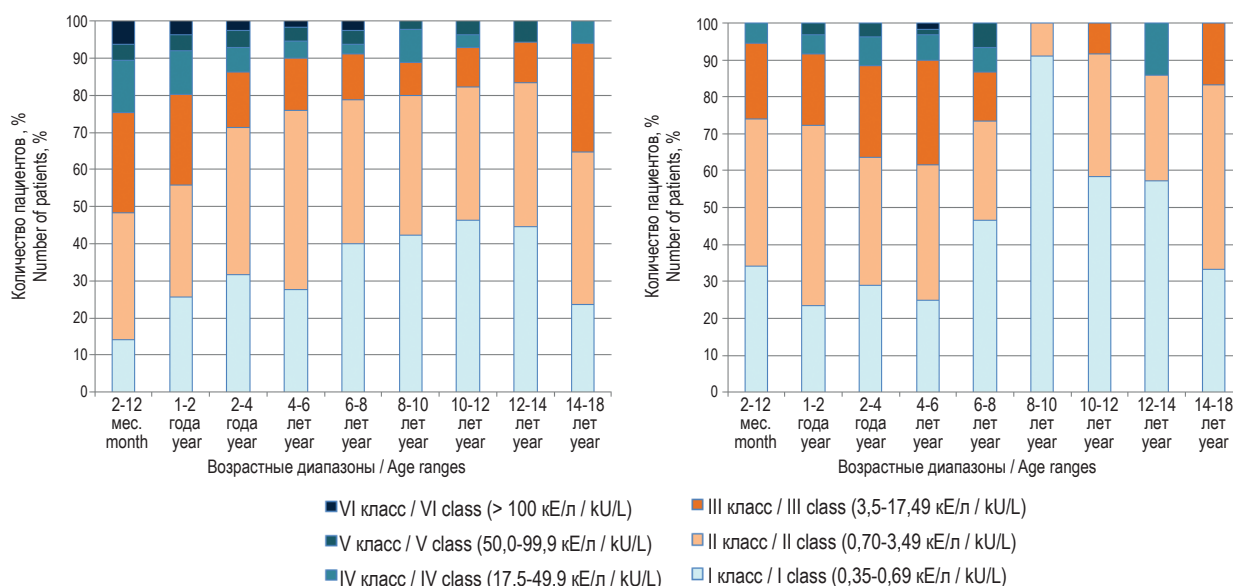


Рисунок 5. Выраженность сенсibilизации к белку и желтку куриного яйца у детей различных возрастов.

Figure 5. Severity of sensitization to white egg and yolk of a chicken egg in children of different ages

же возраста. В то же время возрастная динамика IgE-ответа на желток куриного яйца была одинакова у мальчиков и девочек. Данные представлены на рисунке 6.

Мы обнаружили, что 437 девочек (29,4%) имели IgE-антитела хотя бы к одному из компонентов куриного яйца. При этом ни у одной девочки не выявлена моносенсibilизация к желтку куриного яйца.

Позитивный IgE-ответ наиболее часто встречался у девочек первого года жизни, а у девочек 1-6 лет был значимо ниже ($p = 0,014$, $p = 0,016$, $p = 0,002$). У девочек 6-12 лет частота сенсibilизации была сходной между группами, но значимо ниже, чем в группах детей младше 6 лет ($p = 0,002$, $p = 0,001$, $p = 0,001$). Девочки 12-14 лет и 14-18 лет статистически значимо реже были сенсibilизированы к куриному яйцу по сравнению с девочками младшего возраста ($p = 0,001$ для всех сравниваемых групп).

У девочек 6-12 месяцев чаще встречалась косенсibilизация, чем моносенсibilизация ($p < 0,05$). У девочек 1-2 лет число случаев косенсibilизации и моносенсibilизации значимо не отличалось ($p > 0,05$). А у девочек старше 2 лет число случаев моносенсibilизации было значимо больше, чем случаев косенсibilизации ($p < 0,05$ для всех сравниваемых групп).

Между группами девочек 2-4 лет и 4-6 лет отсутствовали значимые различия в частоте моносенсibilизации (22,4% и 20,8% соответственно), а также в частоте косенсibilизации (11,0% и 10,6% соответственно), а моносенсibilизация встречалась значимо чаще ($p = 0,002$, $p = 0,001$).

Среди девочек 6-8 лет и 8-10 лет косенсibilизированы были 10,5% и 10,1%, а моносенсibilизированы 14,0% и 11,9% соответственно. Девочки 10-12 лет сохранили тенденцию к уменьшению общего количества положительных ответов на куриное яйцо: число случаев моносенсibilизации — 12,1%, косенсibilизации — 9,5%. У девочек 12-14 лет и 14-18 лет была отмечена наименьшая частота косенсibilизации (4,0% и 4,1%), а также моносенсibilизации (10,0% и 5,5% соответственно). Данные представлены на рисунке 6.

Аналогичная тенденция показана для мальчиков: IgE к аллергенам куриного яйца выявлены у 517 пациентов (32,7%); сочетанное выявление IgE антител к белку и к желтку отмечено у 14,0% пациентов; IgE только к белку куриного яйца имели 18,6% пациентов. Выявлен один ребенок в возрасте 11 лет, имеющий антитела только к желтку куриного яйца при отсутствии антител к белку (IgE f75 = 0,93, что соответствует II классу сенсibilизации).

Как и среди девочек, у мальчиков наибольшее число случаев сенсibilизации к куриному яйцу выявлено на первом году жизни (43,1%); пациенты 1-2 лет, 2-4 лет и 4-6 лет были сенсibilизированы к куриному яйцу в 37,0%, 37,1% и 35,0% соответственно. Значимо ниже частота сенсibilизации к куриному яйцу была выявлена у мальчиков 6-8 лет (24,2%) по сравнению с детьми младших возрастных диапазонов. У мальчиков 8-10 лет, 10-12 лет, 12-14 лет, частота сенсibilизации была значимо ниже по сравнению с детьми старшего и младшего возрастов (18,4%, 19,5%, 19,6% случаев сенсibilизации соответственно,

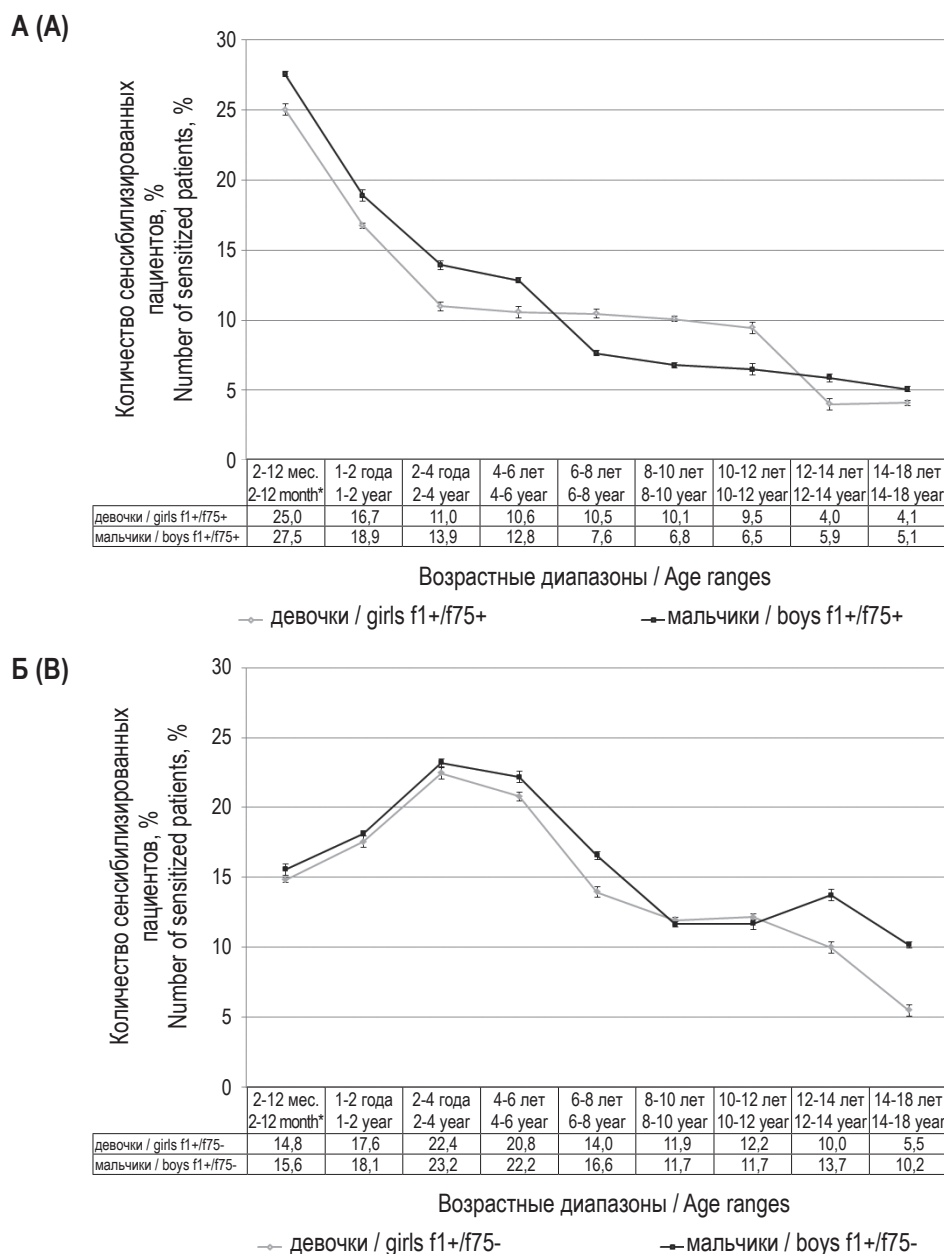


Рисунок 6. А – частота косенситизации к белку и желтку куриного яйца у детей различных возрастов в зависимости от пола, где f1+/f75+ – частота косенситизации к белку и желтку. Б – частота моносенсибилизации к белку куриного яйца у детей различных возрастов в зависимости от пола, где f1+/f75- – частота моносенсибилизации к белку

Figure 6. A, the frequency of co-sensitization to egg white and yolk in children of different ages, depending on gender, where f1+/f75+ is the frequency of sensitization to white and yolk together. B, the frequency of monosensitization to egg white and yolk in children of different ages, depending on gender, where f1+/f75- is the frequency of monosensitization to white

$p < 0,05$), но значимо не изменялась между указанными группами. В группе детей старше 14 лет выявлено наименьшее количество сенситизированных к куриному яйцу пациентов среди мальчиков (15,3%).

У мальчиков разных возрастных диапазонов, так же как и у девочек, отмечено разное число случаев моносенсибилизации к белку и коенси-

билизации к белку и желтку куриного яйца. Данные представлены на рисунках 5 и 6. У пациентов первого года жизни чаще встречалась сочетанная сенситизация (27,5%), чем моносенсибилизация к белку (15,6%) ($p = 0,001$). У мальчиков второго года жизни число случаев коенсибиизации и моносенсибилизации значимо не отличалось (18,9% и 18,1% соответственно). У детей старше-

го возраста статистически значимо чаще выявлялась моносенсибилизация к белку куриного яйца по сравнению с косенсибилизацией: моносенсибилизация к белку куриного яйца встречалась в 23,2%, 22,2%, 16,6% случаях у детей 2-4 лет, 4-6 лет, 6-8 лет соответственно, а косенсибилизация — в 13,9%, 12,8%, 7,6% соответственно.

У мальчиков старше 8 лет число случаев моносенсибилизации было ниже, по сравнению с детьми младшего возраста, а также отсутствовала статистически значимая разница в частоте сенсibilизации у детей 8-10 лет, 10-12 лет, 12-14 лет, 14-18 лет (6,8%, 6,5%, 5,9%, 5,1% — косенсибилизированы, 11,7%, 11,7%, 13,7%, 10,2% — моносенсибилизированы соответственно).

Обсуждение

Сенсибилизация к куриному яйцу и отдельным его компонентам является широко распространенным явлением у пациентов с пищевой аллергией и/или в сочетании с атопическим дерматитом. Согласно результатам нашего исследования более 30% детей с симптомами пищевой аллергии, такими как тошнота, рвота, расстройство стула, отеки слизистых, крапивница, экзема, развивающиеся после приема пищи, имеют клинически значимые уровни IgE к различным компонентам куриного яйца. Полученные нами данные согласуются с материалами обзорной работы, в которой показано, что пищевая аллергия к куриному яйцу встречается у 25-77% детей, страдающих атопическим дерматитом [4, 14]. При изучении возрастной динамики сенсибилизации детей нами было выявлено: наибольшее число пациентов, имеющих клинически значимые уровни IgE к различным компонентам куриного яйца, встречается среди детей первого года жизни. Полученные нами результаты согласуются с результатами работы А.Н. Пампуры, в которой отмечено, что аллергия к куриному яйцу является приблизительно у 1,5-2% детей первых 3 лет жизни [2]. В то же время у детей старше 14 лет частота сенсибилизации к компонентам куриного яйца была наименьшая.

Нами показано, что с возрастом снижается не только частота позитивных IgE-ответов, но и его интенсивность. Ранее мы изучили IgE-ответ на белок куриного яйца, и показали, что наибольшее число пациентов с крайне высокой и высокой степенью сенсибилизации встречается в дошкольном возрасте [3]. Аналогичная тенденция выявлена и для IgE-ответа на желток куриного яйца: выраженность иммунного ответа снижается у детей старше 8 лет, отсутствуют предельно высокие значения IgE к f75, преобладают низкопозитивные и средней степени уровни антител.

В отличие от ряда публикаций [7, 9] нами показана важная роль желтка как источника аллергенов при развитии пищевой аллергии и атопического дерматита у детей даже самого раннего возраста, так, 26,6% детей первого года жизни имели сенсибилизацию к желтку куриного яйца. При этом роль желтка как триггера аллергических реакций значительно снижалась у пациентов старших возрастных диапазонов и была минимальна для детей в возрасте 14-18 лет.

Кроме того, мы обнаружили, что случаи моносенсибилизации к желтку крайне редки. Частота выявления клинически значимых уровней IgE к желтку при отсутствии антител к белку куриного яйца составляет только 0,1% среди сенсибилизированных пациентов.

Обнаруженная нами зависимость частоты и интенсивности позитивных IgE-ответов на желток и на белок куриного яйца от возраста детей может объясняться возможностью ранней сенсибилизации, при которой первичный контакт пациента с аллергеном происходит внутриутробно или в период грудного вскармливания, а повторный контакт и развитие клинических симптомов — при введении в рацион ребенка прикорма, в том числе желтка. Наши данные согласуются с данными работы Vance G.H. и соавт., которые показали, что сенсибилизация к куриному яйцу у ребенка может происходить внутриутробно и при грудном вскармливании [12]. Этим фактом может объясняться более высокая частота встречаемости моносенсибилизации (к белку) и косенсибилизации (к белку и желтку) у детей первого года жизни.

Обращает на себя внимание наличие выраженного перекреста в частоте позитивного IgE-ответа на разные аллергены куриного яйца у детей первых двух лет жизни. У детей 6-12 месяцев преобладает косенсибилизация над моносенсибилизацией, а у пациентов 1-2 лет число случаев косенсибилизации значимо снижается и становится равным числу моносенсибилизаций. При этом число случаев моносенсибилизации к белку у детей первого и второго года жизни значимо не отличается. Затем, у детей 2-4 лет и 4-6 лет отмечается рост числа случаев моносенсибилизации, но еще больше снижается число случаев косенсибилизации, так что общее число позитивных IgE-ответов на куриное яйцо в данных возрастных группах остается прежним. И только у детей старше 6 лет снижается частота как косенсибилизаций, так и моносенсибилизаций. Таким образом, минимальная частота сочетанной сенсибилизации к желтку и белку, моносенсибилизации к белку отмечается у детей старше 14 лет.

Отмеченные явления не зависят от пола детей, за исключением детей старше 14 лет, в группе ко-

торых число случаев моноенсибилизации значимо ниже у девочек по сравнению с мальчиками того же возраста. Наблюдаемые нами значимое снижение распространенности в циркуляции и количества IgE антител к белку и к желтку куриного яйца у детей старше 6 лет позволяет предполагать развитие толерантности к данному пищевому продукту.

Заключение

Снижение частоты и интенсивности IgE-ответов к компонентам куриного яйца, как к белку, так и желтку у пациентов с пищевой аллергией и атопическим дерматитом, наблюдается у детей старших возрастных групп относительно групп детей первых лет жизни. С возрастом наблюдается прогрессивное уменьшение числа коенсибилизированных пациентов. Число моноенсибилизированных детей сначала повышается

в группах детей 2-6 лет, а у детей старше 6 лет снижается. Максимальная распространенность и интенсивность IgE-ответов на белок и желток куриного яйца у детей первого года жизни свидетельствует о крайне раннем контакте пациента с аллергеном. Наблюдается снижение числа IgE-позитивных пациентов к подростковому возрасту, что может свидетельствовать о формировании иммунологической толерантности как к желтку, так и к белку куриного яйца. Однако остается открытым вопрос приверженности пациентов элиминационной диете и вопрос изучения иммунных механизмов аллергических реакций. Несмотря на значительное снижение распространенности аллергии на куриное яйцо у детей старшего возраста, у ряда пациентов сохраняется персистирующая аллергия, что требует дополнительных исследований механизмов формирования иммунного ответа на аллергены с возрастом.

Список литературы / References

1. Варламов Е.Е., Пампура А.Н., Окунева Т.С. Диагностическое значение пероральных провокационных проб у детей с атопическим дерматитом // Российский вестник перинатологии и педиатрии, 2012. Т. 6. С. 37-41. [Varlamov E.E., Pampura A.N., Okuneva T.S. Diagnostic possibilities of open oral challenge tests in children with atopic dermatitis. *Rossiyskiy vestnik perinatologii i pediatrii = Russian Bulletin of Perinatology and Pediatrics*, 2012, Vol. 6, pp. 37-41. (In Russ.)]
2. Пампура А.Н., Варламов Е.Е., Конюкова Н.Г. Пищевая аллергия у детей раннего возраста // Педиатрия. Журнал им. Г.Н. Сперанского, 2016. Т. 95, № 3. С. 152-157. [Pampura A.N., Varlamov E.E., Konjukova N.G. Food allergy in infants. *Pediatriya. Zhurnal im. G.N. Speranskogo = Pediatrics. G. Speransky Journal*, 2016, Vol. 95, no. 3, pp. 152-157. (In Russ.)]
3. Сновская М.А., Семикина Е.Л., Макарова С.Г., Ерешко О.А., Ясаков Д.С., Галимова А.А. Возрастные особенности сенсibilизации к белку куриного яйца у детей с пищевой аллергией // Российский аллергологический журнал, 2022. Т. 19, № 4. С. 460-471. [Snovskaya M.A., Semikina E.L., Makarova S.G., Ereshko O.A., Yasakov D.S., Galimova A.A. Age-related features of sensitization to chicken egg protein in children with food allergies. *Rossiyskiy allergologicheskiy zhurnal = Russian Allergology Journal*, 2022, Vol. 19, no. 4, pp. 460-471. (In Russ.)]
4. Федотова М.М., Федорова О.С., Коновалова У.В., Федотова М.М., Федорова О.С., Коновалова У.В., Камалтынова Е.М., Нагаева Т.А., Огородова Л.М. Пищевая аллергия к куриному яйцу: обзор современных исследований // Бюллетень сибирской медицины, 2018. Т. 17, № 2. С. 156-166. [Fedotova M.M., Fedorova O.S., Konovalova U.V., Fedotova M.M., Fedorova O.S., Konovalova U.V., Kamaltynova E.M., Nagaeva T.A., Ogorodova L.M. Hen's egg allergy: an update. *Byulleten sibirskoy meditsiny = Bulletin of Siberian Medicine*, 2018, Vol. 17, no. 2, pp. 156-166. (In Russ.)]
5. Dhanapala P., Doran T., Tang M.L.K., Suphioglu C. Production and immunological analysis of IgE reactive recombinant egg white allergens expressed in *Escherichia coli*. *Mol. Immunol.*, 2015, Vol. 65, no. 1, pp. 104-112.
6. Gray C.L., Levin M.E., du Toit G. Egg sensitization, allergy and component patterns in African children with atopic dermatitis. *Pediatr. Allergy Immunol.*, 2016, Vol. 27, no. 7, pp. 709-715.
7. Kovacs-Nolan J., Phillips M., Mine Y. Advances in the value of eggs and egg components for human health. *J. Agric. Food Chem.*, 2005, Vol. 53, pp. 8421-8431.
8. Mine Y., Yang M. Recent advances in the understanding of egg allergens: basic, industrial, and clinical perspectives. *J. Agric. Food Chem.*, 2008, Vol. 56, no. 13, pp. 4874-4900.
9. Palmer D.J., Metcalfe J., Makrides M., Gold M.S., Quinn P., West C.E., Loh R., Prescott S.L. Early regular egg exposure in infants with eczema: A randomized controlled trial. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2013, Vol. 132, pp. 3873-3892.
10. Peters R.L., Koplin J.J., Gurrin L.C., Dharmage S.C., Wake M., Ponsonby A.L., Tang M.L.K., Lowe A.J., Matheson M., Dwyer T., Allen K.J. The prevalence of food allergy and other allergic diseases in early childhood in a population-based study: HealthNuts age 4-year follow-up. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2017, Vol. 140, no. 1, pp. 1451-1453.

11. Urisu A., Kondo Y., Tsuge I. Hen's egg allergy. *Chem. Immunol. Allergy*, 2015, Vol. 101, pp. 124-130.
12. Vance G.H., Lewis S.A., Grimshaw K.E., Wood P.J., Briggs R.A., Thornton C.A., Warner J.O. Exposure of the fetus and infant to hens' egg ovalbumin via the placenta and breast milk in relation to maternal intake of dietary egg. *Clin. Exp. Allergy*, 2005, Vol. 35, no. 10, pp. 1318-1326.
13. Wei-Liang Tan J., Valerio C., Barnes E.H., Turner P.J., Van Asperen P.A., Kakakios A.M., Campbell D.E. Beating Egg Allergy Trial (BEAT) Study Group. A randomized trial of egg introduction from 4 months of age in infants at risk for egg allergy. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2017, Vol. 139, no. 5, pp. 1621-1628.
14. Withanage-Dona D., Suphioglu C. Egg Allergy: Diagnosis and immunotherapy. *Int. J. Mol. Sci.*, 2020, Vol. 21, no. 14, pp. 5010-5045.

Авторы:

Сновская М.А. — к.м.н., ведущий научный сотрудник
ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский
центр здоровья детей» Министерства здравоохранения
РФ, Москва, Россия

Семикина Е.Л. — д.м.н., заведующая лабораторным
отделом ФГАУ «Национальный медицинский
исследовательский центр здоровья детей»
Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Макарова С.Г. — д.м.н., заместитель директора по
научной работе ФГАУ «Национальный медицинский
исследовательский центр здоровья детей»
Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Петричук С.В. — д.б.н., главный научный сотрудник
ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский
центр здоровья детей» Министерства здравоохранения
РФ, Москва, Россия

Курбатова О.В. — к.м.н., и.о. заведующего
лабораторией экспериментальной иммунологии
и вирусологии ФГАУ «Национальный медицинский
исследовательский центр здоровья детей»
Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Жужула А.А. — младший научный сотрудник ФГАУ
«Национальный медицинский исследовательский центр
здоровья детей» Министерства здравоохранения РФ,
Москва, Россия

Ерешко О.А. — к.м.н., старший научный сотрудник
ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский
центр здоровья детей» Министерства здравоохранения
РФ, Москва, Россия

Галимова А.А. — младший научный сотрудник ФГАУ
«Национальный медицинский исследовательский центр
здоровья детей» Министерства здравоохранения РФ,
Москва, Россия

Authors:

Snovskaya M.A., PhD (Medicine), Leading Research
Associate, National Medical Research Center for Children's
Health, Moscow, Russian Federation

Semikina E.L., PhD, MD (Medicine), Head, Laboratory
Department, National Medical Research Center for Children's
Health, Moscow, Russian Federation

Makarova S.G., PhD, MD (Medicine), Deputy Director for
Research, National Medical Research Center for Children's
Health, Moscow, Russian Federation

Petrichek S.V., PhD, MD (Medicine), Chief Research
Associate, National Medical Research Center for Children's
Health, Moscow, Russian Federation

Kurbatova O.V., PhD (Medicine), Acting Head, Laboratory
of Experimental Immunology and Virology, National Medical
Research Center for Children's Health, Moscow, Russian
Federation

Zhuzhula A.A., Junior Research Associate, National Medical
Research Center for Children's Health, Moscow, Russian
Federation

Ereshko O.A., PhD (Medicine), Senior Research Associate,
National Medical Research Center for Children's Health,
Moscow, Russian Federation

Galimova A.A., Junior Research Associate, National Medical
Research Center for Children's Health, Moscow, Russian
Federation

Поступила 17.01.2024
Принята к печати 09.03.2024

Received 17.01.2024
Accepted 09.03.2024

АНТИТЕЛА К ЛИПОПРОТЕИНАМ НИЗКОЙ ПЛОТНОСТИ, МОДИФИЦИРОВАННЫМ МАЛОНОВЫМ ДИАЛЬДЕГИДОМ: СОДЕРЖАНИЕ В КРОВИ И РОЛЬ В АТЕРОГЕНЕЗЕ

Иванова А.А., Дмитриева А.А., Денисенко А.Д.

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

Резюме. В настоящей работе было определено содержание антител к липопротеинам низкой плотности, модифицированным малоновым диальдегидом, концентрация холестерина циркулирующих иммунных комплексов и количество перекисно-модифицированных липопротеинов низкой плотности в крови здоровых лиц и пациентов с различными проявлениями атеросклероза. Кроме того, изучалось влияние антител к липопротеинам низкой плотности, модифицированным малоновым диальдегидом на взаимодействие таких липопротеинов с макрофагами. Всего обследовано 253 человека: здоровые лица (59 человек), пациенты с доклиническим атеросклерозом (25 человек) и пациенты с ишемической болезнью сердца (169 человек). Установлено, что у пациентов с ишемической болезнью сердца по сравнению со здоровыми лицами и пациентами с доклиническим атеросклерозом повышена концентрация холестерина циркулирующих иммунных комплексов в крови, тогда как содержание окисленных липопротеинов низкой плотности не различалось между группами обследованных. При этом у пациентов с атеросклерозом выявлена положительная корреляция между уровнями в крови окисленных липопротеинов низкой плотности и холестерина циркулирующих иммунных комплексов. Содержание в крови антител класса IgG к липопротеинам низкой плотности, модифицированным малоновым диальдегидом, достоверно снижено у больных с ишемической болезнью сердца по сравнению со здоровыми лицами и пациентами с доклиническим атеросклерозом, тогда как концентрация таких антител класса IgM практически не изменялось у пациентов с атеросклерозом, независимо от его тяжести. Было показано, что специфичные антитела к липопротеинам низкой плотности, модифицированным малоновым диальдегидом, значительно снижали цитотоксичность таких ЛПНП, а также их способность вызывать накопление эфиров холестерина в макрофагах, полученных из мононуклеаров периферической крови человека. Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что антилипидные антитела могут оказывать защитное действие, предупреждая гибель клеток и снижая накопление эфиров холестерина в макрофагах при их взаимодействии с модифицированными липопротеинами низкой плотности, т. е. предупреждать формирование пенных клеток.

Ключевые слова: воспаление, атеросклероз, циркулирующие иммунные комплексы, модифицированные липопротеины низкой плотности, антитела к модифицированным липопротеинам низкой плотности, апоптоз макрофагов

Адрес для переписки:

Иванова Анна Андреевна
ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины»
197022, Россия, Санкт-Петербург,
ул. Академика Павлова, 12.
Тел.: 8 (812) 234-93-41.
E-mail: anna.ivatcova@gmail.com

Address for correspondence:

Anna A. Ivanova
Institute of Experimental Medicine
12 Acad. Pavlov St
St. Petersburg
197022 Russian Federation
Phone: +7 (812) 234-93-41.
E-mail: anna.ivatcova@gmail.com

Образец цитирования:

А.А. Иванова, А.А. Дмитриева, А.Д. Денисенко
«Антитела к липопротеинам низкой плотности,
модифицированным малоновым диальдегидом:
содержание в крови и роль в атерогенезе»
// Медицинская иммунология, 2025. Т. 27, № 1.
С. 131-142. doi: 10.15789/1563-0625-ATL-2955

© Иванова А.А. и соавт., 2025

Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

A.A. Ivanova, A.A. Dmitrieva, A.D. Denisenko
“Antibodies to low-density lipoproteins modified by malonic dialdehyde:
contents in blood and role in atherogenesis”, *Medical
Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2025,
Vol. 27, no. 1, pp. 131-142.
doi: 10.15789/1563-0625-ATL-2955

© Ivanova A.A. et al., 2025

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

DOI: 10.15789/1563-0625-ATL-2955

ANTIBODIES TO LOW-DENSITY LIPOPROTEINS MODIFIED BY MALONIC DIALDEHYDE: CONTENTS IN BLOOD AND ROLE IN ATHEROGENESIS

Ivanova A.A., Dmitrieva A.A., Denisenko A.D.

Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

Abstract. In this work, we determined the content of antibodies to low-density lipoproteins modified by malondialdehyde, the concentration of circulating immune complexes (CIC) cholesterol and oxidized low-density lipoproteins (LDL) in blood of healthy individuals and patients with various manifestations of atherosclerosis. Moreover, we studied the effect of antibodies to LDL modified with malondialdehyde upon interaction of such lipoproteins with macrophages. 253 persons were examined: healthy individuals (59 people), patients with preclinical atherosclerosis (25 people) and patients with coronary artery disease (169 people). It was found that the concentration of CIC cholesterol in plasma was increased in patients with coronary artery disease compared with healthy individuals and patients with preclinical atherosclerosis, whereas oxidized low-density lipoproteins content did not differ between the groups of patients. At the same time, a positive correlation between oxidized LDL plasma concentrations and contents of CIC cholesterol was found in patients with atherosclerosis. The plasma level of IgG antibodies to malondialdehyde-modified lipoproteins was significantly reduced in patients with coronary artery disease compared with healthy people and patients with preclinical atherosclerosis, whereas the levels of IgM antibodies to malondialdehyde-modified LDL practically did not change in patients with atherosclerosis, independent on the disease severity. It was shown that specific antibodies to the malon dialdehyde-modified LDL caused vast reduction of their cytotoxicity and ability to induce accumulation of cholesterol esters in macrophages derived from human peripheral blood mononuclear cells. Thus, the data obtained suggest that anti-lipoprotein antibodies may have a protective effect by preventing cell death and reducing accumulation of cholesterol esters in macrophages when they interact with modified low-density lipoproteins, i.e., by preventing formation of the foam cells.

Keywords: *inflammation, atherosclerosis, circulating immune complexes, low-density lipoproteins, modified, antibodies, macrophage apoptosis*

Работа выполнена по госзаданию (шифр № FGWG-2022-0003).

Введение

Воспаление, развивающееся в ответ на накопление в интиме модифицированных липопротеинов низкой плотности (мЛПНП), является ведущим патогенетическим фактором атеросклероза. Индукция иммунного ответа на мЛПНП, вследствие захвата мЛПНП макрофагами или дендритными клетками с презентацией антигенов *in situ* ведет к формированию асептического воспалительного очага в интиме артерии с привлечением разнообразных иммунокомпетентных клеток, т. е. атеросклеротического поражения. Модификация липопротеинов низкой плотности (ЛПНП) может происходить не только в интиме артерий, но и в других тканях, в том числе и в крови. Иммунный ответ на мЛПНП приводит к появлению циркулирующих антител (АТ) к ним и формированию циркулирующих иммунных комплексов липопротеин-антитело. Однако

физиологическая и/или патогенетическая роль антилипопротеиновых АТ изучена недостаточно.

В крови человека обнаружен достаточно широкий спектр мЛПНП, среди них модифицированные малоновым диальдегидом [14], ацетилированные [10], гипохлорированные [5], окисленные [31], малеилированные [3], карбамоилированные [15], десиалированные [26], гликированные [35] и т. д.

В нашей работе мы сфокусировали наше внимание на изучении АТ к ЛПНП, модифицированных малоновым диальдегидом (МДА-ЛПНП).

Одним из продуктов реакции перекисного окисления липидов является малоновый диальдегид, который несет в себе две альдегидные группы и может способствовать появлению молекулярных кросс-сшивок, вступая в реакцию с аминокислотными группами лизина или реже тирозина. Высокое содержание МДА-ЛПНП в крови является маркером тяжести течения и прогрессирования [37, 38] атеросклероза и его клинических проявлений. МДА-ЛПНП также были обнару-

жены в атеросклеротических поражениях артерий [3].

В настоящей работе представлены данные о содержании АТ к МДА-ЛПНП и холестерина циркулирующих иммунных комплексов (ХС-ЦИК) в крови пациентов с различной выраженностью атеросклероза, а также о влиянии специфических АТ на цитотоксичность МДА-ЛПНП и их способность вызывать накопление холестерина (ХС) и его эфиров в макрофагах.

Материалы и методы

Пациенты

Всего было обследовано 253 человека в возрасте от 27 до 67 лет. Первую группу обследованных составили здоровые лица (59 человек). Во вторую группу вошли 25 человек с доклиническим атеросклерозом, у которых атеросклеротические бляшки в сонной и бедренной артериях были выявлены с помощью ультразвукового исследования, но отсутствовали клинические проявления атеросклероза. Третья группа – 169 пациентов с

ишемической болезнью сердца (ИБС), верифицированной коронарографией). Клиническая характеристика обследованных пациентов представлена в таблице 1.

Выделение ЛПНП

ЛПНП выделяли из плазмы крови человека с помощью последовательного ультрацентрифугирования (100 000 g) в градиенте плотности NaBr ($d = 1,025-1,055$ г/мл) [17] с последующим диализом против фосфатно-солевого буфера (ФСБ) при 4 °С в течение 48 часов с однократной сменой буфера. Содержание белка в ЛПНП определяли по методу Лоури–Фолина в модификации Марквелла [22].

Модификация ЛПНП и человеческого сывороточного альбумина

Как было показано ранее, при химической модификации различных белков (аполипопротеины, альбумин и т. д.) формируются одинаковые антигенные эпитопы. Это позволяет использовать для обнаружения антител к модифицированным ЛПНП модифицированный *in*

ТАБЛИЦА 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ОБСЛЕДОВАННЫХ ПАЦИЕНТОВ: Me ($Q_{0,25}-Q_{0,75}$); ПОЛ – ЧИСЛО ПАЦИЕНТОВ (% ОТ ОБЩЕГО ЧИСЛА)

TABLE 1. CHARACTERISTICS OF THE EXAMINED PATIENTS: Me ($Q_{0,25}-Q_{0,75}$); GENDER, NUMBER OF PATIENTS (% OF TOTAL)

	Здоровые лица Healthy individuals (n = 59)	Пациенты с доклиническим атеросклерозом Patients with preclinical atherosclerosis (n = 25)	Пациенты с ИБС Patients with CAD (n = 169)
Возраст Age	41 (38-43)*	44 (41-46)*	60 (55-62)
Пол Gender	М: 59 (100%)	М: 25 (100%)	М: 108 (64%) Ж/Ф: 61 (36%)
Индекс массы тела Body mass index	27,8 (24,8-30,7)	26,9 (24,0-30,4)	26,22 (24,9-27,9)
Инфаркт миокарда в анамнезе Myocardial infarction	–	–	72 (43%)
Общий холестерин, ммоль/л Total Cholesterol, mmol/L	5,2 (4,7-6,1)#	5,4 (4,5-6,0)#	6,25 (5,6-6,6)
ЛПНП, ммоль/л LDL, mmol/L	3,2 (2,7-3,9)&	3,1 (2,5-3,7)&	4,2 (3,9-4,8)
ЛПВП, ммоль/л HDL, mmol/L	1,1 (1,0-1,6)^	1,2 (0,9-1,5)	1,3 (1,1-1,6)
Триглицериды, ммоль/л Triglycerides, mmol/L	1,33 (1,04-2,20)	1,4 (0,9-2,9)	1,63 (1,3-1,8)

Примечание. ЛПВП – липопротеины высокой плотности. Достоверное отличие от пациентов с ИБС: * – $p < 0,0001$; # – $p < 0,001$; & – $p < 0,0001$; ^ – $p = 0,02$.

Note. CAD, coronary artery disease; LDL, low density lipoprotein; HDL, high density lipoprotein. Significant difference from patients with CAD: *, $p < 0.0001$; #, $p < 0.001$; &, $p < 0.0001$; ^, $p = 0.02$.

vitro сывороточный альбумин человека [3]. МДА-модификацию ЛПНП и человеческого сывороточного альбумина (ЧСА, Sigma, США) проводили свежеприготовленным раствором 0,5 М МДА (6,6 мкл на 1 мг белка) [27], полученного в ходе кислотного гидролиза 1,1,3,3-тетраметоксипропана. Смесь инкубировали 2 часа при комнатной температуре, затем диализовали против ФСБ при 4 °С в течение 24 часов. Степень модификации оценивали по убыли поверхностных аминогрупп, определяемых с помощью тринитробензолсульфоновой кислоты [13].

Аффинная хроматография

Приготовление ЧСА-сефарозы: CNBr-сефарозу 4В (Pharmacia Fine Chemicals, Швеция) замачивали на 1 час в 0,001 М HCl. Гель промывали на стеклянном фильтре 0,001 М HCl, а затем дистиллированной водой. После промывки гель заливали 0,1 М бикарбонатным буфером (pH = 8,0), в котором предварительно растворяли 2 мг ЧСА. Смесь инкубировали 18-20 часов при +4 °С, дважды отмывали бикарбонатным буфером. Промытый гель заливали 1 М раствором этаноламина, инкубировали 2 часа при комнатной температуре, после чего гель заливали 0,1 М ацетатным буфером (pH = 4,0) на ночь. Затем гель промывали три раза поочередно 0,1 М ацетатным и 0,1 М боратным (pH = 8,0) буферами и уравнивали 0,01 М ФСБ (pH = 7,4).

Приготовление МДА-ЧСА-сефарозы: модификацию ЧСА, связанного с сефарозой, проводили, как было описано выше, для свободных белков. Для остановки реакции гель промывали ФСБ в объемах, многократно превышающих объем колонки.

Выделение антител из сыворотки крови человека: на колонку с МДА-ЧСА-сефарозой наносили пул сывороток крови пациентов с последующей рециркуляцией сыворотки в течение 6 часов при 4 °С. Колонку промывали раствором ФСБ (pH = 7,4). Элюцию АТ, связавшихся с антигеном, осуществляли с помощью 0,2 М раствора уксусной кислоты (pH = 2,9); pH раствора АТ доводили до 7,4. Для восстановления pH колонки после элюции использовались: 0,1 М ацетатный буфер (pH = 4,0); 0,1 М боратный буфер (pH = 11,0) и ФСБ. Активность АТ проверялась с помощью иммуноферментного анализа.

Иммуноферментный анализ

В качестве антигенов использовали ЛПНП и ЧСА нативные или модифицированные МДА в концентрации 10 мкг/мл по 100 мкл на лунку. После внесения белков в лунки планшеты инкубировали 18 часов при 4 °С после чего отмывали 0,05% раствором (V/V) Tween-20 в 0,01 М ФСБ. После этого лунки блокировали 0,5% (m/V) рас-

твором казеина в течение 1 часа при 37 °С и затем снова промывали. К сорбированным в лунке антигенам добавляли 100 мкл исследуемой плазмы (1:50) или аффинно-выделенных АТ и инкубировали 1 час при 37 °С. После промывки в лунки вносили мышинные моноклональные меченые пероксидазой хрена АТ против IgG и IgM человека («Полигност», Россия) в разведении 1:200. После инкубации в течение 50 минут при 37 °С и промывки лунки заполняли раствором тетраметилбензидина («Хема», Россия) и оставляли на 20 минут при комнатной температуре до развития окраски. Реакцию останавливали с помощью 2 М серной кислоты. Оптическую плотность определяли при 450 нм на автоматическом ридере ELx-800 (BioTek, США). Уровень АТ оценивали по разности оптических плотностей между модифицированными и нативными ЛПНП (ЧСА).

Определение концентрации окисленных ЛПНП

Для определения концентрации окисленных ЛПНП (оксЛПНП) был использован набор Oxidized LDL ELISA (Mercodia, Швеция). Метод основан на сэндвич-варианте иммуноферментного анализа с применением моноклональных АТ к оксЛПНП.

Определение содержания ХС-ЦИК

Циркулирующие иммунные комплексы осаждали с помощью полиэтиленгликоля-6000. С этой целью к сыворотке крови пациентов добавляли 5%-ный раствор (m/V) полиэтиленгликоля-6000 (Fluka, Германия) в соотношении 1:1, перемешивали и инкубировали в течение 30 мин при 4 °С. После чего образцы центрифугировали при 5000 об/мин в течение 20 мин при 4 °С, далее отбирали супернатант. Осадок промывали 2-3 раза 2,5% раствором (m/V) полиэтиленгликоля-6000, центрифугируя после каждой промывки. Осадок растворяли в физиологическом растворе. Концентрацию ХС в осажденных комплексах определяли энзиматическим колориметрическим набором (Randox laboratories LTD, Великобритания)

Культивирование клеток

Мононуклеарные клетки периферической крови (МКПК) выделялись из цельной крови здорового донора центрифугированием с использованием раствора фиколла плотностью 1,077 г/мл (ООО «БиолоТ», Россия). Кровь наслаивалась поверх раствора фиколла (7:3) и центрифугировалась в течение 30 мин при 400 g 18 °С. Кольцо мононуклеаров отбирали в отдельные пробирки и отмывали стерильным раствором Хенкса (ООО «БиолоТ», Россия) с последующим центрифугированием при 300 g 7 минут. После удаления супернатанта МКПК ресуспендировали в культуральной среде RPMI-1640 (ООО «БиолоТ», Россия), содержащей 10% эмбриональной

бычьей сыворотки (HyClone, США), L-глутамин и гентамицин (ООО «БиолоТ», Россия). Клетки высевали на культуральные планшеты и культивировали в CO₂-инкубаторе (5% CO₂, 37 °С). После двухчасовой инкубации и адгезии моноцитов происходила смена среды с добавлением 10 нг/мл макрофагального колониестимулирующего фактора (Gibco, США). На 3-и сутки осуществлялась смена питательной среды.

На 5-е сутки проводилась смена среды на среду, содержащую 2% человеческой сыворотки без липопротеинов (Biowest, Франция), с добавлением следующих агентов: нативных ЛПНП (50 мкг/мл), МДА-ЛПНП (50 мкг/мл), комплексов МДА-ЛПНП со специфичными АТ (избыток АТ, молярное соотношение — аполипопротеин В:АТ 1:5), смесь МДА-ЛПНП с неспецифическим IgG (1:5), смесь нативных ЛПНП с АТ против МДА-ЛПНП или неспецифическим IgG (1:5). Для формирования иммунных комплексов к аффинно-выделенным человеческим АТ против МДА-ЛПНП добавляли различные ЛПНП и инкубировали в течение 1 часа при 37 °С. Инкубацию клеток с указанными веществами проводили в течение 24 часов.

Проточная цитофлуориметрия

После инкубации клетки промывали ФСБ, обрабатывали раствором Accutase® (Sigma, США), инкубировали 10-30 минут при 37 °С и переносили в соответствующие пробирки. Пробирки центрифугировали 7 минут при 330 g, клеточный осадок ресуспендировали в 100 мкл ФСБ, в пробы вносили YO-PRO-1® (Invitrogen, США) и йодистый пропилий (Sigma-Aldrich, США), получая конечную концентрацию красителей 250 нМ и 1 мкг/мл соответственно. Окраску проводили при комнатной температуре в течение 15 минут в защищенном от света месте. По завершении инкубации к образцам добавляли по 200 мкл ФСБ и анализировали на проточном цитофлуориметре Navios™ (Beckman Coulter, США). Для каждого из образцов анализировали не менее 10000 одиночных клеток. Полученные результаты анализировали с использованием программного обеспечения Kaluza™ (Beckman Coulter, США).

Определение содержания холестерина и его эфиров

Клетки промывали охлажденным ФСБ, заливали лизирующим буфером (0,1 М KH₂PO₄, 50 mM NaCl, 5 mM холевая кислота, 0,1% NP-40) и инкубировали 30 минут на качалке при +4 °С. Для определения содержания общего ХС готовили смесь, содержащую 40 μM Amplex Red® (Sigma, США), 2 U/мл пероксидазы хрена (Sigma, США), 0,04 U/мл холестериноксидазы (Sigma, США), 0,2 U/мл холестеринэстеразы (Sigma, США). Для

определения содержания свободного ХС готовили аналогичную смесь без добавления холестеринэстеразы. Флуоресценцию оценивали при 535/587 нм. Содержание эфиров ХС определялось, как разница общего и свободного ХС. Концентрацию белка в клеточных лизатах определяли с помощью бицинхонинового реактива [33].

Методы статистической обработки

Математическая обработка данных проводилась с использованием пакета программ статистического анализа данных Statistica. Для сравнения данных, имеющих непараметрическое распределение, применяли критерии Манна-Уитни и Краскела-Уоллиса. Для установления корреляционной зависимости использовали ранговый коэффициент Спирмана. В случае анализа нормально распределенных данных применяли дисперсионный анализ с апостериорным критерием Тьюки.

Результаты

Уровень антител к МДА-ЛПНП у здоровых лиц и пациентов с атеросклерозом

В первой части нашей работы мы исследовали содержание АТ к МДА-ЛПНП в крови здоровых лиц (n = 59) и пациентов с атеросклерозом, которые были разделены на 2 подгруппы: пациенты с доклиническим атеросклерозом (n = 25) и пациенты с ИБС (n = 169).

Оказалось, что уровень АТ класса IgG к МДА-ЛПНП достоверно снижен в крови пациентов с клинически выраженным атеросклерозом (диагноз ИБС) по сравнению со здоровыми лицами и пациентами с доклиническим атеросклерозом. При этом статистически достоверной разницы содержания циркулирующих АТ класса IgM к МДА-ЛПНП между обследованными группами пациентов не было выявлено (рис. 1).

Среди пациентов с ИБС были выделены лица, перенесшие инфаркт миокарда, количество которых составило 72 человека (43%). В нашем исследовании различий в содержании АТ к МДА-ЛПНП у лиц с ИБС в зависимости от наличия инфаркта миокарда в анамнезе не было выявлено (данные не представлены).

Концентрация ХС-ЦИК в крови здоровых лиц и пациентов с атеросклерозом

В крови и сосудистой стенке присутствуют не только мЛПНП и АТ к ним, но и иммунные комплексы мЛПНП-АТ [1]. В крови содержание таких комплексов можно оценивать по количеству ХС в осажденных иммунных комплексах.

Нами было определено содержание ХС-ЦИК в сыворотке крови обследованных пациентов, результаты представлены на рисунке 2. Концентрация ХС-ЦИК была достоверно повышена у

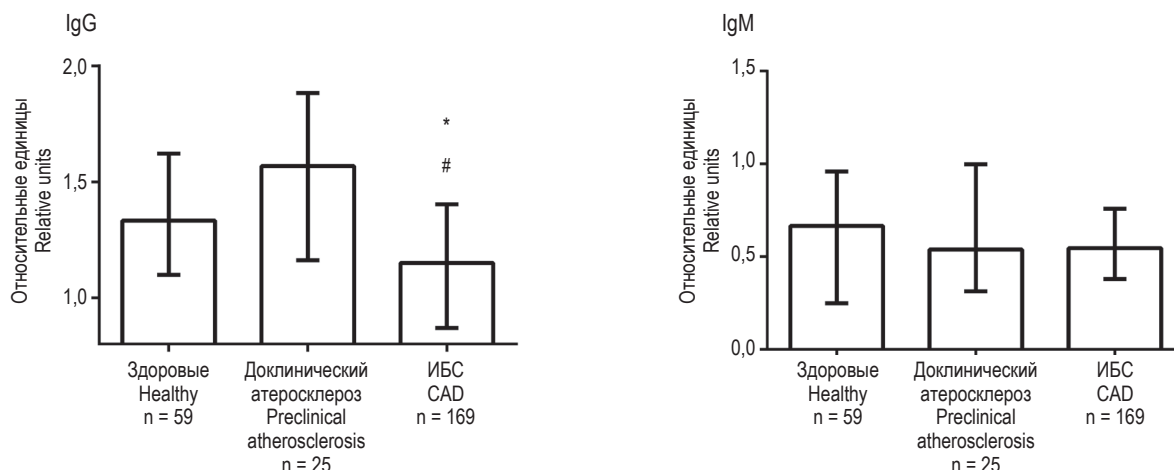


Рисунок 1. Содержание циркулирующих антител (IgG и IgM) к МДА-ЛПНП в плазме здоровых лиц и у пациентов с атеросклерозом

Примечание. Данные представлены: медиана и межквартильные интервалы (Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)); * – достоверное отличие от здоровых лиц, $p = 0,00068$ (критерий Краскела–Уоллиса); # – достоверное отличие от группы «доклинический атеросклероз», $p = 0,0002$ (критерий Краскела–Уоллиса).

Figure 1. Content of IgG antibodies and IgM antibodies in plasma of healthy subjects and patients with atherosclerosis

Note. Data expressed as median and interquartile ranges (Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)); *, significant difference from healthy individuals, $p = 0.00068$ (Kruskal–Wallis test); #, significant difference from patients with preclinical atherosclerosis, $p = 0.0002$ (Kruskal–Wallis test).

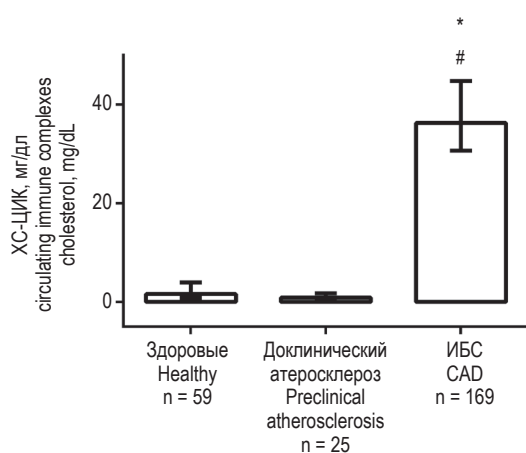


Рисунок 2. Концентрация ХС-ЦИК в плазме здоровых лиц и пациентов с атеросклерозом

Примечание. Данные представлены: медиана и межквартильные интервалы (Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)); * – достоверное отличие от здоровых лиц, $p < 0,0001$ (критерий Краскела–Уоллиса); # – достоверное отличие от группы «доклинический атеросклероз», $p < 0,0001$ (критерий Краскела–Уоллиса).

Figure 2. Concentration of circulating immune complexes cholesterol in plasma of healthy subjects and patients with atherosclerosis

Note. Concentration expressed as median and interquartile ranges (Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)); *, significant difference from healthy individuals, $p < 0.0001$ (Kruskal–Wallis test); #, significant difference from patients with preclinical atherosclerosis, $p < 0.0001$ (Kruskal–Wallis test).

пациентов с ИБС по сравнению со здоровыми лицами и пациентами с доклиническим атеросклерозом, что подтверждает ранее полученные результаты [11].

Выявлено также, что содержание ХС-ЦИК в крови слабо, но достоверно отрицательно коррелирует с уровнем АТ класса IgG к МЛПНП ($r = -0,16$). Следовательно, эти данные позволяют предполагать, что снижение содержания в крови антилипопротеиновых АТ класса G у пациентов с ИБС может быть связано с повышенным формированием циркулирующих иммунных комплексов липопротеин-антитело.

Хотя в настоящей работе не было выявлено существенных корреляций между содержанием циркулирующих АТ к МДА-ЛПНП и уровнем липидов в крови, интерес представляла связь между концентрацией в крови изучаемых АТ и антигенов, которыми являются перекисно-модифицированные ЛПНП (оксЛПНП). При перекисном окислении жирных кислот образуется МДА, который способен вступать во взаимодействие с белковой частью ЛПНП, поэтому мы полагаем, что МДА-ЛПНП являются частью измеряемых нами оксЛПНП. Таким образом, АТ к МДА-ЛПНП могут распознавать эпитопы оксЛПНП. Однако оказалось, что корреляция между содержанием оксЛПНП и уровнем АТ к МДА-ЛПНП отсутствует, но у пациентов с атеросклерозом (как доклиническим, так и с клиническими проявлениями) в отличие от здоро-

вых лиц обнаружена выраженная положительная корреляция между концентрациями ХС-ЦИК и оксЛПНП (табл. 2). При этом следует заметить, что концентрация оксЛПНП достоверно не отличалась среди различных групп, обследованных нами пациентов.

Существует ряд работ, связывающих увеличение концентрации оксЛПНП с риском развития ИБС [4] и предлагающие рассматривать уровень оксЛПНП как маркер ИБС [18]. Однако нельзя исключить, что формирование иммунных комплексов, содержащих оксЛПНП, может занижать определение уровня таких ЛПНП в крови. Кроме того, возможна также конкуренция циркулирующих АТ к мЛПНП с моноклональными АТ коммерческих наборов.

Влияние антител к МДА-ЛПНП на цитотоксичность МДА-ЛПНП

Перекисно-модифицированные ЛПНП, в том числе и МДА-ЛПНП, способны вызывать апоптоз макрофагов [2, 30]. В связи с этим необходимо было выяснить, как специфические антитела влияют на цитотоксичность МДА-ЛПНП.

Исследование цитотоксичности МДА-ЛПНП и их комплексов со специфическими АТ проводили с использованием макрофагов человека, дифференцированных из мононуклеаров периферической крови *in vitro*. После 24-часовой инкубации с МДА-ЛПНП (50 мкг белка/мл), свободными или в комплексе со специфическим антителами человека (молярное соотношение — апополипротеин В:АТ — 1:5), с помощью проточной цитофлуориметрии было оценено количество погибших клеток. Полученные результаты представлены на рисунке 3.

Не вызывает сомнений выраженная цитотоксичность МДА-ЛПНП — менее 50% клеток выжили после инкубации с такими ЛПНП. В то же время формирование иммунного комплекса МДА-ЛПНП-АТ значительно ослабляло способность МДА-ЛПНП вызывать гибель макрофагов. При этом добавление неспецифического IgG не оказывало такого эффекта.

Одним из возможных механизмов цитотоксичности модифицированных ЛПНП может быть избыточное накопление холестерина и его эфиров в макрофагах в результате их нерегулируемого захвата с помощью различных сквенджер-рецепторов [36]. Поэтому необходимо было выяснить, как специфические антитела влияют на захват МДА-ЛПНП (накопление холестерина и его эфиров) макрофагами.

Влияние антител к МДА-ЛПНП на захват МДА-ЛПНП

Захват макрофагами ЛПНП, нативных или МДА-модифицированных, оценивали по накоплению ХС и его эфиров в клетках. Было уста-

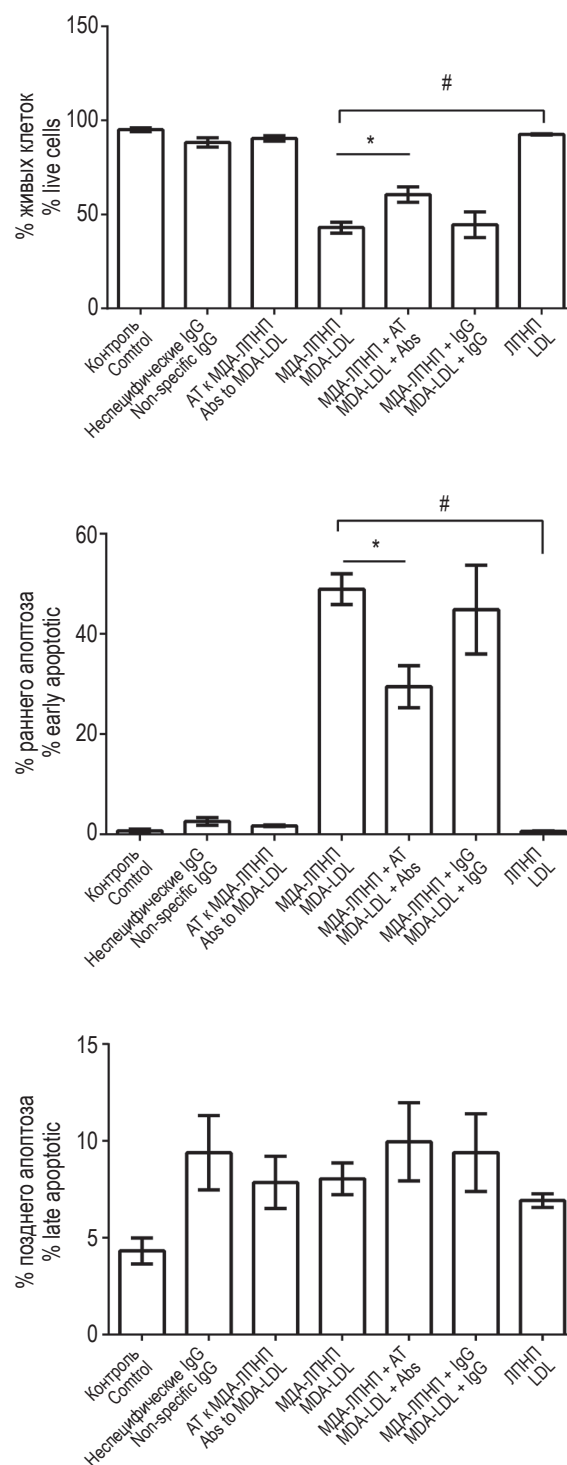


Рисунок 3. Апоптоз макрофагов, инкубированных 24 часа с различными агентами (проточная цитофлуориметрия)

Примечание. Данные представлены: медиана и межквартильные интервалы (Me ($Q_{0.25}$ – $Q_{0.75}$)), n = 10; * – p < 0,05; # – p < 0,0001 (критерий Краскела–Уоллиса).

Figure 3. Apoptosis of macrophages incubated for 24 hours with various agents (flow cytometry)

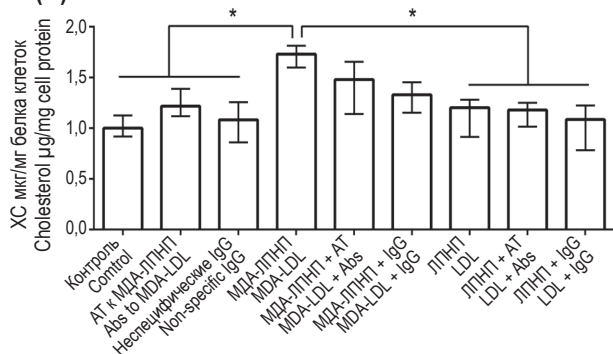
Note. Data presented: median and interquartile ranges (Me ($Q_{0.25}$ – $Q_{0.75}$)), n = 10; * , p < 0.05; # , p < 0.0001 (Kruskal–Wallis test).

ТАБЛИЦА 2. СОДЕРЖАНИЕ ОКИСЛЕННЫХ ЛИПОПРОТЕИНОВ НИЗКОЙ ПЛОТНОСТИ ($Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})$) В ПЛАЗМЕ ОБСЛЕДОВАННЫХ ПАЦИЕНТОВ И КОЭФФИЦИЕНТЫ КОРРЕЛЯЦИИ С КОНЦЕНТРАЦИЕЙ ХС-ЦИК (* $p < 0,05$)

TABLE 2. CONTENT OF OXIDIZED LOW DENSITY LIPOPROTEINS ($Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})$) IN THE PLASMA OF THE PATIENTS AND CORRELATION COEFFICIENTS WITH THE CONCENTRATION OF CIRCULATING IMMUNE COMPLEXES CHOLESTEROL (* $p < 0.05$)

	Здоровые лица Healthy individuals (n = 59)	Пациенты с доклиническим атеросклерозом Patients with preclinical atherosclerosis (n = 25)	Пациенты с ИБС Patients with CAD (n = 169)
Содержание оксЛПНП, У/л Oxidized low density lipoprotein, U/L	49,1 (41,2-60,6)	58,3 (34,6-71,3)	60 (43,0-75,0)
Коэффициент корреляции с ХС-ЦИК Correlation coefficients with concentration of circulating immune complexes cholesterol	0,08	0,45*	0,41*

А (А)



Б (Б)

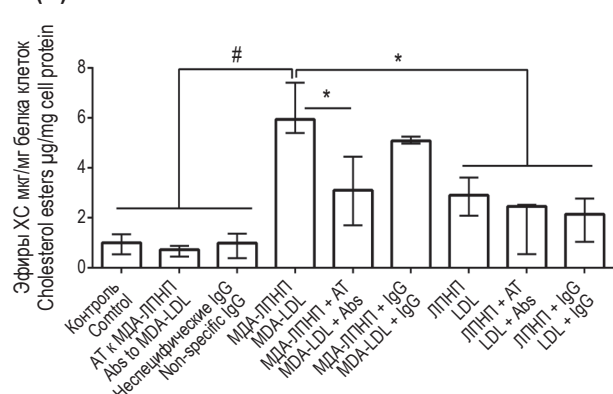


Рисунок 4. Содержание свободного холестерина (А) и его эфиров (Б) в макрофагах, инкубированных 24 часа с различными агентами

Примечание. Данные представлены: медиана и межквартильные интервалы (25% и 75%), $n = 10$; * – $p < 0,05$; # – $p < 0,0001$ (дисперсионный анализ с апостериорным критерием Тьюки).

Figure 4. Content of free cholesterol (A) and its esters (B) in macrophages incubated for 24 hours with various agents
Note. Data presented: median and interquartile ranges (25% and 75%), $n = 10$; *, $p < 0.05$; #, $p < 0.0001$ (analysis of variance with Tukey's post hoc test).

новлено (рис. 4), что инкубация макрофагов, дифференцированных из мононуклеаров периферической крови человека, с МДА-ЛПНП (50 мкг белка/мл) в течение 24 часов приводила к значительному внутриклеточному накоплению холестерина – свободного и, в особенности, эстерифицированного, что согласуется с литературными данными [39]. При этом инкубация макрофагов с нативными ЛПНП в той же концентрации вызывала в 1,5-2 раза меньшее увеличение содержания холестерина и его эфиров в клетках. Добавление специфических антител к МДА-ЛПНП (молярное соотношение – аполипопротеин В:АТ 1:5) значительно снижало способность МДА-ЛПНП индуцировать накопление эфиров холестерина в макрофагах. В то же время АТ против МДА-ЛПНП не влияли на накопление холестерина и его эфиров при культивировании макрофагов с нативными ЛПНП, а неспецифический IgG не влиял на захват ни МДА-ЛПНП, ни нативных ЛПНП.

Обсуждение

Приступая к выполнению данной работы, мы предполагали, что уровень АТ к МДА-ЛПНП может отражать как наличие подобных модификаций в организме, так и выраженность иммунного ответа на модифицированные белки у пациентов с атеросклерозом по сравнению с здоровыми лицами. Оказалось, что содержание АТ к МДА-ЛПНП было достоверно снижено у пациентов с клиническими проявлениями атеросклероза (ИБС) по сравнению со здоровыми лицами и пациентами с доклиническим атеросклерозом. Вместе с тем концентрация ХС-ЦИК повышена у пациентов с ИБС по сравнению с остальными группами. При этом достоверных различий в со-

держании оксЛПНП у обследованных групп пациентов не было найдено. Вопрос, на который предстоит ответить: почему уровень АТ класса IgG к мЛПНП снижается у пациентов с ИБС наряду с повышением концентрации ХС-ЦИК и при постоянном уровне мЛПНП. Можно предположить, что у пациентов с ИБС увеличивается образование мЛПНП и, следовательно, взаимодействие их с АТ с формированием иммунных комплексов мЛПНП-АТ. Этим, по-видимому, и объясняется наблюдаемое повышение концентрации ХС-ЦИК у пациентов с ИБС. В нашей работе не было зафиксировано различий в концентрации оксЛПНП между группами пациентов, хотя отмечалась положительная корреляция между содержанием оксЛПНП и ХС-ЦИК. Кроме того, существует вероятность того, что оксЛПНП, входящие в иммунные комплексы, могут не учитываться при измерении их содержания из-за конкуренции между собственными АТ и АТ тест-системы. Следует также учитывать тот факт, что оксЛПНП быстро элиминируются из кровотока клетками системы мононуклеарных фагоцитов.

Таким образом, снижение содержания АТ к мЛПНП, найденное в крови у пациентов с ИБС, может объясняться истощением пула циркулирующих антилипопротеиновых АТ класса IgG в связи с увеличением количества антигена, в нашем случае МДА-ЛПНП. Другим объяснением обнаруженного феномена может быть ослабление иммунного ответа, при котором основная часть АТ будет расходоваться на образование комплекса.

В литературе данные об изменении уровня АТ к мЛПНП у пациентов с атеросклерозом противоречивы. В одних исследованиях, как и в нашей работе, было обнаружено снижение уровней АТ класса IgG к МДА-ЛПНП в плазме пациентов с ИБС, в то время как различий в содержании АТ класса IgM не наблюдалось [20]. В других работах, наоборот, низкие уровни АТ класса IgM к МДА-ЛПНП были связаны с клиническим проявлением ИБС, а в случае АТ класса IgG такой связи обнаружено не было [8, 34]. Есть исследования, в которых было показано уменьшение в крови количества АТ класса IgM к аполипопротеину В, нативному и модифицированному МДА, у пациентов с сердечно-сосудистыми заболеваниями [9], в то время как содержание АТ класса IgG снижались только против нативного аполипопротеина В, но не против МДА-модифицированного [6, 9]. Некоторые авторы описывают положительную связь концентрации АТ к оксЛПНП в крови с развитием атеросклероза [16, 24]. Кроме того, имеются данные об отсутствии изменений уров-

ней АТ обоих классов к оксЛПНП у пациентов с ИБС [29].

Исходя из вышесказанного, следует, что временное определение уровня АТ IgG к модифицированным ЛПНП и концентрации ХС-ЦИК может помочь в оценке динамики клинических проявлений атеросклероза.

Другая часть нашей работы была посвящена изучению роли АТ в процессах, протекающих непосредственно в очаге атеросклеротического поражения. Хорошо известно, что МДА-ЛПНП обладают выраженной цитотоксичностью, что и было подтверждено в нашем исследовании. При этом нами было показано, что добавление в инкубационную среду АТ к МДА-ЛПНП приводило к снижению цитотоксичности МДА-ЛПНП по отношению к макрофагам, хотя и не отменяло ее полностью. Кроме того, АТ к МДА-ЛПНП снижали накопление эфиров ХС в макрофагах, при их инкубации с МДА-ЛПНП. Эти результаты согласуются со сведениями о том, что свободные мЛПНП, выделенные из атеросклеротических поражений человека, захватывались макрофагами значительно активнее, чем иммунные комплексы ЛПНП-АТ [12]. Такие эффекты АТ, скорее всего, объясняются тем, что формирующиеся иммунные комплексы изменяют характер взаимодействия МДА-ЛПНП с макрофагами. Известно, что мЛПНП захватываются с помощью различных скэвенджер-рецепторов. Однако из-за наличия АТ к мЛПНП, обеспечивающих формирование комплексов, захват может осуществляться не столько скэвенджер-рецепторами, сколько с участием Fc-рецепторов. Есть данные, что иммунные комплексы, взаимодействующие с Fc-рецепторами, могут приводить к активации АКТ-зависимого сигнального пути, регулирующего выживание клеток [19, 25].

Заключение

Тем самым полученные данные свидетельствуют о том, что антилипопротеиновые АТ могут оказывать защитное действие, предупреждая гибель клеток и снижая накопление эфиров ХС в макрофагах при их взаимодействии с мЛПНП, т. е. предупреждать формирование пенных клеток. Это согласуется со сведениями о том, что [11, 21, 23, 25, 28, 32] иммунизация животных оксЛПНП или МДА-ЛПНП приводила к снижению скорости развития и выраженности экспериментального атеросклероза, что связывают с атеропротективной функцией АТ.

Благодарности

Авторы выражают свою благодарность заведующему лабораторией клеточной иммуноло-

гии отдела иммунологии ФГБНУ «ИЭМ» к.б.н. И.В. Кудрявцеву и научному сотруднику М.К. Се-ребряковой за помощь при работе на проточном цитофлуориметре; заведующему лабораторией биохимической генетики отдела молекулярной генетики ФГБНУ «ИЭМ» д.б.н. А.В. Соколову за предоставленные реактивы и конструктивные дискуссии; старшему научному сотруднику отдела биохимии ФГБНУ «ИЭМ» к.б.н. С.В. Орлову за консультации и обсуждение результатов.

Соблюдение этических норм

Все процедуры, выполненные в исследовании с участием людей, соответствуют этическим стандартам национального комитета по исследовательской этике и Хельсинкской декларации 1964 года и ее последующим изменениям или сопоставимым нормам этики. От каждого из включенных в исследование участников было получено информированное добровольное согласие.

Список литературы / References

1. Денисенко А.Д. Аутоиммунные комплексы липопротеин-антитело и их роль в атерогенезе // Медицинский академический журнал, 2007. Т. 7, № 1. С. 38-44. [Denisenko A.D. Autoimmune lipoprotein-antibody complexes and their role in atherogenesis. *Meditsinskiy akademicheskiy zhurnal = Medical Academic Journal*, 2007, Vol. 7, no. 1, pp. 38-44. (In Russ.)]
2. Ларионова Е.Е., Денисенко А.Д. Влияние модифицированных липопротеинов низкой плотности и липопротеинов высокой плотности на апоптоз макрофагов // Ученые записки СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова, 2012. Т. 19, № 2. С. 16-19. [Larionova E.E., Denisenko A.D. The influence of modified low density lipoproteins and of high density lipoproteins on macrophage apoptosis. *Uchenye zapiski SPbGMU im. akad. I.P. Pavlova = Scientific Notes of the Pavlov University*, 2012, Vol. 19, no. 2, pp. 16-19. (In Russ.)]
3. Пигаревский П.В., Архипова О.Ю., Денисенко А.Д. Иммуногистохимическое обнаружение модифицированных липопротеинов в атеросклеротических поражениях аорты человека // Медицинская иммунология, 2006. Т. 8, № 5-6. С. 637-644. [Pigarevsky P.V., Archipova O.Yu., Denisenko A.D. Detection of modified lipoproteins in atherosclerotic lesions of human aorta. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2006, Vol. 8, no. 5-6, pp. 637-644. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2006-5-6-637-644.
4. Amaki T., Suzuki T., Nakamura F., Hayashi D., Imai Y., Morita H., Fukino K., Nojiri T., Kitano S., Hibi N., Yamazaki T., Nagai R. Circulating malondialdehyde modified LDL is a biochemical risk marker for coronary artery disease. *Heart*, 2004, Vol. 90, no. 10, pp. 1211-1213.
5. Arnhold J., Wiegel D., Richter O., Hammerschmidt S., Arnold K., Krumbiegel M. Modification of low density lipoproteins by sodium hypochlorite. *Biomed. Biochim. Acta*, 1991, Vol. 50, no. 8, pp. 967-973.
6. Asciutto G., Wigren M., Fredrikson G.N., Mattisson I.Y., Grönberg C., Alm R., Björkbacka H., Dias N.V., Edsfieldt A., Gonçalves I., Nilsson J. Apolipoprotein B-100 Antibody Interaction With Atherosclerotic Plaque Inflammation and Repair Processes. *Stroke*, 2016, Vol. 47, no. 4, pp. 1140-1143.
7. Belik I.V., Ivantsova A.A., Mamedova Z.E., Denisenko A.D. Antibodies against modified low-density lipoproteins and their complexes in blood of patients with various manifestations of atherosclerosis. *Biochem. Moscow Suppl. Ser. B*, 2016, Vol. 10, no. 4, pp. 346-350.
8. Berg V.J., Haskard D.O., Fedorowski A., Hartley A., Kardys I., Caga-Anan M., Akkerhuis K.M., Oemrawsingh R.M., van Geuns R.J., de Jaegere P., van Mieghem N., Regar E., Ligthart J.M.R., Umans V.A.W.M., Serruys P.W., Melander O., Boersma E., Khamis R.Y. IgM anti-malondialdehyde low density lipoprotein antibody levels indicate coronary heart disease and necrotic core characteristics in the Nordic Diltiazem (NORDIL) study and the Integrated Imaging and Biomarker Study 3 (IBIS-3). *EBioMedicine*, 2018, Vol. 36, pp. 63-72.
9. Björkbacka H., Alm R., Persson M., Hedblad B., Nilsson J., Fredrikson G.N. Low levels of apolipoprotein B-100 autoantibodies are associated with increased risk of coronary events. *Arterioscler. Thromb. Vasc Biol.*, 2016, Vol. 36, no. 4, pp. 765-771.
10. Brown M.S., Goldstein J.L. Receptor-mediated endocytosis: Insights from the lipoprotein receptor system, *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 1979, Vol. 76, no. 7, pp. 3330-3337.
11. Chyu K.Y., Zhao X., Reyes O.S., Babbidge S.M., Dimayuga P.C., Yano J., Cercek B., Fredrikson G.N., Nilsson J., Shah P.K. Immunization using an Apo B-100 related epitope reduces atherosclerosis and plaque inflammation in hypercholesterolemic apo E (-/-) mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2005, Vol. 338, no. 4, pp. 1982-1989.
12. Denisenko A.D., Makovejchuk E.G., Vinogradov A.G., Kuznetsov A.S., Klimov A.N. Autoantibodies against oxidized low density lipoproteins and lipoprotein-antibody autoimmune complexes in human atherosclerosis. *Eur. J. Lab. Med.*, 1996, Vol. 4, no. 1, pp. 85-90.
13. Fields R. The rapid determination of amino groups with TNBS. *Methods Enzymol.*, 1972, Vol. 25, pp. 464-468.
14. Fogelman A.M., Shechter I., Seager J., Hokom M., Child J.S., Edwards P.A. Malondialdehyde alteration of low density lipoproteins leads to cholesteryl ester accumulation in human monocyte-macrophages. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 1980, Vol. 77, no. 4, pp. 2214-2218.

15. Gonen B., Cole T., Hahm K. S. The interaction of carbamylated low-density lipoprotein with cultured cells. Studies with human fibroblasts, rat peritoneal macrophages and human monocyte-derived macrophages. *Biochim. Biophys. Acta*, 1983, Vol. 754, no. 2, pp. 201-207.
16. Gruzdeva O., Uchasova E., Dyleva Y., Belik E., Karetnikova V., Shilov A., Barbarash O. Multivessel coronary artery disease, free fatty acids, oxidized LDL and its antibody in myocardial infarction. *Lipids Health Dis.*, 2014, no. 13, 111. doi: 10.1186/1476-511X-13-111.
17. Havel R.J., Eder H.A., Bragdon J.H. The distribution and chemical composition of ultracentrifugally separated lipoproteins in human serum. *J. Clin. Invest.*, 1955, Vol. 34, no. 9, pp. 1345-1353.
18. Holvoet P., Mertens A., Verhamme P., Bogaerts K., Beyens G., Verhaeghe R., Collen D., Muls E., van de Werf F. Circulating oxidized LDL is a useful marker for identifying patients with coronary artery disease. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 2001, Vol. 21, no. 5, pp. 844-848.
19. Huang Y., Jaffa A., Koskinen S., Takei A., Lopes-Virella M.F. Oxidized LDL-Containing Immune Complexes Induce Fc Gamma Receptor I Mediated Mitogen-Activated Protein Kinase Activation in THP-1 Macrophages. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 1999, Vol. 19, no. 7, pp. 1600-1607.
20. Khamis R.Y., Hughes A.D., Caga-Anan M., Chang C.L., Boyle J.J., Kojima C., Welsh P., Sattar N., Johns M., Sever P., Mayet J., Haskard D.O. High Serum Immunoglobulin G and M Levels Predict Freedom From Adverse Cardiovascular Events in Hypertension: A Nested Case-Control Substudy of the Anglo-Scandinavian Cardiac Outcomes Trial. *EBioMedicine*, 2016, Vol. 9, pp. 372-380.
21. Lehrer-Graiwer J., Singh P., Abdelbaky A., Vucic E., Korsgren M., Baruch A., Fredrickson J., van Bruggen N., Tang M.T., Frendeus B., Rudd J.H.F., Hsieh F., Ballantyne C.M., Ghoshhajra B., Rosenson R.S., Koren M., Roth E.M., Duprez D.A., Fayad Z.A., Tawakol A.A. FDG-PET imaging for oxidized LDL in stable atherosclerotic disease: a phase II study of safety, tolerability, and anti-inflammatory activity. *JACC Cardiovasc. Imaging*, 2015, Vol. 8, no. 4, pp. 493-494.
22. Markwell M.A., Haas S.M., Bieber L.L., Tolbert N.E. A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples. *Anal. Biochem.*, 1978, Vol. 87, no. 1, pp. 206-210.
23. Martos-Folgado I., Del Monte-Monge A., Lorenzo C., Busse C.E., Delgado P., Mur S.M., Cobos-Figueroa L., Escolà-Gil J.C., Martín-Ventura J.L., Wardemann H., Ramiro A.R. MDA-LDL vaccination induces athero-protective germinal-center-derived antibody responses. *Cell Rep.*, 2022, Vol. 41, no. 2, 111468. doi: 10.1016/j.celrep.2022.111468.
24. Meeuwse J.A.L., van Duijvenvoorde A., Gohar A., Kozma M.O., van de Weg S.M., Gijbels C.M., Haitjema S., Björkbacka H., Fredrikson G.N., de Borst G.J., den Ruijter H.M., Pasterkamp G., Binder C.J., Hoefer I.E., de Jager S.C.A. High levels of (un)switched memory b cells are associated with better outcome in patients with advanced atherosclerotic disease. *J. Am. Heart Assoc.*, 2017, Vol. 6, no. 9, e005747. doi: 10.1161/JAHA.117.005747.
25. Oksjoki R., Kovanen P.T., Lindstedt K.A., Jansson B., Pentikäinen M.O. OxLDL-IgG Immune Complexes Induce Survival of Human Monocytes. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 2005, Vol. 26, no. 3, pp. 576-583.
26. Orekhov A.N., Tertov V.V., Kabakov A.E., Adamova I.Yu., Pokrovsky S.N., Smirnov V.N. Autoantibodies against modified low density lipoprotein. Nonlipid factor of blood plasma that stimulates foam cell formation. *Arterioscler. Thromb.*, 1991, Vol. 11, no. 2, pp. 316-326.
27. Palinski W.S., Ylä-Herttuala S., Rosenfeld M.E., Butler S.W., Socher S.A., Parthasarathy S., Curtiss L.K., Witztum J.L. Antisera and monoclonal antibodies specific for epitopes generated during the oxidative modification of low-density lipoprotein. *Arteriosclerosis*, 1990, Vol. 10, no. 3, pp. 325-335.
28. Palinski W., Miller E., Witztum J.L. Immunization of low density lipoprotein (LDL) receptor-deficient rabbits with homologous malondialdehyde-modified LDL reduces atherogenesis. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 1995, no. 92, pp. 821-825.
29. Ravandi A., Boekholdt S.M., Mallat Z., Talmud P.J., Kastelein J.J., Wareham N.J., Miller E.R., Benessiano J., Tedgui A., Witztum J.L., Khaw K.T., Tsimikas S. Relationship of IgG and IgM autoantibodies and immune complexes to oxidized LDL with markers of oxidation and inflammation and cardiovascular events: results from the EPIC-Norfolk Study. *J. Lipid Res.*, 2011, Vol. 52, no. 10, pp. 1829-1836.
30. Rusiñol A.E., Thewke D., Liu J., Freeman N., Panini S.R., Sinensky M.S. AKT/protein kinase B regulation of BCL family members during oxysterol-induced apoptosis. *J. Biol Chem.*, 2004, Vol. 279, no. 2, pp. 1392-1399.
31. Salomon R.G., Kaur K., Podrez E. HNE-derived 2-pentylpyrroles are generated during oxidation of LDL, are more prevalent in blood plasma from patients with renal disease or atherosclerosis, and are present in atherosclerotic plaques. *Chem. Res. Toxicol.*, 2000, Vol. 13, no. 7, pp. 557-564.
32. Schiopu A., Frendeus B., Jansson B., Söderberg I., Ljungcrantz I., Araya Z., Shah P.K., Carlsson R., Nilsson J., Fredrikson G.N. Recombinant antibodies to an oxidized low-density lipoprotein epitope induce rapid regression of atherosclerosis in apobec-1(-)/low-density lipoprotein receptor(-) mice. *J. Am. Coll. Cardiol.*, 2007, Vol. 50, no. 24, pp. 2313-2318.
33. Smith P.K., Krohn R.I., Hermanson G.T., Mallia A.K., Gartner F.H., Provenzano M.D., Fujimoto E.K., Goeke N.M., Olson B.J., Klenk D.C. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.*, 1985, Vol. 150, no. 1, pp. 76-85.

34. Tsimikas S., Brilakis E.S., Lennon R.J., Miller E.R., Witztum J.L., McConnell J.P., Kornman K.S., Berger P.B. Relationship of IgG and IgM autoantibodies to oxidized low density lipoprotein with coronary artery disease and cardiovascular events. *J. Lipid Res.*, 2007, Vol. 48, no. 2, pp. 425-433.
35. Turk Z., Skrabolo Z. The cell interactive properties of glucosylated very-low-density lipoproteins. *Cell. Mol. Biol.*, 1987, Vol. 33, no. 3, pp. 345-354.
36. Wolf D., Ley K. Immunity and inflammation in atherosclerosis. *Circ Res.*, 2019, Vol. 124, no. 2, pp. 315-327.
37. Yokoi M., Ito T., Fujita H., Sugiura T., Seo Y., Ohte N. Increased serum malondialdehyde-modified low-density lipoprotein and coronary angiographic progression after drug-eluting stent implantation in patients with stable angina. *Circ. J.*, 2020, Vol. 84, no. 10, pp. 1837-1845.
38. Yokoi M., Ito T., Kawada Y., Mizoguchi T., Yamamoto J., Mori K., Nakasuka K., Kikuchi S., Fujita H., Kitada S., Goto T., Seo Y. Malondialdehyde-modified low-density lipoprotein as a predictor of major adverse limb events after endovascular therapy in patients with lower extremity arterial disease. *J. Atheroscler. Thromb.*, 2023, Vol. 30, no. 11, pp. 1612-1621.
39. Zhang H.F., Basra H.J., Steinbrecher U.P. Effects of oxidatively modified LDL on cholesterol esterification in cultured macrophages. *J. Lipid Res.*, 1990, Vol. 31, no. 8, pp. 1361-1369.

Авторы:

Иванова А.А. — научный сотрудник отдела биохимии ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

Дмитриева А.А. — лаборант-исследователь отдела биохимии ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

Денисенко Д.А. — д.м.н., профессор, заведующий лабораторией регуляции липидного обмена ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

Authors:

Ivanova A.A., Research Associate, Department of Biochemistry, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

Dmitrieva A.A., Laboratory Assistant, Department of Biochemistry, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

Denisenko A.D., PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Laboratory of Regulation of Lipid Metabolism, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

Поступила 29.01.2024
Принята к печати 17.03.2024

Received 29.01.2024
Accepted 17.03.2024

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ КОЛИЧЕСТВА Т-РЕГУЛЯТОРНЫХ КЛЕТОК ($CD4^+CD25^{HIGH}FoxP3^+CD127^{LOW}$) У ПАЦИЕНТОВ ДО 1 ГОДА С КАТАРАКТОЙ, ГЛАУКОМОЙ И РЕТИНОПАТИЕЙ НЕДОНОШЕННЫХ (ПО ОБЗОРНЫМ ДАНЫМ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ)

Балашова Л.М.^{1,2}, Кузнецова Ю.Д.^{1,2}, Лесовой С.В.^{1,2,3},
Альварес М.А.¹, Балашов А.А.¹, Черкашин Д.Р.¹, Кантаржи Е.П.¹,
Быковская С.Н.², Салмаси Ж.М.²

¹ НП «Международный научно-практический центр пролиферации тканей», Москва, Россия

² ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова»
Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

³ ГБУЗ города Москвы «Детская городская клиническая больница имени Н.Ф. Филатова Департамента
здравоохранения города Москвы», Москва, Россия

Резюме. Были проведены исследования образцов крови у пациентов до 1 года с катарактой, глаукомой и ретинопатией недоношенных и у доношенных, соматически здоровых детей до 1 года, с целью количественного определения Т-регуляторных клеток $CD4^+CD25^{high}FoxP3^+CD127^{low}$. Объединены и структурированы данные собственных исследований, представленные в ранее опубликованных статьях по отдельным патологиям, для полноценного сравнения их в комплексе наиболее распространенных глазных заболеваний у детей до 1 года, какими являются катаракта, глаукома и ретинопатия недоношенных.

Целью исследования явилось сравнительное исследование количества Т-регуляторных клеток ($CD4^+CD25^{high}FoxP3^+CD127^{low}$) в крови детей до 1 года жизни с РН, катарактой, глаукомой и здоровых доношенных детей (по данным собственных исследований в ранее опубликованных работах по отдельным патологиям).

Всего был обследован 131 ребенок (262 глаза) в возрасте до 1 года. Из них 79 детей (158 глаз) – с ретинопатией недоношенных, 12 детей (20 глаз) – с катарактой, 13 детей (21 глаз) – с глаукомой, 9 пар-

Адрес для переписки:

Балашова Лариса Маратовна
ФГАОУ ВО «Российский национальный
исследовательский медицинский университет имени
Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения РФ
109388, Россия, Москва, ул. Гурьянова, 73, кв. 119.
Тел.: 8 (909) 985-81-84.
E-mail: blm1962@yandex.ru

Address for correspondence:

Larisa M. Balashova
Pirogov Russian National Research Medical University
72 Guryanov St
Moscow
109388 Russian Federation
Phone: +7 (909) 985-81-84.
E-mail: blm1962@yandex.ru

Образец цитирования:

Л.М. Балашова, Ю.Д. Кузнецова, С.В. Лесовой,
М.А. Альварес, А.А. Балашов, Д.Р. Черкашин,
Е.П. Кантаржи, С.Н. Быковская, Ж.М. Салмаси
«Сравнительное исследование количества
Т-регуляторных клеток ($CD4^+CD25^{high}FoxP3^+CD127^{low}$)
у пациентов до 1 года с катарактой, глаукомой и
ретинопатией недоношенных (по обзорным данным
собственных исследований)» // Медицинская
иммунология, 2025. Т. 27, № 1. С. 143–152.
doi: 10.15789/1563-0625-ACS-2958

© Балашова Л.М. и соавт., 2025
Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

L.M. Balashova, Yu.D. Kuznetsova, S.V. Lesovoy,
M.A. Alvarez, A.A. Balashov, D.R. Cherkashin,
E.P. Kantarzh, S.N. Bykovskaya, Zh.M. Salmasi
“A comparative study of T regulatory cells numbers
($CD4^+CD25^{high}FoxP3^+CD127^{low}$) in patients under 1 year
of age with cataract, glaucoma, and retinopathy of prematurity
(review of the own studies)”, Medical Immunology (Russia)/
Meditsinskaya Immunologiya, 2025, Vol. 27, no. 1,
pp. 143–152.
doi: 10.15789/1563-0625-ACS-2958

© Balashova L.M. et al., 2025
The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License
DOI: 10.15789/1563-0625-ACS-2958

ных глаз детей — с катарактой и глаукомой и 27 здоровых доношенных детей (54 глаза) того же возраста. Детям было проведено стандартное офтальмологическое обследование. Особое внимание нами было уделено исследованию количества Т-регуляторных клеток $CD4^+CD25^{high}FoxP3^+CD127^{low}$. Произведено иммунофенотипирование клеток периферической крови, включая Т-регуляторные клетки.

По данным ранее произведенных нами исследований и при сопоставлении результатов в представленном исследовании у детей до 1 года были обнаружены достоверные различия по количеству Т-регуляторных клеток ($CD4^+CD25^{high}FoxP3^+CD127^{low}$) между недоношенными и доношенными детьми, а также внутри групп пациентов по весовой категории при катаракте и глаукоме. Авторам удалось определить различия между стадиями ретинопатии недоношенных по количеству Т-регуляторных клеток ($CD4^+CD25^{high}FoxP3^+CD127^{low}$), выделяя заднюю агрессивную ретинопатию недоношенных в особую форму данной патологии.

Данное исследование является подтверждением возможного участия аутоиммунного ответа в патогенезе прогрессирующих стадий ретинопатии недоношенных. Об этом свидетельствует выявленное достоверное уменьшение количества Т-регуляторных клеток $CD4^+CD25^{high}FoxP3^+CD127^{low}$. Прогрессирующие стадии ретинопатии недоношенных сопровождаются более низкими значениями Т-регуляторов, чем стационарные. Выявлены достоверные различия по количеству Т-регуляторных клеток при основных офтальмологических заболеваниях детей в возрасте до 1 года — катаракте, глаукоме и ретинопатии недоношенных.

Ключевые слова: офтальмология, Т-регуляторные клетки $CD4^+CD25^{high}FoxP3^+CD127^{low}$, кровь, врожденная катаракта, врожденная глаукома, ретинопатия недоношенных, доношенные здоровые дети

A COMPARATIVE STUDY OF OF T REGULATORY CELLS NUMBERS ($CD4^+CD25^{HIGH}FoxP3^+CD127^{LOW}$) IN PATIENTS UNDER 1 YEAR OF AGE WITH CATARACT, GLAUCOMA, AND RETINOPATHY OF PREMATURITY (REVIEW OF THE OWN STUDIES)

Balashova L.M.^{a, b}, Kuznetsova Yu.D.^{a, b}, Lesovoy S.V.^{a, b, c}, Alvarez M.A.^a, Balashov A.A.^a, Cherkashin D.R.^a, Kantarzhi E.P.^a, Bykovskaya S.N.^b, Salmasi Zh.M.^b

^a International Scientific and Practical Center for Tissue Proliferation, Moscow, Russian Federation

^b Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russian Federation

^c N. Filatov Children's City Clinical Hospital, Moscow, Russian Federation

Abstract. Potential involvement of immune system in pathophysiology of congenital glaucoma, cataract, and retinopathy of prematurity (ROP) in infants has been suggested. However, its understanding still remains limited. T regulatory cells ($CD4^+CD25^{high}FoxP3^+CD127^{low}$), with their role in autoimmunity, are considered pivotal in this respect, although there is a scarcity of publications in this context. This study aims to address this gap. Our purpose was to compare the levels of blood cells with ($CD4^+CD25^{high}FoxP3^+CD127^{low}$) phenotype in infants with ROP, congenital glaucoma and cataract, and healthy full-term infants. This retrospective case-control study included 131 infants (262 eyes). Inclusion criteria were as follows: age under 12 months and a confirmed diagnosis of congenital cataract (20 eyes), congenital glaucoma (21 eyes), and ROP (158 eyes). The control group consisted of 27 full-term infants (54 eyes) with normal eye exam. Primary outcomes included study of Treg cells ($CD4^+CD25^{high}FoxP3^+CD127^{low}$) levels in all groups. Secondary outcomes involved the correlation between the $CD4^+CD25^{high}FoxP3^+CD127^{low}$ subpopulation and weight at birth. According to our previous studies and when comparing the results in the present study of children under 1 year of age, we found significant differences in the number of T regulatory cells ($CD4^+CD25^{high}FoxP3^+CD127^{low}$) between premature and full-term children, as well as in the patient groups with cataract and glaucoma by their weight

category. The authors were able to detect differences between stages of retinopathy of prematurity by the number of T regulatory cells ($CD4^+CD25^{high}FoxP3^+CD127^{low}$), distinguishing posterior aggressive retinopathy of prematurity as a special form of this pathology. The reduced levels of $CD4^+CD25^{high}FoxP3^+CD127^{low}$ cells in infants with ROP type 1 suggests autoimmune reactions in its pathophysiology. The remarkable difference in ($CD4^+CD25^{high}FoxP3^+CD127^{low}$) Treg cells in patients with congenital glaucoma and cataract may indicate immune-mediated mechanisms in their development. The clinical significance of the revealed correlation between the level of studied T cells and birth weight in infants with cataract and glaucoma is not clear and requires further investigation with regard to the disease severity. The index can be used as a potential prognostic marker of the disease course and visual outcomes. Collectively, this study provided valuable insights on the potential targets for novel treatment strategies in infants with ROP, glaucoma, and cataracts.

Keywords: ophthalmology, $CD4^+CD25^{high}FoxP3^+CD127^{low}$, blood, newborn children, cataract, glaucoma, retinopathy of prematurity, health children

Введение

Были проведены исследования образцов крови у пациентов до 1 года с катарактой, глаукомой и ретинопатией недоношенных и у доношенных, соматически здоровых детей до 1 года, с целью количественного определения Т-регуляторных клеток $CD4^+CD25^{high}FoxP3^+CD127^{low}$. Объединены и структурированы данные собственных исследований, представленные в ранее опубликованных статьях по отдельным патологиям, для полноценного сравнения их в комплексе наиболее распространенных глазных заболеваний у детей до 1 года, какими являются катаракта, глаукома и ретинопатия недоношенных.

Целью исследования явилось сравнительное исследование количества Т-регуляторов ($CD4^+CD25^{high}FoxP3^+CD127^{low}$) в крови детей до 1 года жизни с ретинопатией недоношенных (РН), катарактой, глаукомой и здоровых доношенных детей (по данным собственных исследований в ранее опубликованных работах по отдельным патологиям).

Материалы и методы

Всего был обследован 131 ребенок (262 глаза) в возрасте до 1 года. Из них 79 детей (158 глаз) детей — с ретинопатией недоношенных, 12 детей (20 глаз) — с катарактой, 13 детей (21 глаз) — с глаукомой, 9 парных глаз детей — с катарактой и глаукомой и 27 здоровых доношенных детей (54 глаза) того же возраста. Детям было произведено стандартное офтальмологическое обследование.

Особое внимание нами было уделено исследованию количества Т-регуляторных клеток $CD4^+CD25^{high}FoxP3^+CD127^{low}$ (табл. 1).

Произведено иммунофенотипирование клеток периферической крови [1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9], включая Т-регуляторные клетки (Трег):

1. Забор крови у детей из вены на операционном столе во время оперативного вмешательства под общим обезболиванием. Периферическую

кровь отбирали в пробирки с антикоагулянтом К3 EDTA (GreinerBioOne, Австрия).

2. Лизирование эритроцитов производили при помощи лизирующего буфера RedBloodCellLysing buffer (Life technologies; США) по протоколу производителя. Клетки в количестве 5×10^6 из осадка ресуспендировали в 200 мкл фосфатного буферного раствора.

3. Трег-клетки периферической крови пациентов и доноров метили при помощи Treg detection staining cocktail (Miltenyi Biotec, Германия) по протоколу производителя. Количество Трег определяли методом проточной цитометрии на цитометре MACS Quant (Miltenyi Biotec, Германия).

При статистической обработке полученных результатов использовался модуль «Вероятностный колькулятор» и критерий Стьюдента (Statistica 7).

Результаты

Результаты исследования представлены в таблице 1 и на рисунках 1-8.

Обсуждение

По данным ранее произведенных нами исследований (работы 1-10, их сравнительных характеристик) (табл. 1) и при сопоставлении результатов в представленном исследовании у детей до 1 года, были обнаружены достоверные различия по количеству Т-регуляторных клеток ($CD4^+CD25^{high}FoxP3^+CD127^{low}$) между недоношенными и доношенными детьми, а также внутри групп пациентов по весовой категории при катаракте и глаукоме.

На рисунке 1 построенная линия тренда указывает на значительное снижение количественного показателя Т-регуляторных клеток практически во всех стадиях, кроме ЗАРН, по сравнению с контролем, и особенно во II (как далее будет представлено, во II+) и V стадиях заболевания [8]. Обращает на себя внимание,

ТАБЛИЦА 1. Т-РЕГУЛЯТОРЫ ПРИ РАЗНЫХ СТАДИЯХ РЕТИНОПАТИИ НЕДОНОШЕННЫХ, ВРОЖДЕННОЙ КАТАРАКТЕ И ДОНОШЕННЫХ СОМАТИЧЕСКИ ЗДОРОВЫХ ДЕТЕЙ

TABLE 1. T-REGULATORS IN DIFFERENT STAGES OF RETINOPATHY OF PREMATURITY, CONGENITAL CATARACTS AND FULL-TERM SOMATICALLY HEALTHY CHILDREN

Признак Feature Подгруппа Subgroup	Возраст (мес.) Age (month)	Срок гестации (нед.) Gestational age (week)	Масса тела при рождении (г) Birth weight (g)	Иммунофенотип CD4 ⁺ CD25 ^{high} FoxP3 ⁺ CD127 ^{low} (%) Immunophenotype CD4 ⁺ CD25 ^{high} FoxP3 ⁺ CD127 ^{low} (%)
РН I стадия ROP stage I M±SD (Std. Dev.) (n = 9)	2,9±1,6	28,9±2,1	1110,0±396,2	2,3±1,1
РН II стадия ROP stage II M±SD (Std. Dev.) (n = 10)	2,9±1,1	29,1±1,8	1150±380,0	2,2±1,2
РН III+ стадия ROP stage III+ M±SD (Std. Dev.) (n = 20)	3,1±1,4	28,7±2,8	1284,5±394,6	2,4±1,2
РН IV стадия ROP stage IV M±SD (Std. Dev.) (n = 12)	3,4±1,3	29,0±2,2	1345,0±405,5	2,6±0,9
РН V стадия ROP stage V M±SD (Std. Dev.) (n = 19)	6,1±3,2**	27,7±2,0	985,0±317,2*	2,4±1,0
ЗАРН AP-ROP M±SD (Std. Dev.) (n = 9)	2,4±1,3*	29,4±1,6	1297,1±455,6	3,6±0,7**
Доношенные соматически здоровые дети Mature somatically healthy children M±SD (Std. Dev.) (n = 27)	4,8±2,1	39,3±0,9	3524,5±705,4	3,24±1,0**
Врожденная катаракта (доношенные) Congenital cataract (mature children) M±SD (Std. Dev.) (n = 12)	5,0±1,8	39,5±1,0	3786,0±900,4	3,1±0,6**
Врожденная глаукома (доношенные) Congenital glaucoma (mature children) M±SD (Std. Dev.) (n = 13)	4,4±3,0	3,0±1,2	3684,0±1,1	2,8±0,7 (без 1 высоковесного – 5300 г, Treg = 5,7) (without 1 high-weight – 5300 g, Treg = 5.7)
p	p < 0,05 (между стадиями РН) p < 0.05 (between ROP stages)	p > 0,05 (между стадиями РН) p > 0.05 (between ROP stages)	p < 0,05 (между стадиями РН) p < 0.05 (between ROP stages)	p < 0,01

Примечание. * – p < 0,05; ** – p < 0,01.

Note. *, p < 0.05; **, p < 0.01.

что у больных с задней агрессивной формой заболевания, обнаруживаемой в достоверно более ранние сроки ($p < 0,01-0,05$) по сравнению с другими стадиями РН, Т-регуляторные клетки $CD4^+CD25^{high}Foxp3^+CD127^{low}$ выявляются чаще в несколько повышенных и формально нормальных для доношенных детей этого возраста количествах в отличие от остальных стадий ретинопатии ($p < 0,05$), хотя встречаются больные и с пониженными значениями по сравнению с возрастной нормой доношенных детей (табл. 1, рис. 1, 2, 3). Задняя агрессивная форма РН предположительно может иметь и другие ведущие патогенетические механизмы, например, связанные с генетическими нарушениями.

На рисунке 2 в виде усиковой диаграммы представлены количественные значения Т-регуляторов при стационарных и прогрессирующих I и II стадиях ретинопатии недоношенных (РПН) [8], две диаграммы отдельно по I и II стадиям РН.

При использовании критерия Стьюдента (рис. 2) определяется пограничная достоверность при сравнении количества Т-регуляторов с непрогрессирующими и прогрессирующими I и II стадиями РН ($p < 0,046$ и $p < 0,07$), которые представлены на коробчатых (усиковых) диаграммах. Определена достоверная разница между этими значениями ($p = 0,02$ и $p = 0,03$) при использовании модуля «Вероятностный калькулятор».

На рисунке 3 [7] у детей различного веса при рождении с катарактой представлены выявленные количества Т-регуляторов.

Обнаруживаются статистически достоверные различия ($p < 0,01$) у больных с низким и нормальным ($p = 0,04$), нормальным и высоким ($p = 0,02$) весом при рождении у доношенных детей с катарактой. Количество детей в группах представлено в равных соотношениях (33,3%; 33,3%; 33,4%).

На рисунке 4, на усиковой (коробчатой) диаграмме [7] представлены выявленные количества Т-регуляторных клеток у детей с глаукомой, различного веса при рождении.

Как показано на рисунке 4, выявлено статистически достоверное различие в сторону повышения количества Т-регуляторов ($p = 0,0001$) при высоком весе доношенных новорожденных и понижению количества Т-регуляторов ($p = 0,07$) при низком весе при рождении у доношенных детей с глаукомой. Количество детей в группах представлено в неравных соотношениях (низковесные — 30,8%; нормовесные — 61,5%; высоковесные — 7,7%).

На графических рисунках 5 и 6 представлено количество Т-регуляторов при всех прогрессирующих стадиях РН (рис. 5) и начальных прогрес-

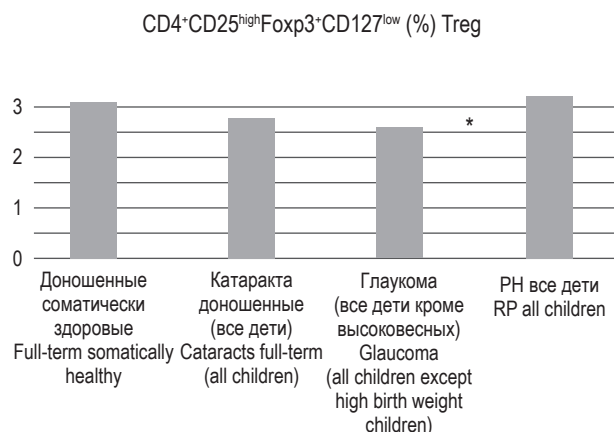


Рисунок 1. Линейная линия тренда Treg (CD4⁺CD25^{high}Foxp3⁺CD127^{low}) для всех форм РН по сравнению с контрольной группой

Figure 1. Linear trend line Treg (CD4⁺CD25^{high}Foxp3⁺CD127^{low}) for all forms of RP compared to the control group

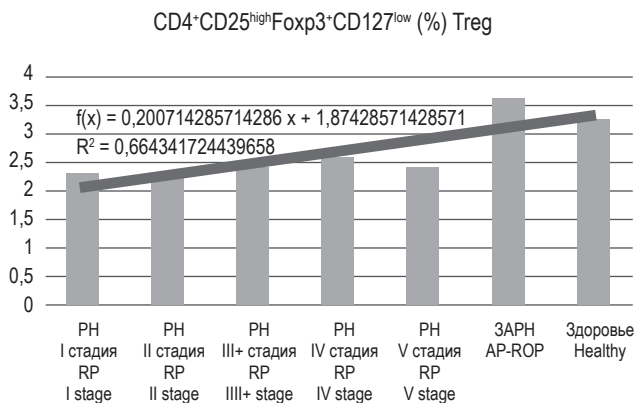


Рисунок 2. Количество Т-регуляторов с начальными (I, I+, II, II+) стадиями ретинопатии недоношенных

Figure 2. Number of T regulators with initial (I, I+, II, II+) stages of retinopathy of prematurity

сирующих стадиях РН (рис. 6) по сравнению с общими значениями количества этих клеток доношенных детей, страдающих катарактой, глаукомой, и доношенными соматически здоровыми детьми.

Из представленных данных (рис. 7) видно, что при исследовании по Стьюденту нет достоверных различий между доношенными детьми: здоровыми, с катарактой и глаукомой.

Выявлено достоверное различие между всеми прогрессирующими стадиями ретинопатии недоношенных и доношенными здоровыми детьми ($p < 0,05$; рис. 5), а также ранними прогрессирующими стадиями и здоровыми детьми ($p = 0,055$; рис. 6).

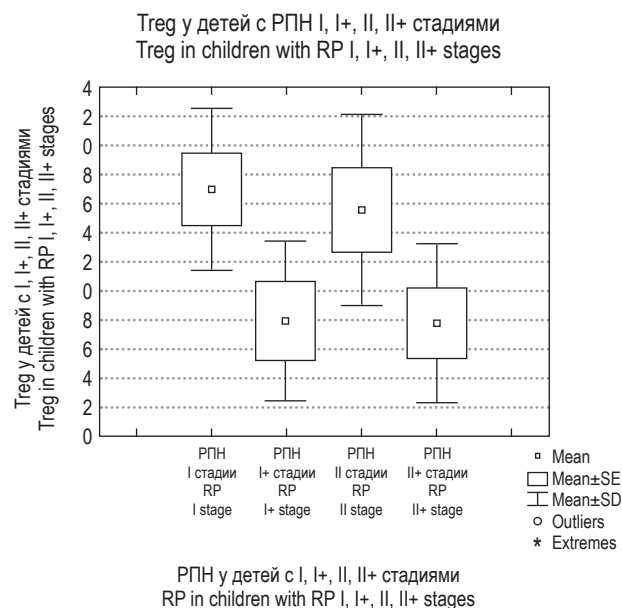


Рисунок 3. Количество Treg у доношенных детей различного веса при рождении с врожденной катарактой

Figure 3. Number of Tregs in full-term children of different birth weight with congenital cataracts

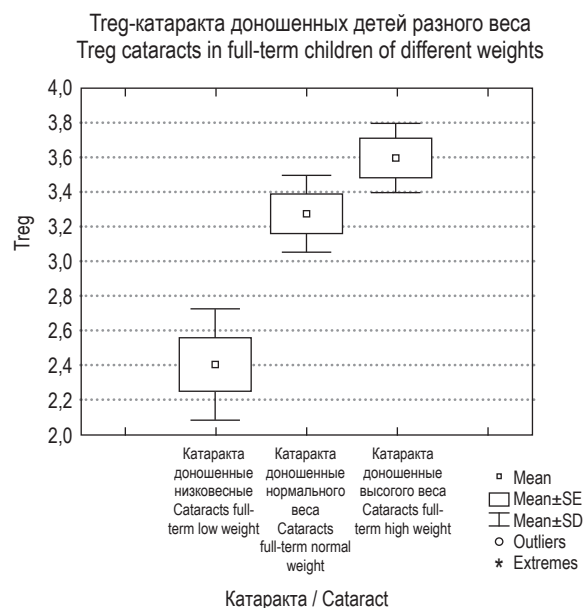


Рисунок 4. Количество Treg у доношенных детей различного веса при рождении с врожденной глаукомой

Figure 4. Number of Tregs in full-term children of different birth weight with congenital glaucoma

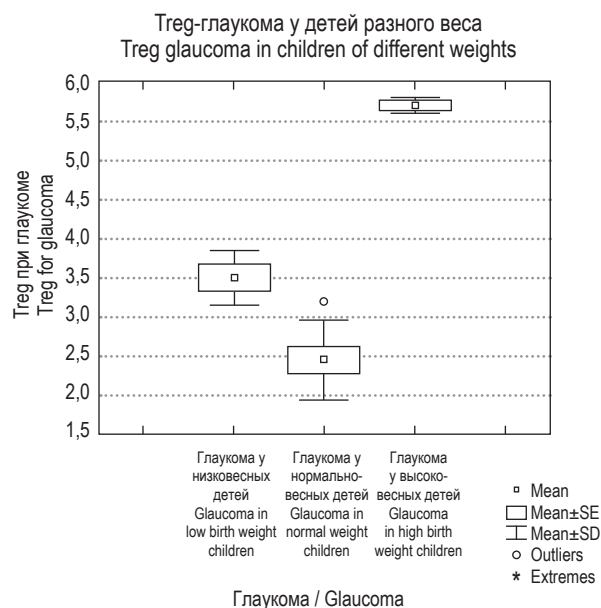


Рисунок 5. Количество Treg у доношенных детей с врожденными катарактой, глаукомой различного веса и соматически здоровых в сравнении со всеми прогрессирующими стадиями ретинопатии недоношенных

Figure 5. Number of Tregs in full-term children with congenital cataracts, glaucoma of various weights and somatically healthy children in comparison with all progressive stages of retinopathy of prematurity

На графике (рис. 8) представлены все исследуемые значения больных катарактой, глаукомой, ретинопатией недоношенных по сравнению с контролем доношенных соматически здоровых детей.

Как показано на рисунке 8, отмечается статистически достоверное различие ($p < 0,03$) при сравнении всех детей с разной степенью активности ретинопатии недоношенных и доношенных соматически здоровых детей.

При объединении всех доношенных детей с катарактой и глаукомой по весу были выявлены статистически достоверные различия между детьми с дефицитом веса, нормальным и повышенным весом при рождении ($p \leq 0,05$).

Заключение

Были обнаружены достоверные различия по количеству Т-регуляторных клеток ($CD4^+CD25^{high}FoxP3^+CD127^{low}$) между недоношенными и доношенными детьми, внутри групп по весовой категории при катаракте и глаукоме у доношенных детей по данным ранее произведенных нами исследований и при сопоставлении результатов в представленном исследовании у детей до 1 года. Удалось определить различия между стадиями РН по количеству Т-регуляторных клеток ($CD4^+CD25^{high}FoxP3^+CD127^{low}$), строго

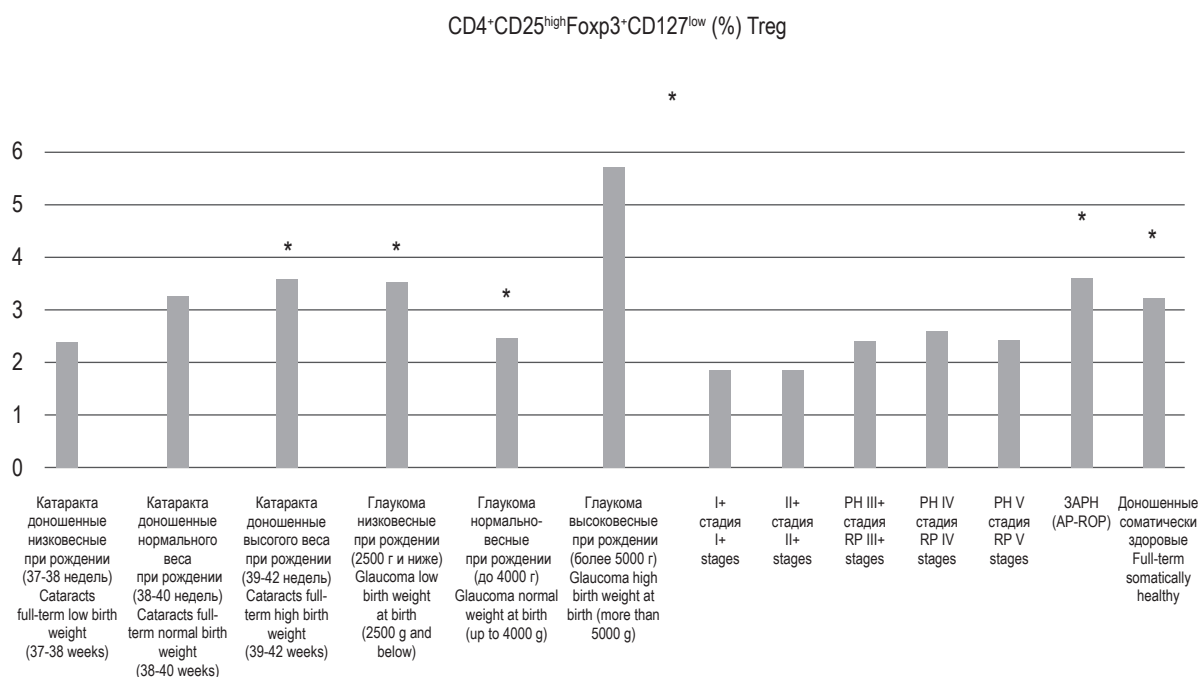


Рисунок 6. Количество Treg у доношенных детей с врожденными катарактой, глаукомой различного веса и соматически здоровых в сравнении со начальными прогрессирующими стадиями ретинопатии недоношенных
Figure 6. Number of Tregs in full-term children with congenital cataracts, glaucoma of various weights and somatically healthy children in comparison with the initial progressive stages of retinopathy of prematurity

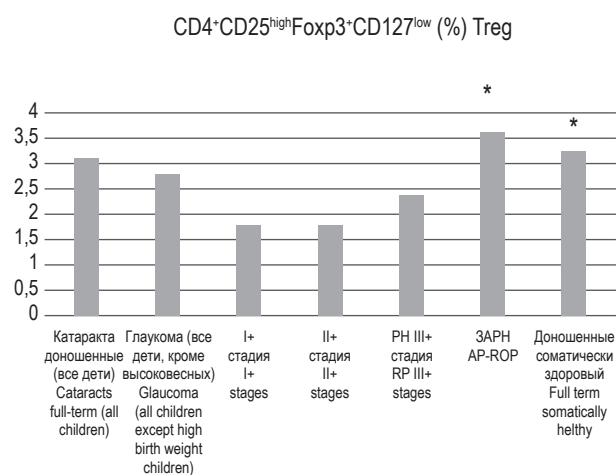


Рисунок 7. Количество Т-регуляторов у доношенных детей с врожденными катарактой, глаукомой и доношенных соматически здоровых

Figure 7. Number of T regulators in full-term children with congenital cataracts, glaucoma and somatically healthy full-term children

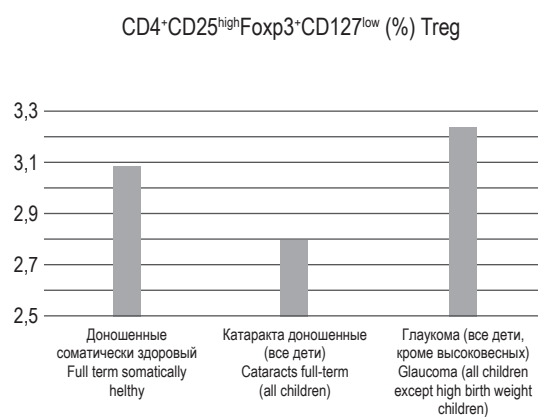


Рисунок 8. Количество Т-регуляторов у доношенных детей с врожденными катарактой, глаукомой в сравнении с ретинопатией недоношенных

Figure 8. Number of T regulators in full-term children with congenital cataracts, glaucoma in comparison with retinopathy of prematurity

подойти к выявлению прогрессирующих стадий РН, выделяя ЗАРН в особую форму патологии.

Выводы

1. Данное исследование является подтверждением возможного участия аутоиммунного ответа в патогенезе прогрессирующих стадий ретинопатии недоношенных. Об этом свидетельствует выявленное достоверное уменьшение количества Т-регуляторных клеток $CD4^+CD25^{high}FoxP3^+CD127^{low}$ у данной категории больных. При проведении сравнительных исследований прогрессирующие стадии РН сопровождаются, как правило, более низкими значениями Т-регуляторов, чем стационарные.

2. Задняя агрессивная ретинопатия недоношенных — это «другая» форма, которая, как правило, протекает на фоне показателей Т-регуляторов $CD4^+CD25^{high}FoxP3^+CD127^{low}$ несколько повышенных или мало отличающихся от нормальных значений по общепринятым нормам доношенных детей, и этим отличается от остальных стадий ретинопатии недоношенных ($p < 0,05$). Причина этой молниеносной формы заболевания, возможно, кроется в том числе в генетике.

3. У доношенных детей с врожденными катарактой, глаукомой и соматически здоровых по сравнению с недоношенными детьми, страдающими РН, обнаружено существенное различие по количеству Т-регуляторов $CD4^+CD25^{high}FoxP3^+CD127^{low}$ ($p < 0,03$).

4. По данным ранее проведенных собственных исследований, выявлены статистически до-

стоверные различия ($p < 0,01$) по количеству Т-регуляторов $CD4^+CD25^{high}FoxP3^+CD127^{low}$ у больных с низким и нормальным ($p = 0,04$), нормальным и высоким ($p = 0,02$) весом при рождении у доношенных детей с катарактой. Внутри группы разные дети по весу оказались в неравных соотношениях (30,8% — низковесные; 61,5% — нормовесные; 7,7% — высоковесные). Учитывая тот факт, что 61% детей с катарактой до 1 года — нормовесные дети, нельзя исключить, что появление катаракты у детей до года сопровождается также изменением обмена веществ, в том числе генетического характера, либо является причиной инфекционных заболеваний (в том числе внутриутробных).

5. В наших предыдущих исследованиях определено достоверное различие ($p = 0,0001$) в сторону понижения количества Т-регуляторных клеток ($p = 0,07$) при низком весе при рождении и в сторону повышения количества Трег ($CD4^+CD25^{high}FoxP3^+CD127^{low}$) при высоком весе при рождении у доношенных больных с глаукомой. Процентное соотношение детей по весу в подгруппах получилось в равных соотношениях (33,3%).

6. Данное исследование позволило выявить достоверные различия по количеству Т-регуляторных клеток ($CD4^+CD25^{high}FoxP3^+CD127^{low}$) в сравнении при основных офтальмологических заболеваниях детей в возрасте до 1 года — катаракте, глаукоме и ретинопатии недоношенных.

Список литературы / References

1. Балашова Л.М., Быковская С.Н., Кузнецова Ю.Д., Коробова Л.С., Кантаржи Е.П. Сравнительная оценка клеточного иммунитета у взрослых, пожилых людей и детей // Клиническая геронтология, 2010. Т. 16, № 11-12. С. 77- 78. [Balashova L.M., Bykovskaya S.N., Kuznetsova Yu.D., Korobova L.S., Kantarzhi E.P. Comparative assessment of cellular immunity in adults, the elderly and children. *Klinicheskaya gerontologiya = Clinical Gerontology*, 2010, Vol. 16, no. 11-12, pp. 77-78. (In Russ.)]
2. Балашова Л.М., Намиот В.А., Колениченко И.И., Кузнецова Ю.Д., Лесвой С.В., Черраин Д.Р., Кантаржи Е.П. Исследование плазмы крови, жидкости передней камеры глаза и стекловидного тела с помощью метода инверсионной мультисенсорной вольтамперометрии у детей с ретинопатией недоношенных и врожденной катарактой с заданными характеристиками и исследованиями, в том числе определением в крови Т-регуляторов $CD4^+CD25^{high}Foxp3^+CD127^{low}$ и VEGF A // Пролиферативный синдром в биологии и медицине: Материалы II Российского форума с международным участием. Москва, 29-30 ноября 2022 г. М.: ГЕОС, 2022. С. 95-105. [Balashova L.M., Namiot V.A., Kolenichenko I.I., Kuznetsova Yu.D., Lesvoy S.V., Cherain D.R., Kantarzhi E.P. Study of blood plasma, anterior chamber fluid and vitreous body using the method of inversion multisensor voltammetry in children with retinopathy of prematurity and congenital cataract with specified characteristics and studies, including determination of T-regulators $CD4^+CD25^{high}Foxp3^+CD127^{low}$ and VEGF A in the blood. *Proliferative syndrome in biology and medicine: Proceedings of the II Russian forum with international participation*. Moscow, November 29-30, 2022]. Moscow: GEOS, 2022, pp. 95-105.
3. Балашова Л.М., Быковская С.Н., Кузнецова Ю.Д., Коробова Л.С. Количественные и функциональные нарушения показателей клеточного иммунитета у взрослых, пожилых людей, соматически здоровых детей и больных ретинопатией недоношенных // Клиническая геронтология, 2012. Т. 18, № 11-12. С. 76-77. [Balashova L.M., Bykovskaya S.N., Kuznetsova Yu.D., Korobova L.S. Quantitative and functional disorders

of cellular immunity parameters in adults, elderly people, somatically healthy children and patients with retinopathy of prematurity. *Klinicheskaya gerontologiya = Clinical Gerontology*, 2012, Vol. 18, no. 11-12, pp. 76-77. (In Russ.)]

4. Балашова Л.М., Быковская С.Н., Кузнецова Ю.Д., Коробова Л.С. Количественные и функциональные нарушения показателей клеточного иммунитета у взрослых, соматически здоровых детей и больных ретинопатией недоношенных // *Аллергология и иммунология*, 2013. Т. 14, № 2. С. 145-146. [Balashova L.M., Bykovskaya S.N., Kuznetsova Yu.D., Korobova L.S. Quantitative and functional disorders of cellular immunity parameters in adults, somatically healthy children and patients with retinopathy of prematurity. *Allergologiya i immunologiya = Allergology and Immunology*, 2013, Vol. 14, no. 2, pp. 145-146. (In Russ.)]

5. Балашова Л.М., Кузнецова Ю.Д., Коробова Л.С., Мухин В.С., Черкашина Е.А., Попов А.В., Быковская С.Н. Т-регуляторы у недоношенных детей с ретинопатией различных стадий // *Аллергология и иммунология*, 2016. Т. 17, № 4. С. 263. [Balashova L.M., Kuznetsova Yu.D., Korobova L.S., Mukhin V.S., Cherkashina E.A., Popov A.V., Bykovskaya S.N. T-regulators in premature infants with retinopathy of various stages. *Allergologiya i immunologiya = Allergology and Immunology*, 2016, Vol. 17, no. 4, p. 263. (In Russ.)]

6. Балашова Л.М., Кузнецова Ю.Д., Коробова Л.С., Кантаржи Е.П., Мухин В.Е., Черкашина Е.А., Быковская С.Н. Состояние клеточного иммунитета взрослых, доношенных и недоношенных детей первого года жизни с ретинопатией // *Аллергология и иммунология*, 2017. Т. 18, № 4. С. 217-223. [Balashova L.M., Kuznetsova Yu.D., Korobova L.S., Kantarzhi E.P., Mukhin V.E., Cherkashina E.A., Bykovskaya S.N. The state of cellular immunity in adults, full-term and premature children in the first year of life with retinopathy. *Allergologiya i immunologiya = Allergology and Immunology*, 2017. Vol. 18, no. 4, pp. 217-223. (In Russ.)]

7. Балашова Л.М., Кузнецова Ю.Д., Коробова Л.С., Кантаржи Е.П., Мухин В.Е., Черкашина Е.А., Быковская С.Н. Состояние клеточного иммунитета при ретинопатии недоношенных с различными стадиями заболевания // *Аллергология и иммунология*, 2018. Т. 19, № 4. С. 222-228. [Balashova L.M., Kuznetsova Yu.D., Korobova L.S., Kantarzhi E.P., Mukhin V.E., Cherkashina E.A., Bykovskaya S.N. The state of cellular immunity in retinopathy of prematurity with various stages of the disease. *Allergologiya i immunologiya = Allergology and Immunology*, 2018, Vol. 19, no. 4, pp. 222-228. (In Russ.)]

8. Балашова Л.М., Намиот В.А., Колесниченко И.И., Кузнецова Ю.Д., Лесовой С.В. Мультисенсорная инверсионная вольтамперометрия при исследовании плазмы крови и жидкости передней камеры глаза у недоношенных детей с врожденной офтальмопатологией – катарактой и глаукомой – с учетом уровней Т-регуляторных клеток // *Пролиферативный синдром в биологии и медицине: Материалы II Российского форума с международным участием. Москва, 29-30 ноября 2022 г. М.: ГЕОС, 2023. С. 78-86. [Balashova L.M., Namiot V.A., Kolesnichenko I.I., Kuznetsova Yu.D., Lesovoy S.V. Multisensor inversion voltammetry in the study of blood plasma and fluid of the anterior chamber of the eye in premature infants with congenital ophthalmopathology – cataract and glaucoma – taking into account the level of T-regulatory cells. Proliferative syndrome in biology and medicine: Proceedings of the II Russian forum with international participation. Moscow, November 29-30, 2022]. Moscow: GEOS, 2023, pp. 78-86.*

9. Кузнецова Ю.Д., Балашова Л.М., Быковская С.Н. Значение иммунологических факторов в развитии ретинопатии недоношенных (обзорная статья) // *Российская педиатрическая офтальмология*, 2018. № 2. С. 81-86. [Kuznetsova Yu.D., Balashova L.M., Bykovskaya S.N. The importance of immunological factors in the development of retinopathy of prematurity (review article). *Rossiyskaya pediatricheskaya oftalmologiya = Russian Pediatric Ophthalmology*, 2018, no. 2, pp. 81-86. (In Russ.)]

Авторы:

Балашова Л.М. — д.м.н., профессор, генеральный директор, заведующая отделом экспериментальной и клинической офтальмологии НП «Международный научно-практический центр пролиферации тканей»; заведующая научно-исследовательской лабораторией детской офтальмологии ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Кузнецова Ю.Д. — к.м.н., руководитель детской офтальмологической службы НП «Международный научно-практический центр пролиферации тканей»; врач Российской детской клинической больницы ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Authors:

Balashova L.M., PhD, MD (Medicine), Professor, General Director, Head, Department of Experimental and Clinical Ophthalmology, International Scientific and Practical Center for Tissue Proliferation; Head, Research Laboratory of Children Ophthalmology, Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russian Federation

Kuznetsova Yu.D., PhD (Medicine), Head, Children's Ophthalmological Service, International Scientific and Practical Center for Tissue Proliferation; Doctor of the Russian Children's Clinical Hospital, Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russian Federation

Лесовой С.В. — научный сотрудник НП «Международный научно-практический центр пролиферации тканей»; врач-офтальмолог ГБУЗ города Москвы «Детская городская клиническая больница имени Н.Ф. Филатова Департамента здравоохранения города Москвы»; заведующий офтальмологическим отделением Российской детской клинической больницы ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Альварес М.А. — научный сотрудник отдела экспериментальной и клинической офтальмологии НП «Международный научно-практический центр пролиферации тканей», Москва, Россия

Балашов А.А. — лаборант отдела экспериментальной и клинической офтальмологии НП «Международный научно-практический центр пролиферации тканей», Москва, Россия

Черкашин Д.Р. — лаборант отдела экспериментальной и клинической офтальмологии НП «Международный научно-практический центр пролиферации тканей», Москва, Россия

Кантаржи Е.П. — к.б.н., профессор, заведующая отделом информатики НП «Международный научно-практический центр пролиферации тканей», Москва, Россия

Быковская С.Н. — д.м.н., профессор, заведующая отделом клеточных технологий и регенеративной медицины ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Салмаси Ж.М. — д.м.н., профессор, заведующий кафедрой патофизиологии ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Lesovoy S.V., Research Associate, International Scientific and Practical Center for Tissue Proliferation; Ophthalmologist, N. Filatov Children's City Clinical Hospital; Head, Ophthalmology Department, Russian Children's Clinical Hospital, Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russian Federation

Alvarez M.A., Research Associate, Department of Experimental and Clinical Ophthalmology, International Scientific and Practical Center for Tissue Proliferation, Moscow, Russian Federation

Balashov A.A., Laboratory Assistant, Department of Experimental and Clinical Ophthalmology, International Scientific and Practical Center for Tissue Proliferation, Moscow, Russian Federation

Cherkashin D.R., Laboratory Assistant, Department of Experimental and Clinical Ophthalmology, International Scientific and Practical Center for Tissue Proliferation, Moscow, Russian Federation

Kantarzhi E.P., PhD (Biology), Professor, Head, Department of Informatics, International Scientific and Practical Center for Tissue Proliferation, Moscow, Russian Federation

Bykovskaya S.N., PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Department of Cell Technologies and Regenerative Medicine, Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russian Federation

Salmasi Zh.M., PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Department of Pathophysiology, Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russian Federation

Поступила 30.01.2024
Отправлена на доработку 05.02.2024
Принята к печати 09.03.2024

Received 30.01.2024
Revision received 05.02.2024
Accepted 09.03.2024

ИССЛЕДОВАНИЕ ИММУНОЛОГИЧЕСКОЙ ЭФФЕКТИВНОСТИ И БЕЗОПАСНОСТИ КАНДИДАТНОЙ ВАКЦИНЫ ДЛЯ ПРОФИЛАКТИКИ ГЕМОРРАГИЧЕСКОЙ ЛИХОРАДКИ ЛАССА

Попова О., Зубкова О.В., Ожаровская Т.А., Зрелкин Д.И.,
Воронина Д.В., Голдовская П.П., Кан В.Ю., Должикова И.В.,
Гроусова Д.М., Ковыршина А.В., Ермолова И.А., Щебляков Д.В.,
Логунов Д.Ю., Гинцбург А.Л.

ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения РФ, Россия

Резюме. Геморрагическая лихорадка Ласса — острое инфекционное заболевание человека с высокой летальностью и пандемическим потенциалом. Геморрагическая лихорадка Ласса ежегодно уносит жизни тысяч людей. На сегодняшний день в мире нет одобренных средств для специфической терапии или профилактики заболевания. Целью данной работы было конструирование, изучение иммунобиологических свойств и доклинической безопасности кандидатной вакцины для профилактики геморрагической лихорадки Ласса на основе рекомбинантных аденовирусных векторов. В ходе работы использовались стандартные генно-инженерные, молекулярно-биологические, вирусологические методы и методы работы с лабораторными животными. В результате работы была сконструирована и охарактеризована комбинированная векторная кандидатная вакцина для профилактики геморрагической лихорадки Ласса — «ГамЛассаВак». Вакцина представлена двумя компонентами для гетерологичной иммунизации в режиме прайм-буст на основе рекомбинантных репликативно-дефектных аденовирусных векторов. Первый компонент вакцины — рекомбинантный аденовирус человека 26-го серотипа, второй компонент — аденовирус человека 5-го серотипа. Оба рекомбинантных вектора несут кодон-оптимизированную последовательность гликопротеина вируса Ласса. В GMP-условиях произведены и проанализированы две экспериментальные серии кандидатной вакцины. Приведены результаты исследований экспериментальных серий на соответствие требованиям, предъявляемым к вирусным векторным вакцинам. В доклинических исследованиях на мышах показана индукция анти-

Адрес для переписки:

Попова Ольга
ФГБУ «Национальный исследовательский центр
эпидемиологии и микробиологии имени почетного
академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства
здравоохранения РФ
123098, Россия, Москва, ул. Гамалеи, 18.
Тел.: 8 (499) 193-30-01.
Факс: 8 (499) 193-61-83.
E-mail: olga.popova31@yandex.ru

Address for correspondence:

Olga Popova
N. Gamaleya National Research Center
for Epidemiology and Microbiology
18 Gamaleya St
Moscow
123098 Russian Federation
Phone: +7 (499) 193-30-01.
Fax: +7 (499) 193-61-83.
E-mail: olga.popova31@yandex.ru

Образец цитирования:

О. Попова, О.В. Зубкова, Т.А. Ожаровская,
Д.И. Зрелкин, Д.В. Воронина, П.П. Голдовская,
В.Ю. Кан, И.В. Должикова, Д.М. Гроусова,
А.В. Ковыршина, И.А. Ермолова, Д.В. Щебляков,
Д.Ю. Логунов, А.Л. Гинцбург «Исследование
иммунологической эффективности и безопасности
кандидатной вакцины для профилактики
геморрагической лихорадки Ласса // Медицинская
иммунология, 2025. Т. 27, № 1. С. 153–168.
doi: 10.15789/1563-0625-SOT-2988

© Попова О. и соавт., 2025

Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

O. Popova, O.V. Zubkova, T.A. Ozharovskaia, D.I. Zrelkin,
D.V. Voronina, P.P. Goldovskaya, V.Yu. Kan, I.V. Dolzhikova,
D.M. Grousova, A.V. Kovyrshina, I.A. Ermolova,
D.V. Shcheblyakov, D.Yu. Logunov, A.L. Gintsburg “Study
of the immunological efficacy and safety of a candidate vaccine
against Lassa hemorrhagic fever”, *Medical Immunology
(Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2025, Vol. 27, no. 1,
pp. 153–168.
doi: 10.15789/1563-0625-SOT-2988

© Popova O. et al., 2025

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

DOI: 10.15789/1563-0625-SOT-2988

ген-специфических IgG при введении компонентов вакцины индивидуально и в режиме прайм-буст, а также динамика развития гуморального иммунного ответа на 42-й, 77-й, 119-й и 147-й дни после вакцинации. При этом, несмотря на 100%-ную сероконверсию, вируснейтрализующие антитела не были обнаружены ни в одном из образцов, полученных от иммунизированных мышей. В исследовании биораспределения показано, что через 24 часа после внутримышечного введения компонентов кандидатной вакцины ДНК аденовирусных векторов детектируется только в месте инъекции и региональных лимфатических узлах. В результате доклинических исследований безопасности (острая токсичность, хроническая токсичность, иммунотоксичность, алергизирующие свойства, репродуктивная токсичность) не выявлено противопоказаний для получения разрешения на клинические исследования кандидатной вакцины. В совокупности результаты демонстрируют, что кандидатная вакцина для профилактики геморрагической лихорадки Ласса на основе рекомбинантных аденовирусных векторов 26-го и 5-го серотипов является перспективным препаратом для специфической иммунопрофилактики.

Ключевые слова: геморрагическая лихорадка Ласса, вакцина, рекомбинантный аденовирусный вектор, аденовирус человека, иммуногенность, безопасность

STUDY OF THE IMMUNOLOGICAL EFFICACY AND SAFETY OF A CANDIDATE VACCINE AGAINST LASSA HEMORRHAGIC FEVER

**Popova O., Zubkova O.V., Ozharovskaia T.A., Zrelkin D.I.,
Voronina D.V., Goldovskaya P.P., Kan V.Yu., Dolzhikova I.V.,
Grousova D.M., Kovyrshina A.V., Ermolova I.A., Shcheblyakov D.V.,
Logunov D.Yu., Gintsburg A.L.**

N. Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation

Abstract. Lassa hemorrhagic fever is an acute human infectious disease with high mortality rate and pandemic potential. To date, there are no approved drugs for the specific treatment or prevention of Lassa hemorrhagic fever in the world. The aim of this study was to develop and evaluate the immunobiological properties and preclinical safety of a candidate vaccine for the prevention of Lassa hemorrhagic fever (LHF) based on recombinant human adenoviral vectors. Standard genetic engineering techniques, molecular biology techniques, virological methods, and animal testing procedures were used in the course of the study. A combined vector candidate vaccine for the prevention of Lassa hemorrhagic fever has been designed and characterized. The vaccine is composed of two components for heterologous immunization in a prime-boost regimen. Both components are based on recombinant replication-defective adenovirus vectors. The first component of the vaccine is a recombinant human adenovirus type 26; the second component is a recombinant human adenovirus type 5. Both recombinant vectors contain the codon-optimized sequence of Lassa virus glycoprotein. Two experimental batches of the candidate vaccine were produced under GMP-conditions and analyzed. The results of studies in compliance with appropriate specifications for viral vector vaccines are provided. In preclinical studies in mice, antigen-specific IgG response was detected after immunization with two vaccine components, either separately, or in a prime-boost regimen. The time dynamics of the IgG response was also studied on 42, 77, 119 and 147 days after immunization. At the same time, despite achieving 100% seroconversion, no virus neutralizing antibodies were detected in any of the samples collected from immunized mice. A biodistribution study showed that 24 hours following intramuscular injection of the vaccine components, the DNA of adenovirus vectors was detected only at the site of injection and in regional lymph nodes. Based on preclinical safety assessments (including acute toxicity, chronic toxicity, immunotoxicity, allergenic properties, reproductive toxicity), no contraindications were found for initiation of the candidate Lassa vaccine clinical trials. Taken together, the results demonstrate that the candidate vaccine for prevention of Lassa hemorrhagic fever based on recombinant adenovirus vectors types 26 and 5 is a promising drug for specific immunoprophylaxis.

Keywords: Lassa hemorrhagic fever, vaccine, adenovirus vector, human adenovirus, immunogenicity, safety assessment

Введение

Вирусные геморрагические лихорадки (ВГЛ) являются значительной причиной заболеваемости и смертности во всем мире. Эти заболевания характеризуются сложным течением, высоким уровнем летальности и обладают пандемическим потенциалом. Поскольку для большинства из них нет специфического лечения или средств профилактики, периодически возникающие вспышки могут принести разрушительный урон человечеству. Возбудители ВГЛ — ряд РНК-содержащих вирусов семейств *Filoviridae* (болезни, вызванные вирусами Эбола и Марбург), *Hantaviridae* (геморрагическая лихорадка с почечным синдромом, хантавирусный кардио-легочный синдром), *Nairoviridae* (геморрагическая лихорадка Крым-Конго, лихорадка Рифт-Валли), *Flaviviridae* (Денге, желтая лихорадка) и *Arenaviridae* (лимфоцитарный хореоменингит, Аргентинская, Боливийская и Венесуэльская геморрагические лихорадки, геморрагическая лихорадка Ласса) [13]. Геморрагическая лихорадка Ласса (ГЛЛ) — вирусное заболевание зоонозной природы, эндемичное для части западноафриканских стран (Нигерия, Мали, Гвинея, Того, Кот д'Ивуар, Сьерра-Леоне, Мали, Гана, Буркина-Фасо и Бенин). Этиологическим агентом ГЛЛ является РНК-содержащий вирус семейства *Arenaviridae* — вирус Ласса. Его природный резервуар — мыши рода *Mastomys natalensis*, распространенные на территории Африканского континента [12]. В трех из четырех случаев заболевание передается человеку при контакте с пищевыми продуктами или предметами обихода, контаминированными выделениями инфицированных грызунов [19]. Также имеет место передача от человека к человеку, особенно в больницах, где отсутствуют адекватные меры контроля и профилактики инфекций [19]. Ввиду ряда причин, среди которых отсутствие доступных диагностических тестов, состояние местного здравоохранения и социально-экономическое положение населения, на сегодняшний день нет эпидемиологических данных, объективно отражающих бремя, наносимое ГЛЛ населению эндемичных регионов. На основании данных, полученных в 80-х годах прошлого века, расчетная ежегодная заболеваемость составляет от 100 до 300 тысяч, до 5000 из которых заканчиваются летальным исходом [16]. Согласно современной математической модели, основанной на данных серологических исследований, прогнозируемая заболеваемость может составлять более 890 тысяч новых случаев в год [6].

Начиная с момента открытия вируса в 1969 году многие коммерческие и научные организа-

ции инициировали исследования по разработке вакцины для профилактики ГЛЛ. Однако на сегодняшний день в мире все еще нет одобренных препаратов для специфической профилактики инфекции. В 2018 году в Нигерии была зарегистрирована беспрецедентная по количеству инфицированных и умерших людей вспышка заболевания. В течение года в регионе зафиксировали 3506 случаев, из которых 633 были подтверждены лабораторно, тогда как в 2017 году аналогичные показатели составляли 1030 и 312 случаев [10]. В связи с этим в 2018 году ВОЗ включила вирус в список приоритетных патогенов, нуждающихся в ускоренной разработке лекарств и средств профилактики [23]. Это событие привело к значительному прогрессу в области разработки вакцин. На сегодняшний день описано несколько кандидатных препаратов, обладающих благоприятными прогнозами, все они получены с помощью рекомбинантных технологий [5].

В НИЦЭМ им Н.Ф. Гамалеи Минздрава РФ была разработана кандидатная комбинированная вакцина «ГамЛассаВак» для введения в режиме прайм-буст, основанная на репликативно-дефектных векторах, полученных из генетически и иммунологически отличных аденовирусов человека 26-го и 5-го серотипов, несущих протективный антиген вируса Ласса. Следует отметить, что вакцина «Гам-КОВИД-Вак» (Спутник V), сконструированная на той же технологической платформе, обладает доказанной безопасностью и эффективностью. По результатам клинических исследований показано, что вакцина хорошо переносится и индуцирует стойкий специфический протективный иммунный ответ [20, 21]. В данной работе описана технология конструирования рекомбинантных аденовирусных векторов, а также представлены результаты, полученные в рамках доклинических исследований кандидатной вакцины для профилактики ГЛЛ. Показано, что вакцина «ГамЛассаВак» не оказывает токсического действия и индуцирует стойкий антиген-специфический гуморальный иммунный ответ у экспериментальных животных.

Материалы и методы

Клеточные линии и бактериальные штаммы

В ходе работы использовали клеточные линии HEK293 — клетки почки человеческого эмбриона, содержащие в геноме E1 область Ad5; A549 — эпителиальные клетки аденокарциномы человека; Vero E6 — клетки почки зеленой африканской марышки; BHK21 — клетки почки новорожденного сирийского хомячка. Клетки культивировали в среде DMEM (HyClone, США) с добавлением

6%-ной фетальной сыворотки крупного рогатого скота (HyClone, США), пенициллина-стрептомицина (НПП «ПанЭко», Россия) и L-глутамина (НПП «ПанЭко», Россия) при 37 °C в атмосфере 5% CO₂.

Для генно-инженерных работ использовали лабораторные штаммы *E. coli DH5α* и *BJ5183*. Для культивирования бактериальных штаммов применяли среду 2xYT (ООО «Диаэм», Россия), агар бактериологический (ООО «Диаэм», Россия), селективные антибиотики ампициллин и канамицин (Thermo Fisher Scientific, США).

Получение рекомбинантных аденовирусных векторов

Ген гликопротеина вируса Ласса GPC (GenBank MH887755.1) синтезирован в ЗАО «Евроген». Плазмидные конструкции, кодирующие полный геном рекомбинантных аденовирусов с геном GPC в составе экспрессирующей каскады, получали методом гомологичной рекомбинации в клетках *E. coli* штамма *BJ5183*. Для получения рекомбинантных вирусов препаратами плазмидной ДНК трансфицировали клетки линии HEK293 реагентом Lipofectamine® 2000 (Invitrogen, США) в соответствии с рекомендациями производителя. Трансфицированные клетки пересеивали с увеличением посевной площади до наступления 100%-ного цитопатического действия. Получение рекомбинантных вирусных векторов подтверждали ПЦР в режиме реального времени (ПЦР-РВ).

Экспериментальные серии вакцины были произведены в условиях биотехнологического производства филиала «Медгамал» ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России.

Методы анализа экспериментальных серий

Анализ на стерильность, бактериальные эндотоксины, содержание общего белка проводились согласно Государственной фармакопее Российской Федерации XIV издания [1].

Анализ на отсутствие микоплазмы в испытуемых образцах определяли методом ПЦР с праймерами GPO1 (actcctacgggagggcagcagt) и MGSO (tgcaccatctgtcactctgttaacctc) с последующим электрофорезом в агарозном геле.

Для определения остаточной ДНК-культуры продуцента, а также подтверждения подлинности использовали метод ПЦР-РВ на приборе CFX 96 Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, США) с реакционной смесью qPCRMix-HS SYBR (ЗАО «Евроген», Россия). В анализах применяли праймеры, специфические к ДНК HEK293 (HEK-S2 — ctaacacgggtgaaccccg и HEK-A2 — cgcaccaggtctggagtg), гексону аденовируса 26 серотипа (Hex26_Real_F — CCCTCGGCTCGGGTTTCGACCC,

Hex26_Real_R — GTCGTTGCCGGGCCAGCTGACC), гексону аденовируса 5 серотипа (Real-Ad5F — CTGGGCAATGGTCGCTATGT, Real-Ad5R — AGAAGGTGGCGTAAAGGCAAAT), гликопротеину вируса Ласса (lassa-gpc-f — TCAGCCTTCTGGCAATATTGA, lassa-gpc-r — AAGTTGTTGAGCATGATCTTCC).

Количество вирусных частиц в препарате определяли набором Pico488 dsDNA quantification qit (Lumiprobe, США), для построения калибровочной кривой использовали стандартный образец аденовируса.

Концентрацию остаточного белка культуры продуцента оценивали с использованием коммерческого набора HEK 293 Host Cell Proteins (CYGNUS Technologies, США) согласно протоколу производителя.

Титр инфекционных частиц определяли в ТЦД₅₀ на культуре клеток HEK293 с учетом результатов на 10-14-й день после трансдукции [18].

2-й компонент вакцины (Ad5-GPC-LasV) проверяли на содержание репликативно-компетентных аденовирусов (РКА) титрованием в культуре клеток A549 с последующим нанесением агарозного покрытия. Учет результатов производили на 14-й день после трансдукции.

Иммуноблоттинг для оценки экспрессии GPC

Клетки линии A549 трансдуцировали аденовирусными векторами из расчета 1000 в. ч./клетку. Вестерн-блот анализ проводили, как описано ранее [15]. Для специфичного связывания с антигеном использовали сыворотку мышей, иммунизированных VSV-GPC-LasV, в разведении 1:1000. В качестве вторичных антител вносили антитела к IgG мыши, конъюгированные с пероксидазой хрена (Sigma, США), в разведении 1:2500.

Эксперименты с использованием лабораторных животных

Для оценки иммуногенных свойств самок мышей BALB/c (n = 8 в группе) иммунизировали внутримышечно в дозе 2,5 × 10¹⁰ в. ч. однократно каждым из компонентов вакцины или дважды с интервалом в 21 день (rAd26-GPC-LasV — 0-й день, rAd5-GPC-LasV — 21-й день). Образцы крови у мышей, иммунизированных однократно, отбирали на 42-й день. У мышей, вакцинированных в режиме прайм-буст, кровь отбирали на 42-й, 77-й, 119-й и 147-й дни после введения 1-го компонента.

Для изучения биораспределения компонентов кандидатной вакцины мышам линии BALB/c обоих полов (по 3 самки и 3 самца в группе) внутримышечно вводили по 100 мкл rAd26-GPC-LasV либо rAd5-GPC-LasV в дозе 2,5 × 10¹⁰ в. ч./животное, контрольной группе вводили раствор плацебо, соответствующий по составу буферному

раствору вакцины. Через 24 часа мышей эвтаназировали с помощью углекислого газа и отбирали образцы исследуемых органов и тканей (желудок, легкие, нижние лимфатические узлы, мозг, матка, мочевого пузырь, мышцы, печень, почки, селезенка, семенники, сердце, толстый кишечник, тонкий кишечник, яичники).

В эксперименте по изучению токсичности оценивали влияние вакцины на состояние экспериментальных животных (мышей и кроликов) при внутримышечном и внутривенном введении. Для каждого способа введения было сформировано по 4 группы аутобредных мышей обоего пола (по 10 самок и 10 самцов в группе) и по 4 группы кроликов породы Шиншилла (по 4 самки и 4 самца в группе), которым вводили кандидатную вакцину в разных дозах ($2,5 \times 10^9$ в. ч./животное; $2,5 \times 10^{10}$ в. ч./животное; $2,5 \times 10^{11}$ в. ч./животное) либо раствор плацебо с 7-дневным интервалом между компонентами. За животными наблюдали в течение 21 дня, ежедневно проводя клинический осмотр. Фиксировали параметры функционального состояния, внешний вид, физиологические функции. На 0-й, 7-й, 14-й, 21-й дни производили взвешивание. На 21-й день животных эвтаназировали и проводили полную некропсию. При некропии исследовали внешнее состояние тела, внутренние поверхности и проходы, полость черепа, грудную, брюшную и тазовую полости с находящимися в них органами и тканями, шею с органами и тканями и скелетно-мышечную систему. Производили взвешивание следующих органов: сердце, легкие, тимус, печень, селезенка, поджелудочная железа, почки, гонады, головной мозг. Парные органы взвешивали вместе.

Иммуноферментный анализ (ИФА)

Для сенсibilизации 96-луночного иммунологического планшета использовали VSV-GPC-LasV в конечной концентрации 2×10^7 БОЕ/мл в 50 мМ карбонатно-бикарбонатном буфере pH 9.5. После 18-часовой инкубации при 4 °C планшет трижды промывали ФСБ-Т и добавляли буфер для блокировки (ФСБ-Т с добавлением 5% обезжиренного сухого молока). Двукратные разведения сывороток иммунизированных мышей вносили в лунки планшета и инкубировали 1 час при 37 °C и 350 об/мин в планшетном термошейкере. После промывки в планшет вносили вторичные антитела к IgG мыши, конъюгированные с пероксидазой хрена (Sigma, США) в разведении 1:5000. Для визуализации связавшихся антител использовали субстрат ТМБ (Bio-Rad, США). Спустя 15 мин реакцию останавливали 1 М H_2SO_4

и результаты детектировали на спектрофотометре при длине волны 450 нм.

Получение вируса везикулярного стоматита, псевдотипированного гликопротеином вируса Ласса

Для определения титров GPC-специфических и вируснейтрализующих IgG в сыворотках крови иммунизированных мышей использовали рекомбинантный вирус везикулярного стоматита, несущий гликопротеин вируса Ласса (VSV-GPC-LasV). Вирус был получен по стандартной методике, описанной в [27]. Вирус накапливали в клетках VeroE6 и концентрировали двукратным ультрацентрифугированием в градиенте сахарозы. Инфекционный титр определяли титрованием на культуре VeroE6 с нанесением агарозного покрытия, выражали в БОЕ/мл.

Реакция нейтрализации псевдовироионов

Сыворотки крови иммунизированных мышей инкубировали 30 минут при 56 °C для инактивации системы комплемента. После готовили серийные разведения (двукратный шаг) сывороток от 1:5 до 1:640, к которым добавляли 100 БОЕ VSV-GPC-LasV. Смесь сывороток и вируса инкубировали в течение 1 часа при 37 °C. В качестве контролей использовали сыворотку крови intactных мышей и 100 БОЕ VSV-GPC-LasV без добавления антител. Далее вносили образцы в 12-луночные планшеты с высевными за сутки до постановки реакции клетками VeroE6 (монослой 90-100% конфлюэнтности). Через 3 часа инкубации (37 °C, 5% CO_2) культуральную среду, содержащую смесь вируса и антител, заменяли покрытием, содержащим 0,35% агарозы. Учет результатов производили через 72-96 часов. За положительные считали разведения сывороток, ингибирующих более 50% инфекционных вирусных частиц, относительно лунок, содержащих вирус без добавления антител.

Анализ биораспределения аденовирусных векторов

Пробы анализируемых тканей и органов гоменизировали, тотальную ДНК выделяли набором Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega, США) согласно рекомендациям производителя. Количество аденовирусной ДНК оценивали методом ПЦР-РВ с универсальными праймерами, комплементарными как к rAd26, так и rAd5 (Ad cons F — GGCGGCTGGCGGTAGAG, Ad cons R — GCAACATCTGGAACCGCG) в автоматическом режиме на амплификаторе CFX 96 Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, США). Для построения стандартной калибровочной кривой использовали серию 10-кратных последовательных разведений ДНК, выделенной из концентри-

рованного препарата рекомбинантного аденовируса с известным количеством копий генома.

Статистическая обработка результатов

Статистический анализ проводили с использованием компьютерных программ GraphPad 8.0 (GraphPad Software, США), а также Excel (Microsoft, США). Для количественных результатов рассчитывали среднее арифметическое, среднее геометрическое, стандартную ошибку среднего, стандартное отклонение. При анализе данных несвязанных выборок использовали критерий Стьюдента для независимых образцов или критерий Манна–Уитни в зависимости от нормальности распределения данных. Нормальность распределения определяли с помощью обобщенного теста Д’Агостино–Пирсона. Результаты сравнения групп считали статистически достоверными при $p < 0,05$.

Результаты

Конструирование кандидатной вакцины

Кандидатная вакцина «ГамЛассаВак» состоит из двух рекомбинантных репликативно-дефект-

ных аденовирусных векторов для гетерологичной прайм-буст иммунизации. Праймирующий компонент вакцины (1-й компонент) — вектор на основе аденовируса человека 26-го серотипа подгруппы D (rAd26-GPC-LasV). Геном rAd26-GPC-LasV содержит следующие модификации: 1) E1-область, необходимая для репликации, заменена экспрессионной кассетой, содержащей кодон-оптимизированную последовательность гена GPC вируса Ласса под контролем CMV-промотора и терминатор транскрипции SV40; 2) для повышения безопасности и увеличения пакующей емкости вектора удалена E3-область, содержащая гены белков, влияющих на иммунный ответ, но не участвующих в репликации вируса; 3) для культивирования в культуре клеток HEK293 открытая рамка считывания 6/7 (ORF6/7) E4-области заменена на аналогичную рамку, полученную из генома аденовируса человека 5 серотипа (рис. 1А). Бустующий компонент (2-й компонент) представлен вектором на основе аденовируса человека 5-го серотипа подгруппы C (rAd5-GPC-LasV). Геном rAd5-GPC-LasV не-

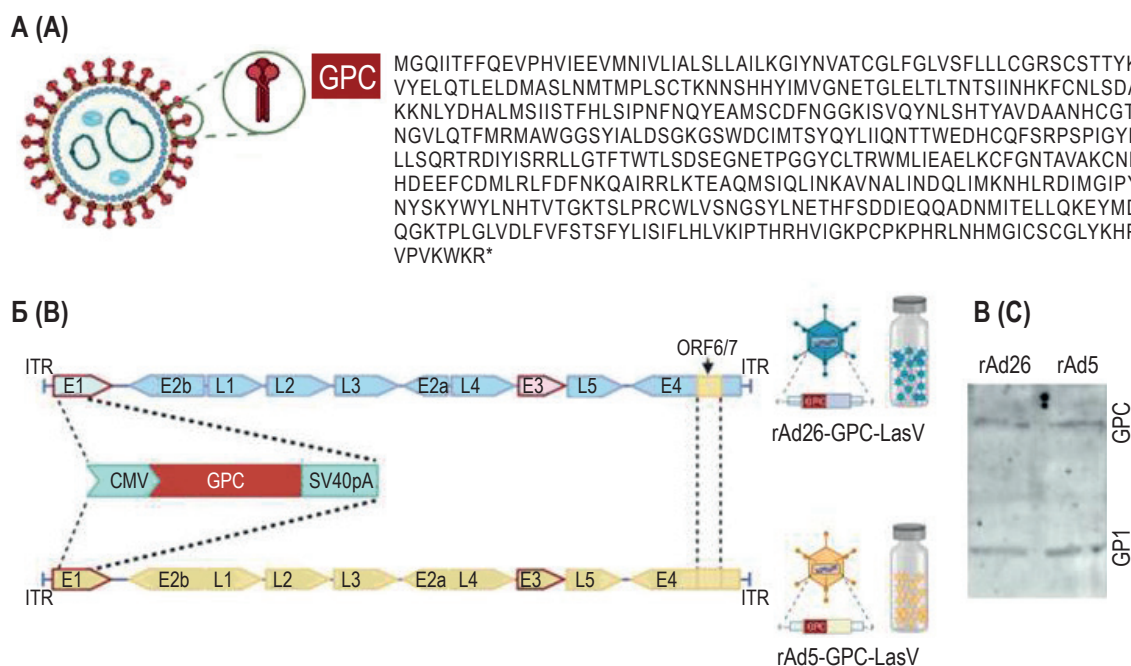


Рисунок 1. Конструирование кандидатной вакцины для профилактики ГЛЛ

Примечание. А – схематическое изображение вириона вируса Ласса и аминокислотная последовательность GPC. Б – схематическое изображение структуры генома рекомбинантных аденовирусов, несущих последовательность гликопротеина вируса Ласса. В – оценка экспрессии GPC в культуре клеток A549, трансдуцированных rAd26-GPC-LasV и rAd5-GPC-LasV.

Figure 1. Construction of a candidate vaccine for the prevention of LHF

Note. A, a schematic representation of the Lassa virus and the GPC amino acid sequence. B, a schematic representation of the genome structure of recombinant adenoviruses carrying the Lassa virus glycoprotein sequence are presented. C, an evaluation of GPC expression in A549 cell culture induced by rAd26-GPC-LasV and rAd5-GPC-LasV.

ТАБЛИЦА 1. ИССЛЕДОВАНИЯ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ СЕРИЙ КАНДИДАТНОЙ ВАКЦИНЫ «ГамЛассаВак» НА СООТВЕТСТВИЕ ТРЕБОВАНИЯМ, ПРЕДЪЯВЛЯЕМЫМ К ВИРУСНЫМ ВЕКТОРНЫМ ВАКЦИНАМ

TABLE 1. STUDIES OF THE EXPERIMENTAL SERIES OF THE "GamLassaVac" CANDIDATE VACCINE ON COMPLIANCE WITH THE REQUIREMENTS FOR VIRAL VECTOR VACCINES

Показатель Indicator	Требования проекта НД Requirements of the ND project	Серия № 1 Batch No. 1		Серия № 2 Batch No. 2	
		компонент 1 component 1	компонент 2 component 2	компонент 1 component 1	компонент 2 component 2
Общие тесты General tests					
Описание Description	Раствор замороженный беловатого цвета. После размораживания: однородный бесцветный слегка опалесцирующий раствор Frozen solution of whitish color. After defrosting: homogeneous colorless slightly opalescent solution	соотв. pass	соотв. pass	соотв. pass	соотв. pass
Стерильность Sterility	Должна быть стерильна Must be sterile	стерильна sterile	стерильна sterile	стерильна sterile	стерильна sterile
Микоплазмы Mycoplasma	Не должна содержать Must not contain	не содержит not contain	не содержит not contain	не содержит not contain	не содержит not contain
Бактериальные эндотоксины Bacterial endotoxins	Не более 100 единиц эндотоксина/дозу No more than 100 units of endotoxin/dose	соотв. pass	соотв. pass	соотв. pass	соотв. pass
Основные тесты Basic tests					
Подлинность Identity	Должен присутствовать ген гексона аденовируса (ПЦР-РВ) The adenovirus hexon gene must be present (RT-qPCR)	соотв. pass	соотв. pass	соотв. pass	соотв. pass
	Должен присутствовать ген GPC (ПЦР-РВ) The GPC gene must be present (RT-qPCR)	соотв. pass	соотв. pass	соотв. pass	соотв. pass
	Должна вызывать образование специфических антител к GPC в титре не менее 1:200 Should induce the production of antibodies specific for GPC in a titer of at least 1:200	1:800	1:800	1:400	1:800
Общий белок Total protein	Не более 100 мкг/дозу No more than 100 mcg/dose	34,7	30,2	30,2	27,9
Остаточный белок Host cell protein	Не более 100 нг/дозу No more than 100 ng/dose	0	67,5	5	30
Остаточная ДНК Host cell DNA	Не более 10 нг/дозу No more than 10 ng/dose	0	0,39	0, 42	0,12

Таблица 1 (окончание)
Table 1 (continued)

Показатель Indicator	Требования проекта НД Requirements of the ND project	Серия № 1 Batch No. 1		Серия № 2 Batch No. 2	
		компонент 1 component 1	компонент 2 component 2	компонент 1 component 1	компонент 2 component 2
Специфические тесты Specific tests					
Количество вирусных частиц Virus particle concentration	(2,5±1,25) × 10 ¹¹ в. ч./дозу (2.5±1.25) × 10 ¹¹ vp/dose	3,20 × 10 ¹¹	2,7 × 10 ¹¹	2,5 × 10 ¹¹	2,2 × 10 ¹¹
Специфическая активность Specific activity	Не менее 1 × 10 ⁷ ТЦД ₅₀ /мл At least 1 × 10 ⁷ TCID ₅₀ /mL	4,22 × 10 ⁸	5,62 × 10 ⁸	2,37 × 10 ⁸	3,16 × 10 ⁸
Безопасность Safety	Не более 100 РКА × на дозу (для компонента 2) No more than 100 RCA × per dose (for component 2)		соотв. pass	соотв. pass	соотв. pass

Примечание. * – репликативно-компетентный аденовирус.

Note. *, replication-competent adenovirus.

сет аналогичные модификации E1 и E3-областей (рис. 1А).

В качестве протективного антигена выбрали поверхностный белок вируса Ласса – гликопротеин GPC, отвечающий за связывание с рецепторами и слияние с клеточной мембраной (рис. 1Б). Нуклеотидная последовательность антигена была оптимизирована для экспрессии в клетках млекопитающих. Замена редких кодонов синонимичными триплетами с учетом частоты встречаемости обеспечивает более эффективную трансляцию мРНК в трансдуцированных клетках, усиливая, тем самым, иммунологический потенциал антигена. Экспрессию гена GPC в составе аденовирусных векторов подтверждали трансдукцией клеток A549 с последующим вестерн-блот анализом (рис. 1В).

Для проведения доклинических исследований были произведены 2 экспериментальные серии вакцины. Основные показатели качества серий вакцины представлены в таблице 1.

Кандидатная вакцина индуцирует специфический гуморальный иммунный ответ у мышей

Для определения уровня антиген-специфического иммунного ответа мыши линии BALB/c были иммунизированы однократно одним из компонентов кандидатной вакцины или в режиме прайм-буст с интервалом в 21 день (рис. 2А). Сыворотки крови мышей, отобранные на 42-й день после первой иммунизации, анализировали методом ИФА. Результаты демонстрируют, что оба компонента вакцины являются иммуноген-

ными (1-й компонент СГТ = 366,8; 2-й компонент СГТ = 616,9), а наиболее выраженный гуморальный ответ развивается при введении двух компонентов в режиме прайм-буст (СГТ = 1131) (рис. 2Б).

Динамику развития гуморального ответа изучали на мышах, иммунизированных двумя компонентами с интервалом в 21 день. Уровень антител, специфических к гликопротеину вируса Ласса, оценивали через 42, 77, 119 и 147 дней после праймирующей иммунизации (рис. 3А). Согласно полученным данным, кандидатная вакцина индуцирует формирование стойкого гуморального иммунного ответа, специфические антитела циркулируют в крови грызунов на протяжении не менее 4 месяцев (рис. 3Б).

Детекцию вируснейтрализующих антител осуществляли в реакции с рекомбинантным вирусом везикулярного стоматита, псевдотипированным GPC вируса Ласса. Несмотря на 100%-ную сероконверсию, вируснейтрализующие антитела (ВНА) не были обнаружены ни в одном из образцов.

Биораспределение кандидатной вакцины в органах и тканях

Исследование биораспределения аденовирусных векторов при внутримышечном введении проводили на мышах. Было сформировано три экспериментальные группы животных, которым внутримышечно вводили по 100 мкл ($2,5 \times 10^{10}$ в. ч.) исследуемых аденовирусных векторов, контрольной группе вводили раствор пла-

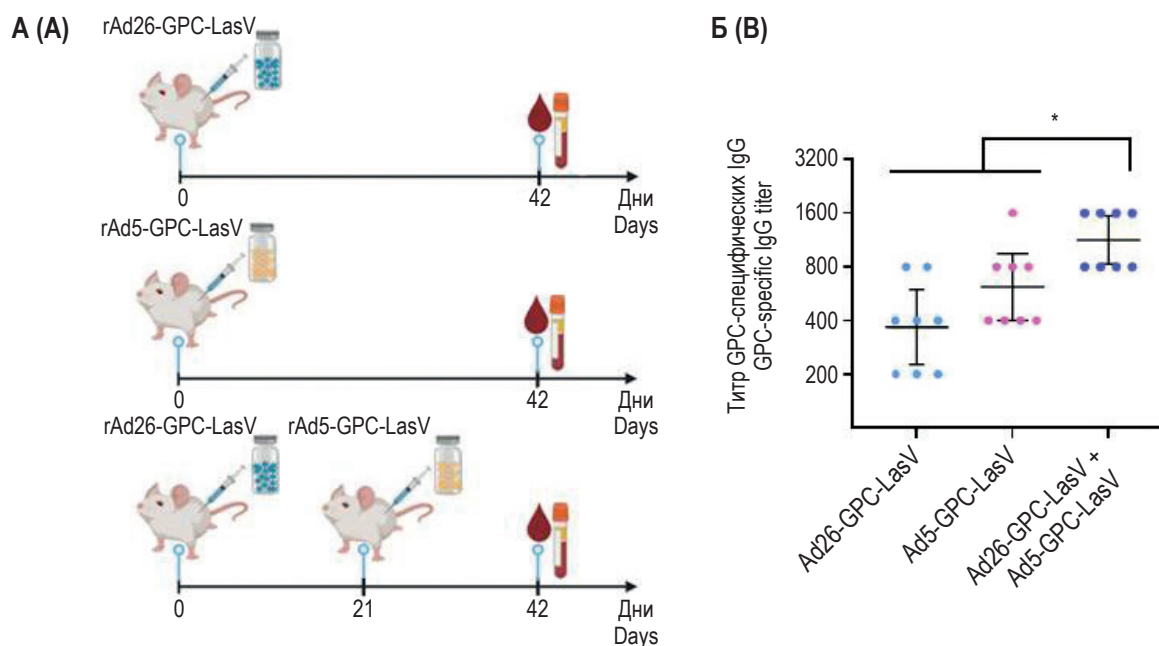


Рисунок 2. Оценка индукции гуморального иммунного ответа у мышей

Примечание. А – дизайн эксперимента. Б – титры GPC-специфических IgG в сыворотках крови мышей при однократном введении компонентов вакцины либо двукратном введении в режиме прайм-буст; на графике отмечены СГТ и 95% доверительный интервал (ДИ), * $p < 0,05$, тест Манна–Уитни.

Figure 2. Evaluation of the induction of the humoral immune response in mice

Note. A, the design of the experiment. B, titers of GPC-specific IgG in mouse serum after a single administration of vaccine components or a double administration in prime-boost regimen; the graph shows the AGT and 95% confidence interval (CI), * $p < 0.05$, Mann–Whitney test.

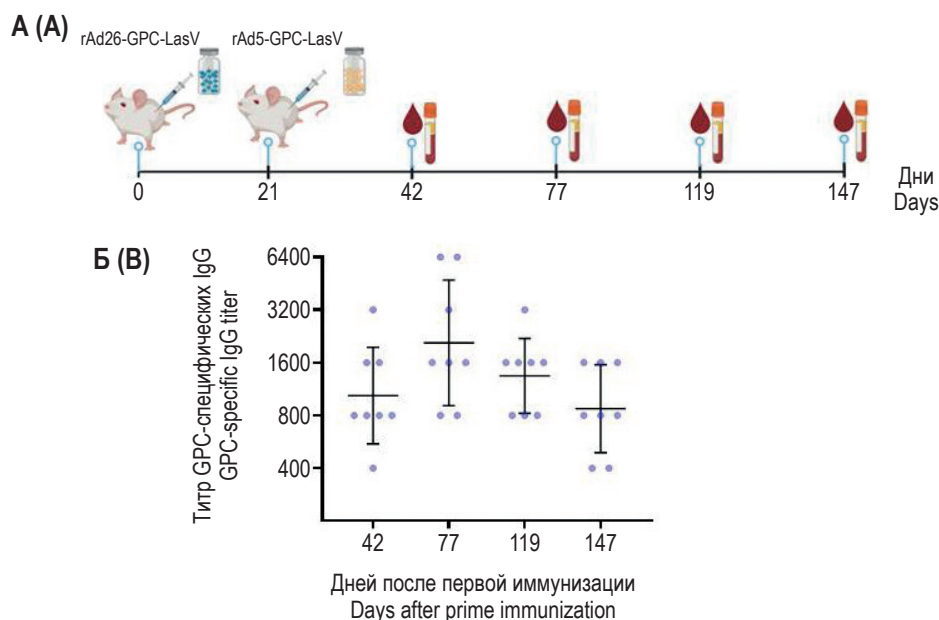


Рисунок 3. Динамика развития гуморального иммунного ответа у мышей

Примечание. А – дизайн эксперимента. Б – титры GPC-специфических IgG в сыворотках крови мышей, иммунизированных кандидатной вакциной в режиме прайм-буст; на графике отмечены СГТ и 95% доверительный интервал (ДИ).

Figure 3. Dynamic of the development of the humoral immune response in mice

Note. A, the design of the experiment. B, titers of GPC-specific IgG in the sera of mice immunized with the candidate vaccine in the prime-boost regimen; the graph shows the AGT and 95% confidence interval (CI).

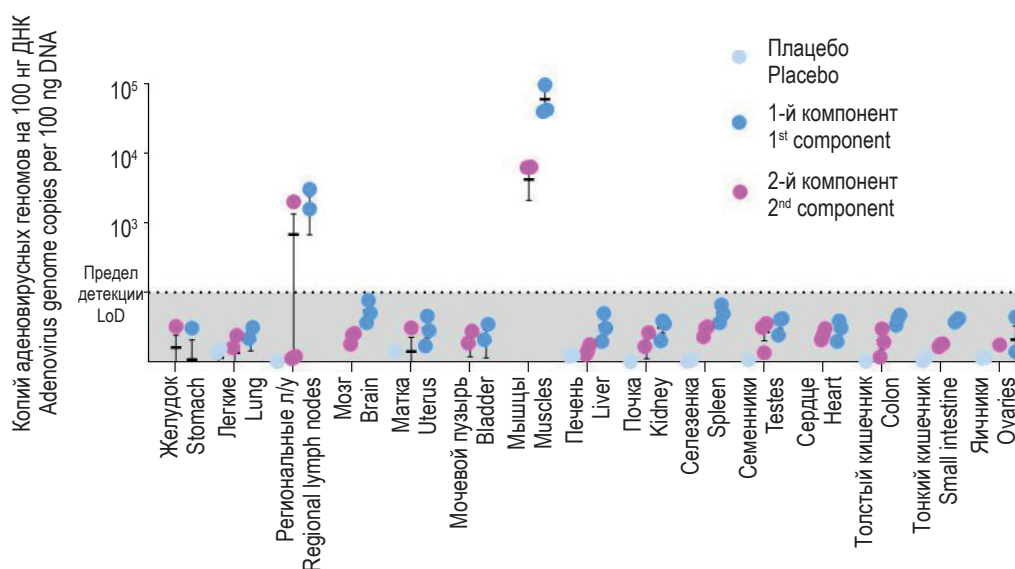


Рисунок 4. Биораспределение компонентов кандидатной вакцины в органах и тканях мышей при однократном внутримышечном введении

Figure 4. Biodistribution of the candidate vaccine components in the organs and tissues of mice after a single intramuscular injection

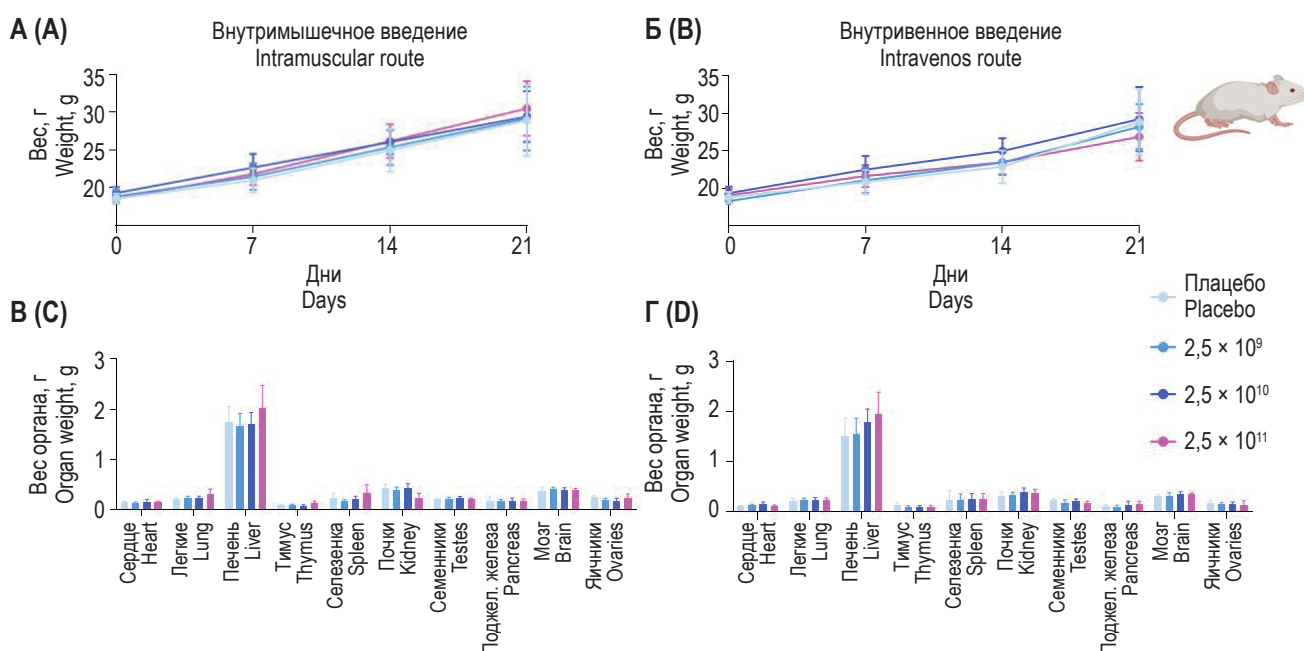


Рисунок 5. Изучение острой токсичности кандидатной вакцины на мышах

Примечание. А, Б – график изменения массы тела экспериментальных животных при внутримышечном либо внутривенном введении. В, Г – вес внутренних органов экспериментальных животных на 14-е сутки после внутримышечного либо внутривенного введения.

Figure 5. Study of the acute toxicity of the candidate vaccine in mice

Note. A,B, graph of body weight changes in experimental animals with intramuscular or intravenous administration. C, D, weight of the organs of experimental animals on the 14th day after intramuscular or intravenous administration.

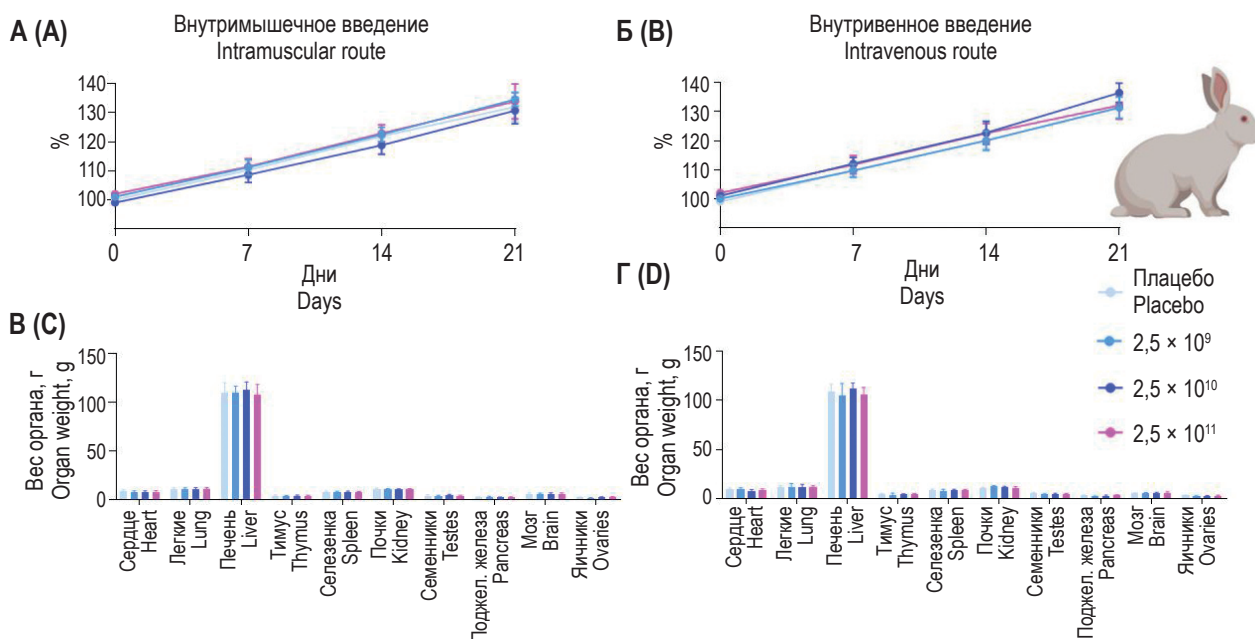


Рисунок 6. Изучение острой токсичности кандидатной вакцины на кроликах

Примечание. См. примечание к рисунку 5.

Figure 6. Study of the acute toxicity of the candidate vaccine in rabbits

Note. As for Figure 5.

цебо в том же объеме. Через 24 производили отбор органов для выделения тотальной ДНК. Как показано на рисунке 4, для аденовирусных векторов характерно распределение в месте введения (мышцы) — rAd5-GPC-LasV — 6307,97 копий геномов на 100 нг тотальной ДНК, rAd26-GPC-LasV — 59794,04 копий геномов на 100 нг тотальной ДНК. Также ДНК векторов детектировалась в нижних лимфатических узлах — rAd5-GPC-LasV — 2006,01 копий геномов на 100 нг тотальной ДНК, rAd26-GPC-LasV — 2312,15 копий геномов на 100 нг тотальной ДНК. В других образцах количество геномов рекомбинантных аденовирусов было ниже предела обнаружения ПЦР-системы.

Исследование безопасности кандидатной вакцины для профилактики лихорадки Ласса

В ходе доклинических исследований безопасности проведена оценка токсичности кандидатной вакцины при однократном введении в режиме прайм-буст (последовательно компоненты 1 и 2 с сокращенным интервалом введения относительно планируемого клинического применения) на мышах и кроликах (самцы и самки). Вакцину вводили внутримышечно или внутривенно в возрастающих дозах: $2,5 \times 10^9$, $2,5 \times 10^{10}$ и $2,5 \times 10^{11}$ в. ч. Через 7 дней после введения 1-го компонента экспериментальным животным вводили 2-й компонент вакцины. Животные контрольной группы получали раствор плацебо.

Тестируемые животные (мыши и кролики) хорошо перенесли как внутримышечное, так и внутривенное введение аденовирусных препаратов во всех дозах. За время наблюдения ни одно животное не пало, клинических признаков интоксикации не наблюдали. Интегральные показатели состояния животных не отличались между опытными и контрольными группами. Отмечена положительная динамика изменения массы тела животных во всех группах (рис. 5, 6). На 21-е сутки после введения 1-го компонента кандидатной вакцины все животные подвергались некропии. При макроскопическом исследовании не установлено влияния вакцины на состояние внутренних органов мышей и кроликов, различий между контрольными и опытными группами не обнаружено (рис. 5, 6).

Также в ходе доклинических исследований были изучены следующие показатели безопасности: хроническая токсичность при повторном введении на кроликах и крысах, иммунотоксичность на мышах гибридах F1 (CBAx C57Bl/6) и мышах линий CBA и C57Bl/6, аллергизирующие свойства при повторном введении на морских свинках альбиносах, репродуктивная токсичность на крысах. Некоторые отклонения от контрольных групп были выявлены только в тестах по оценке иммунологической токсичности. Показано умеренное влияние компонентов вакцины, введенных в высоких дозах, на активность

перитонеальных макрофагов, массу селезенки и клеточность иммунокомпетентных органов. Выявленные эффекты свидетельствуют об иммунологической активности препарата. Результаты остальных исследований демонстрировали полное отсутствие нежелательных реакций, связанных с введением препарата. По результатам проведенных исследований было получено разрешение на проведение клинических исследований кандидатной вакцины для профилактики ГЛЛ (№ 607 от 20.10.2022).

Обсуждение

Несмотря на то, что ГЛЛ остается эндемичной для стран Западной Африки, она представляет угрозу для всего мира. Наиболее рентабельный и эффективный способ контроля подобных заболеваний — вакцинопрофилактика. На сегодняшний день на разных стадиях разработки находятся более 30 кандидатных вакцин для профилактики ГЛЛ [5]. Три из них вступили в фазу клинических исследований: ДНК-вакцина INO-4500, кодирующая ген GPC; а также две вакцины на основе вирусных векторов: rVSVΔG-LASV-GPC (рекомбинантный вирус везикулярного стоматита, несущий ген гликопротеина) и MV-LASV (рекомбинантная живая аттенуированная вакцина на основе вируса кори с двумя антигенами вируса Ласса — GPC и NP) [2, 3, 11, 25]. Опубликованные в 2023 году результаты I фазы клинических исследований MV-LASV свидетельствуют о хорошей переносимости и индукции гуморального ответа у людей [26].

Целевой профиль продукта, составленный ВОЗ для кандидатных вакцин для профилактики ГЛЛ, включает следующие критерии: безопасность для людей всех возрастов и беременных женщин, эффективность после однократной иммунизации, длительная защита, кросс-протекция против разных штаммов вируса, термостабильность и возможность быстрого производства в экстренной ситуации [28]. Мы ожидаем, что вакцина на основе рекомбинантных аденовирусных векторов может соответствовать данным параметрам. Аденовирусные векторы вызывают длительную экспрессию трансгена, являются мощными индукторами гуморального и клеточного иммунного ответа, которые усиливаются благодаря гетерологичной иммунизации в режиме прайм-буст. Аденовекторы являются репликативно-дефектными и, как следствие, менее реактогенными и более безопасными в сравнении с живыми вакцинами, что позволяет применять их для иммунизации в разных группах популяции,

включая людей с различными формами иммуносупрессии.

Нами была сконструирована и охарактеризована кандидатная комбинированная вакцина «ГамЛассаВак» для введения в режиме прайм-буст на основе рекомбинантных аденовирусных векторов человека 26-го и 5-го серотипов. В GMP-условиях были произведены и проанализированы на соответствие требованиям, предъявляемым к качеству вирусных векторных вакцин, 2 экспериментальные серии.

На этапе изучения иммуногенных свойств кандидатной вакцины показано, что GPC-специфические IgG формируются при введении каждого компонента, а при применении иммунизации в режиме прайм-буст титры антител достоверно увеличиваются и циркулируют в крови на протяжении не менее 4 месяцев. При этом антитела не проявляют нейтрализующую активность в реакции с псевдовирioнами. Обеспечивают ли нейтрализующие антитела вклад в протекцию при ГЛЛ до конца не ясно. Существующие данные по этой теме достаточно противоречивы. На сегодняшний день разработано несколько перспективных вакцин, для которых показана протективная активность на разных животных моделях летальной инфекции. Однако большинство из них индуцируют формирование только ненейтрализующих GPC-специфических IgG [4, 7, 22]. В то же время у людей, перенесших ГЛЛ, ВНА начинают детектироваться в низких титрах (1:10-1:100) через 4-8 месяцев после выздоровления [17]. В пользу того, что нейтрализующие антитела могут опосредовать защиту, приводят успешные экспериментальные результаты терапии морских свинок и приматов моноклональными антителами и сообщения об использовании реконвалесцентной сыворотки для лечения людей [8, 9, 14, 24]. В любом случае данный вопрос требует более глубокого изучения. Возможно, результаты исследований иммуногенных свойств кандидатных вакцин на клиническом уровне внесут большую ясность.

Было изучено биораспределение векторов для определения потенциальных тканей-мишеней, в которые могут диссеминировать рекомбинантные вирусные частицы при внутримышечном введении. Через 24 часа после введения компонентов кандидатной вакцины ДНК аденовирусных векторов детектировалась в месте инъекции и в региональных лимфатических узлах. Положительный сигнал в образцах лимфатических узлов свидетельствует о том, что рекомбинантные векторы были распознаны и захвачены иммунными клетками. Важно отметить, что результаты

анализа основаны на детекции фрагментов ДНК аденовирусных векторов. Данный метод не позволяет дифференцировать инфекционно-активные вирусные частицы от фрагментов генома разрушенных векторов.

На этапе доклинического изучения токсических свойств показано, что как внутримышечное, так и внутривенное введение компонентов кандидатной вакцины не влияет на интегральные показатели состояния экспериментальных животных (мышей и кроликов). Колебания индивидуальных и средних групповых значений массы тела животных находились в пределах нормального диапазона изменчивости. Некропсия не выявила патоморфологических изменений, связанных с введением препарата. Умеренные отклонения от контрольных групп были зафиксированы при изучении иммунологической токсичности, что, однако, не влияло на развитие гуморального и Т-клеточного иммунного ответа у экспериментальных животных. В исследованиях по оценке аллергизирующих свойств, хрониче-

ской токсичности и репродуктивной токсичности не было выявлено негативного воздействия препарата. Также стоит иметь в виду, что минимальная доза аденовирусных частиц ($2,5 \times 10^{10}$), введенная мышам, по меньшей мере, в 100 раз превышает потенциальную человеческую дозу в пересчете на массу тела.

Заключение

В совокупности наши результаты демонстрируют, что кандидатная вакцина для профилактики ГЛЛ на основе рекомбинантных аденовирусных векторов 26-го и 5-го серотипов является перспективным препаратом для специфической иммунопрофилактики. В будущем планируется более детальное изучение гуморального иммунного ответа, в частности эффекторных свойств антител (антител-зависимая цитотоксичность, антител-зависимый фагоцитоз); оценка индукции специфического Т-клеточного иммунного ответа и анализ перекрестной активности против гетерологичных штаммов вируса Ласса.

Список литературы / References

1. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. М.: Министерство здравоохранения Российской Федерации, 2018. 7019 с. [State Pharmacopoeia of the Russian Federation. XIV ed.] Moscow: Ministry of Health of the Russian Federation, 2018. 7019 p.
2. A Clinical Trial to Evaluate the Safety and Immunogenicity of rVSVΔG-LASV-GPC Vaccine in Adults in Good General Health. ClinicalTrials.gov. Available at: <https://www.clinicaltrials.gov/study/NCT04794218>.
3. A Trial to Evaluate the Optimal Dose of MV-LASV (V182-001). ClinicalTrials.gov. Available at: <https://www.clinicaltrials.gov/study/NCT04055454>.
4. Abreu-Mota T., Hagen K.R., Cooper K., Jahrling P.B., Tan G., Wirblich C., Johnson R.F., Schnell M.J. Non-neutralizing antibodies elicited by recombinant Lassa-Rabies vaccine are critical for protection against Lassa fever. *Nat. Commun.*, 2018, Vol. 9, no. 1, 4223. doi: 10.1038/s41467-018-06741-w.
5. Ademusire B.I., Wiczorek K., Alonge A.T., Rajen A., Egbe J., Adebambo D., Offorbuike C.B., Trojan F., Przypański Z., Oduguwa I.O., Omitoyin O., Balogun T.G. Prospects of Lassa Fever candidate vaccine. *Afr. J. Infect. Dis.*, 2022, Vol. 16, no. 2, pp. 46-58.
6. Basinski A.J., Fichet-Calvet E., Sjodin A.R., Varrelman T.J., Remien C.H., Layman N.C., Bird B.H., Wolking D.J., Monagin C., Ghersi B.M., Barry P.A., Jarvis M.A., Gessler P.E., Nuismer S.L. Bridging the gap: Using reservoir ecology and human serosurveys to estimate Lassa virus spillover in West Africa. *PLoS Comput. Biol.*, 2021, Vol. 17, no. 3, e1008811. doi: 10.1371/journal.pcbi.1008811.
7. Cai Y., Ye C., Cheng B., Nogales A., Iwasaki M., Yu S., Cooper K., Liu D.X., Hart R., Adams R., Brady T., Postnikova E.N., Kurtz J., St. Claire M., Kuhn J.H., de la Torre J.C., Martínez-Sobrido L. A Lassa Fever live-attenuated vaccine based on codon deoptimization of the viral glycoprotein gene. *mBio*, 2020, Vol. 11, no. 1, e00039-20. doi: 10.1128/mBio.00039-20.
8. Cross R.W., Fenton K.A., Woolsey C., Prasad A.N., Borisevich V., Agans K.N., Deer D.J., Dobias N.S., Fears A.C., Heinrich M.L., Geisbert J.B., Garry R.F., Branco L.M., Geisbert T.W. Monoclonal antibody therapy protects nonhuman primates against mucosal exposure to Lassa virus. *Cell Rep. Med*, 2024, Vol. 5, no. 2, 101392. doi: 10.1016/j.xcrm.2024.101392.
9. Cross R.W., Mire C.E., Branco L.M., Geisbert J.B., Rowland M.M., Heinrich M.L., Goba A., Momoh M., Grant D.S., Fullah M., Khan S.H., Robinson J.E., Geisbert T.W., Garry R.F. Treatment of Lassa virus infection in outbred guinea pigs with first-in-class human monoclonal antibodies. *Antivir. Res.*, 2016, Vol. 133, pp. 218-222.

10. Dan-Nwafor C.C., Furuse Y., Ilori E.A., Ipadeola O., Akabike K.O., Ahumibe A., Ukponu W., Bakare L., Okwor T.J., Joseph G., Mba N.G., Akano A., Olayinka A.T., Okoli I., Okea R.A., Makava F., Ugbogulu N., Oladele S., Namara G., Muwanguzi E.N., Naidoo D., Mutbam S.K., Okudo I., Woldetsadik S.F., Lasuba C.L., Ihekweazu C. Measures to control protracted large Lassa fever outbreak in Nigeria, 1 January to 28 April 2019. *Euro Surveill.*, 2019, Vol. 24, no. 20. 1900272. doi: 10.2807/1560-7917.ES.2019.24.20.1900272.
11. Dose-ranging Study: Safety, Tolerability and Immunogenicity of INO-4500 in Healthy Volunteers in Ghana. ClinicalTrials.gov. Available at: <https://www.clinicaltrials.gov/study/NCT04093076>.
12. Fichet-Calvet E. Lassa Fever: A rodent-human interaction. In: Johnson N. (ed.). The role of animals in emerging viral diseases. Academic Press, 2014, pp. 89-123.
13. Flórez-Álvarez L., de Souza E.E., Botosso V.F., de Oliveira D.B.L., Ho P.L., Taborda C.P., Palmisano G., Capurro M.L., Pinho J.R.R., Ferreira H.L., Minoprio P., Arruda E., de Souza Ferreira L.C., Wrenger C., Durigon E.L. Hemorrhagic fever viruses: Pathogenesis, therapeutics, and emerging and re-emerging potential. *Front. Microbiol.*, 2022, Vol. 13, 1040093. doi.org/10.3389/fmicb.2022.1040093.
14. Frame J.D., Verbrugge G.P., Gill R.G., Pinneo L. The use of Lassa fever convalescent plasma in Nigeria. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 1984, Vol. 78, no. 3, pp. 319-324.
15. Godakova S.A., Noskov A.N., Vinogradova I.D., Ugriumova G.A., Solovyev A.I., Esmagambetov I.B., Tukhvatulin A.I., Logunov D.Y., Naroditsky B.S., Shcheblyakov D.V., Gintsburg A.L. Camelid VHHs Fused to Human Fc Fragments Provide Long Term Protection Against Botulinum Neurotoxin A in Mice. *Toxins*, 2019, Vol. 11, no. 8, 464. doi: 10.3390/toxins11080464.
16. Hallam H.J., Hallam S., Rodriguez S.E., Barrett A.D.T., Beasley D.W.C., Chua A., Ksiazek T.G., Milligan G.N., Sathiyamoorthy V., Reece L.M. Baseline mapping of Lassa fever virology, epidemiology and vaccine research and development. *NPJ Vaccines*, 2018, Vol. 3, 11. doi: 10.1038/s41541-018-0049-5.
17. Jahrling P.B., Frame J.D., Rhoderick J.B., Monson M.H. Endemic Lassa fever in Liberia. IV. Selection of optimally effective plasma for treatment by passive immunization. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 1985, Vol. 79, no. 3, pp. 380-384.
18. Kanegae Y., Makimura M., Saito I. A simple and efficient method for purification of infectious recombinant adenovirus. *Jpn. J Med. Sci. Biol.*, 1994, Vol. 47, no. 3, pp. 157-166.
19. Klitting R., Mehta S.B., Oguzie J.U., Oluniyi P.E., Pauthner M.G., Siddle K.J., Andersen K.G., Happi C.T., Sabeti P.C. Lassa Fever: epidemiology, immunology, diagnostics, and therapeutics. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 2023, Vol. 440, pp. 23-65.
20. Logunov D.Y., Dolzhikova I.V., Shcheblyakov D.V., Tukhvatulin A.I., Zubkova O.V., Dzharullaeva A.S., Kovyrshina A.V., Lubenets N.L., Grousova D.M., Erokhova A.S., Botikov A.G., Izhaeva F.M., Popova O., Ozharovskaya T.A., Esmagambetov I.B., Favorskaya I.A., Zrelkin D.I., Voronina D.V., Shcherbinin D.N., Semikhin A.S., Simakova Y.V., Tokarskaya E.A., Egorova D.A., Shmarov M.M., Nikitenko N.A., Gushchin V.A., Smolyarchuk E.A., Zyryanov S.K., Borisevich S.V., Naroditsky B.S., Gintsburg A.L. Safety and efficacy of an rAd26 and rAd5 vector-based heterologous prime-boost COVID-19 vaccine: an interim analysis of a randomised controlled phase 3 trial in Russia. *Lancet*, 2021, Vol. 397, no. 10275, pp. 671-681.
21. 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.
22. Maruyama J., Mateer E.J., Manning J.T., Sattler R., Seregin A.V., Bukreyeva N., Jones F.R., Balint J.P., Gabitzsch E.S., Huang C., Paessler S. Adenoviral vector-based vaccine is fully protective against lethal Lassa fever challenge in Hartley guinea pigs. *Vaccine*, 2019, Vol. 37, no. 45, pp. 6824-6831.
23. Mehand M.S., Al-Shorbaji F., Millett P., Murgue B. The WHO R&D Blueprint: 2018 review of emerging infectious diseases requiring urgent research and development efforts. *Antivir. Res.*, 2018, Vol. 159, pp. 63-67.
24. Mire C.E., Cross R.W., Geisbert J.B., Borisevich V., Agans K.N., Deer D.J., Heinrich M.L., Rowland M.M., Goba A., Momoh M., Boisen M.L., Grant D.S., Fullah M., Khan S.H., Fenton K.A., Robinson J.E., Branco L.M., Garry R.F., Geisbert T.W. Human-monoclonal-antibody therapy protects nonhuman primates against advanced Lassa fever. *Nat. Med.*, 2017, Vol. 23, no. 10, pp. 1146-1149.

25. Safety, Tolerability and Immunogenicity of INO-4500 in Healthy Volunteers. ClinicalTrials.gov. Available at: <https://www.clinicaltrials.gov/study/NCT03805984>.
26. Tschismarov R., Van Damme P., Germain C., de Coster I., Mateo M., Reynard S., Journeaux A., Tomberger Y., Withanage K., Haslwanter D., Terler K., Schrauf S., Müllner M., Tauber E., Ramsauer K., Baize S. Immunogenicity, safety, and tolerability of a recombinant measles-vectored Lassa fever vaccine: a randomised, placebo-controlled, first-in-human trial. *Lancet*, 2023, Vol. 401, no. 10384, pp. 1267-1276.
27. Whitt M.A. Generation of VSV pseudotypes using recombinant ΔG-VSV for studies on virus entry, identification of entry inhibitors, and immune responses to vaccines. *J. Virol. Met.*, 2010, Vol. 169, no. 2, pp. 365-374.
28. WHO Target Product Profile for Lassa virus Vaccine. World Health Organization. Available at: <https://www.who.int/publications/m/item/who-target-product-profile-for-lassa-virus-vaccine>.

Авторы:

Попова О. — младший научный сотрудник лаборатории иммунобиотехнологии ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения РФ, Россия

Зубкова О.В. — к.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории иммунобиотехнологии ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения РФ, Россия

Ожаровская Т.А. — к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории иммунобиотехнологии ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения РФ, Россия

Зрелкин Д.И. — младший научный сотрудник лаборатории иммунобиотехнологии ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения РФ, Россия

Воронина Д.В. — младший научный сотрудник лаборатории иммунобиотехнологии ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения РФ, Россия

Голдовская П.П. — лаборант-исследователь лаборатории иммунобиотехнологии ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения РФ, Россия

Кан В.Ю. — лаборант-исследователь лаборатории иммунобиотехнологии ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения РФ, Россия

Должилова И.В. — к.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории Государственной коллекции вирусов ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения РФ, Россия

Authors:

Popova O., Junior Research Associate, Laboratory of Immunobiotechnology, N. Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation

Zubkova O.V., PhD, Leading Research Associate, Laboratory of Immunobiotechnology, N. Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation

Ozharovskaya O.V., PhD (Biology), Senior Research Associate, Laboratory of Immunobiotechnology, N. Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation

Zrelkin D.I., Junior Research Associate, N. Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation

Voronina D.V., Junior Research Associate, Laboratory of Immunobiotechnology, N. Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation

Goldovskaya P.P., Laboratory Researcher, Laboratory of Immunobiotechnology, N. Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation

Kan V.Yu., Laboratory Researcher, Laboratory of Immunobiotechnology, N. Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation

Dolzhikova I.V., PhD (Biology), Leading Research Associate, Laboratory of the State Virus Collection, N. Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation

Гроусова Д.М. — научный сотрудник лаборатории Государственной коллекции вирусов ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения РФ, Россия

Ковыршина А.В. — научный сотрудник лаборатории клеточной микробиологии ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения РФ, Россия

Ермолова И.А. — лаборант-исследователь лаборатории Государственной коллекции вирусов ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения РФ, Россия

Щебляков Д.В. — к.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории иммунобиотехнологии ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения РФ, Россия

Логунов Д.Ю. — д.б.н., академик РАН, заместитель директора по научной работе ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения РФ, Россия

Гинцбург А.Л. — д.б.н., профессор, академик РАН, директор ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения РФ, Россия

Grousova D.M., Research Associate, Laboratory of the State Virus Collection, N. Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation

Kovyrshina A.V., Research Associate, Laboratory of Cellular Microbiology, N. Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation

Ermolova I.A., Laboratory Researcher, Laboratory of the State Virus Collection, N. Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation

Shcheblyakov D.V., PhD (Biology), Leading Research Associate, Laboratory of Immunobiotechnology, N. Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation

Logunov D. Yu., PhD, MD (Biology), Full Member, Russian Academy of Sciences, Deputy Director for Research, N. Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation

Gintsburg A.L., PhD, MD (Biology), Professor, Full Member, Russian Academy of Sciences, Director, N. Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation

Поступила 09.04.2024
Отправлена на доработку 23.05.2024
Принята к печати 14.09.2024

Received 09.04.2024
Revision received 23.05.2024
Accepted 14.09.2024

ВАКЦИНА ПРОТИВ ГРИППА СПОСОБНА ИНДУЦИРОВАТЬ ПОСТИНФЕКЦИОННЫЕ АНТИТЕЛА К SARS-CoV-2 У МЕДИЦИНСКОГО ПЕРСОНАЛА

Костинов М.П.^{1,2}, Настаева Н.Ю.³, Никитюк Н.Ф.^{1,2}, Ахматова Н.К.¹, Альбаханса М.И.², Юшкова С.В.², Андреева Н.П.^{4,5}, Костинова А.М.², Линок А.В.^{1,2}, Локтионова М.Н.², Храпунова И.А.²

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 ФГБУЗ «Новороссийский клинический центр Федерального медико-биологического агентства», г. Новороссийск, Россия

⁴ ФГБОУ ВО «Чувацкий государственный университет имени И.Н. Ульянова», г. Чебоксары, Чувашская Республика, Россия

⁵ БУ «Городская детская клиническая больница» Министерства здравоохранения Чувашской Республики, г. Чебоксары, Чувашская Республика, Россия

Резюме. Вакцинация против гриппа способствует благоприятному течению и исходу COVID-19. Цель исследования — изучить влияние вакцин против гриппа и пневмококка на уровень IgG антител (АТ) к SARS-CoV-2 среди медицинского персонала в начале пандемии COVID-19.

Представлена оценка иммунного ответа к вирусу гриппа и SARS-CoV-2 у 266 медицинских работников через 6 мес. после иммунизации против гриппа и/или против пневмококковой инфекции (без прививок против COVID-19) в сезоне 2020-2021 гг. со сравнительной характеристикой у 281 сотрудников не имеющих в анамнезе вакцинаций.

Установлено, что доля медицинских работников с защитным ($\geq 1:40$) уровнем к вирусу гриппа через 6 месяцев после вакцинации по группам участников достигает протективного ($\geq 70\%$) значения только у лиц, получавших моновакцину против пневмококковой инфекции (78,6%), в сравнении с лицами, которые были привитыми моновакциной против гриппа (61,7%) ($p < 0,001$), а также с группой работников иммунизированных против гриппа в сочетании с вакциной против *S. pneumoniae* (68,9%) ($p < 0,01$). Т. е. вакцина против пневмококка способна индуцировать синтез IgG-АТ к вирусу гриппа, достигающих протективных значений.

Адрес для переписки:

Линок Андрей Викторович
ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова»
105064, Россия, Москва, Малый Казенный пер., 5а.
Тел.: 8 (926) 157-97-07.
E-mail: linok_a_v@staff.sechenov.ru

Address for correspondence:

Andrey V. Linok
I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera
5a Malyy Kazenny Lane
Moscow
105064 Russian Federation
Phone: +7 (926) 157-97-07.
E-mail: linok_a_v@staff.sechenov.ru

Образец цитирования:

М.П. Костинов, Н.Ю. Настаева, Н.Ф. Никитюк, Н.К. Ахматова, М.И. Альбаханса, С.В. Юшкова, Н.П. Андреева, А.М. Костинова, А.В. Линок, М.Н. Локтионова, И.А. Храпунова «Вакцина против гриппа способна индуцировать постинфекционные антитела к SARS-CoV-2 у медицинского персонала» // Медицинская иммунология, 2025. Т. 27, № 1. С. 169-178. doi: 10.15789/1563-0625-IVI-2982

© Костинов М.П. и соавт., 2025

Эта статья распространяется по лицензии Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

M.P. Kostinov, N.Yu. Nastaeva, N.F. Nikityuk, N.K. Akhmatova, M.I. Albahansa, S.V. Yushkova, N.P. Andreeva, A.M. Kostinova, A.V. Linok, M.N. Loktionova, I.A. Khrapunova "Influenza vaccine is able to induce post-infection antibodies to SARS-CoV-2 in medical staff", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2025, Vol. 27, no. 1, pp. 169-178. doi: 10.15789/1563-0625-IVI-2982

© Kostinov M.P. et al., 2025

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

DOI: 10.15789/1563-0625-IVI-2982

Анализ результатов серопозитивных ($\geq 1:10$) IgG-АТ к штаммам вируса гриппа и их сопоставимости с серопревалентными к COVID-19 лиц показал, что среди медицинского персонала, вакцинированного против сезонного гриппа через 6 месяцев, доля серопозитивных лиц (свидетельствующая о вероятной перенесенной бессимптомной формы COVID-19) выше и составляет от 65,4% ($p = 0,026$) в группе привитых моногриппом до 64,5% ($p = 0,04$) в группе привитых сочетано гриппом и пневмококком в сравнении с неиммунизированными работниками — 48,8%.

Результаты показывают, что вакцинация против гриппа выступает в роли индуктора гуморального иммунитета не только к вирусу гриппа, но и к недавно перенесенной инфекции SARS-CoV-2.

Ключевые слова: иммунитет к гриппу, антитела SARS-CoV-2, вакцинация, гетерологичная защита, адаптивный иммунитет, пандемия

INFLUENZA VACCINE IS ABLE TO INDUCE POST-INFECTION ANTIBODIES TO SARS-CoV-2 IN MEDICAL STAFF

Kostinov M.P.^{a, b}, Nastaeva N.Yu.^c, Nikityuk N.F.^{a, b}, Akhmatova N.K.^a, Albahansa M.I.^b, Yushkova S.V.^b, Andreeva N.P.^{d, e}, Kostinova A.M.^b, Linok A.V.^{a, b}, Loktionova M.N.^b, Khrapunova I.A.^b

^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 Novorossiysk Clinical Center, Federal Medical and Biological Agency, Novorossiysk, Russian Federation

^d I. Ulyanov Chuvash State University, Cheboksary, Chuvash Republic, Russian Federation

^e City Children's Clinical Hospital of Cheboksary, Cheboksary, Chuvash Republic, Russian Federation

Abstract. Influenza vaccination contributes to the favorable course and outcome of COVID-19. The aim of our study was to study the effect of influenza and pneumococcal vaccines on the level of IgG antibodies (AT) to SARS-CoV-2 among medical personnel at the beginning of the COVID-19 pandemic. We present the data on assessment of specific immune response to the influenza virus and SARS-CoV-2 in 266 medical workers 6 months after immunization against influenza and/or pneumococcal infection (without vaccinations against COVID-19) over the 2020–2021, by comparing the results with respective characteristic in 281 employees with no history of vaccinations is presented.

We have found that the proportion of medical workers with a protective ($\geq 1:40$) antibody levels to influenza virus 6 months after vaccination in groups of participants reaches a protective ($\geq 70\%$) value only in persons who received a monovaccine against pneumococcal infection (78.6%) as compared with persons vaccinated with a monovaccine against influenza (61.7%) ($p < 0.001$), as well as with a group of workers immunized against influenza in combination with the *S. pneumoniae* vaccine (68.9%) ($p < 0.01$). Hence, the pneumococcal vaccine is able to induce the synthesis of IgG-AT to influenza virus reaching protective values.

An analysis of the group with seropositivity to influenza virus (IgG-AT $\geq 1:10$) and their comparisons with persons seroprevalent to COVID-19 showed that the proportion of seropositive individuals among medical staff vaccinated against seasonal influenza after 6 months (indicating a probable asymptomatic form of COVID-19) is increased. It comprised 65.4% ($p = 0.026$) in the group vaccinated with mono-flu, and 64.5% ($p = 0.04$) in the group vaccinated with combined influenza and pneumococcus, being higher than among the non-immunized workers (48.8%).

In summary, the results of our study show that influenza vaccination acts as an inducer of humoral immunity not only to the influenza virus, but also to the recently transmitted SARS-CoV-2 infection.

Keywords: influenza immunity, SARS-CoV-2 antibodies, vaccination, heterologous protection, adaptive immunity, pandemic

Введение

В настоящее время нет сомнений в опосредованном профилактическом эффекте против COVID-19 при вакцинации против других инфекций в рамках национальных календарей профи-

лактических прививок. Приоритетная роль принадлежит вакцине против туберкулеза, которая проводится детям в первую неделю жизни, при этом ее эффект неспецифической защиты против множества патогенов, в том числе и SARS-CoV-2, может сохраняться десятилетия [5, 11, 13,

14]. Что касается вакцин против пневмококковой инфекции и особенно против сезонного гриппа, которые проводятся как у детей, так и у взрослых, о их взаимосвязи с благоприятным прогнозом в специфической профилактике конкретных заболеваний, а также исходом COVID-19, отражено в многочисленных работах [7, 8, 21, 24, 26].

Однако исследования по изучению роли адаптивного иммунитета после вакцинации против гриппа и/или пневмококка в формировании или активации постинфекционных антител к SARS-CoV-2 находятся в процессе изучения. Имеются единичные исследования, где указывается, что предшествующие вакцины против гриппа и пневмококковой инфекции оказывают влияние на гуморальный и клеточный ответ при вакцинации против SARS-CoV-2 с использованием РНК BNT162b2 вакцин [12, 22]. Также отмечено, что у невакцинированных, но переболевших легкой формой COVID-19, через месяц после выздоровления выявлены более высокие частота и уровни IgG антител против Spike-белков N и RBD к SARS-CoV-2 среди лиц, получивших вакцину против гриппа в эпидемическом сезоне 2019/2020 [20]. Не исключено, что у таких пациентов риск повторного заражения SARS-CoV-2 с течением времени может быть ниже, чем в когорте с не выявленными позитивными антителами [16].

Цель исследования — изучить влияние вакцин против гриппа и пневмококка на уровень IgG антител к SARS-CoV-2 среди медицинского персонала в начале пандемии COVID-19.

Материалы и методы

Дизайн исследования

В исследовании участвовали 547 медицинских работников старше 18 лет. Участники были распределены на 4 группы: I группа — не имеющие в анамнезе вакцинаций против гриппа в сезоне 2020-2021 гг. и против пневмококковой инфекции ($n = 281$), II группа — вакцинированы против гриппа ($n = 98$), III группа — вакцинированы против пневмококковой инфекции ($n = 60$), IV группа — получили сочетанную вакцинацию против гриппа и пневмококка ($n = 108$).

При отборе участников ориентировались на требования к проведению клинических исследований, с учетом критериев включения и критериев исключения.

Этапы исследования

— первый этап исследования (с августа 2020 г. по январь 2021 г.) включал вакцинацию медицинских работников против гриппа и пневмококка;

— второй этап исследования (с февраля по март 2021 г.) — через 6 месяцев после вакцинации от гриппа и пневмококковой инфекции. Проводилось исследование напряженности иммуни-

тета к гриппу среди участников исследования, определение уровня АТ к гриппу по группам вакцинации, ПЦР-тестирование на SARS-CoV-2, расчет серопревалентных к COVID-19 среди серопозитивных ($\geq 1:10$) к гриппу, проведение эпидемиологического и статистического анализа.

Сбор проспективных данных выполнен по статистическим отчетным формам: № 060у «Карта профилактических прививок»; № 058у «Экстренное извещение об инфекционном заболевании, пищевом, остром профессиональном отравлении, необычной реакции на прививку»; № 060у «Журнал учета инфекционных заболеваний».

Для проведения исследования получено одобрение локального этического комитета ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова» № 3 от 14.02.2022 г. и оформлено письменное информированное согласие от респондентов (медицинских работников организации).

Критерии соответствия

Исследование было проведено с соблюдением этических норм в соответствии с Хельсинкской декларацией ВОЗ «Этические принципы проведения научных медицинских исследований с участием человека» и «Правилами клинической практики в Российской Федерации», утвержденными Приказом Минздрава РФ от 19.06.2003 г. № 266

Условия проведения

Исследование проводилось на базах ФГБУЗ «Новороссийский клинический центр Федерального медико-биологического агентства», ФГАОУ ВО «Первый МГМУ им. И.М. Сеченова» (Сеченовский университет) Министерства здравоохранения РФ и ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова» в соответствии с протоколом исследования от 12.02.2022 г., утвержденной на ученом совете ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова» темой НИР.

Вакцинные препараты, применяемые в исследовании, и правила их введения:

— Совигрипп, вакцина гриппозная инактивированная субъединичная (АО «Национальная иммунобиологическая компания», Россия). Вакцина с консервантом для вакцинации лиц от 18 до 60 лет. Включает штаммы, соответствующие рекомендациям ВОЗ для сезона гриппа в северном полушарии 2020-2021 годов для трехвалентных вакцин: А/Н1N1/pdm09 Гуандонг-Маонань/SWL1536/19-подобный штамм; А/Н3N2/Гонконг/2671/19-подобный штамм; В/Вашингтон/02/19-подобный штамм, выделенные из вирусосодержащей аллантоисной жидкости куриных эмбрионов, связанные с иммуноадьювантом — сополимер N-винилпирролидона и 2-метил-5-винилпиридина (Совидон).

— Превенар 13 (ПКВ13), вакцина пневмококковая конъюгированная адсорбированная, тринадцативалентная (Pfizer Inc., США, первичная упаковка — ООО «НПО Петровакс Фарм» Россия) представляет собой капсулярные полисахариды 13 серотипов пневмококка: 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F и 23F, индивидуально конъюгированные с дифтерийным белком CRM₁₉₇ и адсорбированные на алюминия фосфате. Введение вакцины ПКВ13 вызывает выработку антител к капсулярным полисахаридам *Streptococcus pneumoniae*, обеспечивая тем самым специфическую защиту от инфекций, вызываемых включенными в вакцину 13 серотипами пневмококка.

Вакцинацию против гриппа и пневмококковой инфекции проводили после осмотра терапевта в кабинете иммунопрофилактики. Одна доза вакцины составляет 0,5 мл. Вакцина вводилась в/м (против гриппа и пневмококковой инфекции — однократно).

Определение уровня АТ

Определение IgG антител к вирусу гриппа

Уровень антител к штаммам вируса гриппа А (А/Н1N1, А/Н3N2) и В определяли в реакции торможения гемагглютинации с использованием 0,75%-ной взвеси эритроцитов петуха с предварительным нагреванием исследуемых сывороток до 56 °С в течение 1 ч. В качестве антигенов использовали:

- А/Н1N1/pdm09 Гуандонг-Маонань/SWL1536/19-подобный штамм;
- А/Н3N2/Гонконг/2671/19-подобный штамм;
- В/Вашингтон/02/19-подобный штамм.

В качестве эталона оценки иммуногенности вакцины ориентировались на критерии эффективности вакцин, разработанные для стандартного взрослого человека, установленные Комитетом по патентам медицинских продуктов (Committee for Proprietary Medicinal Products (CPMP)) — протокол CPMP/ BWP/214/96: уровень серопротекции — процент привитых, у которых титр гемагглютинин-ингибирующих антител составляет более 1:40 к 21-му дню после проведения вакцинации (должен быть более 70%); уровень сероконверсии или иммунологическая активность вакцины — относительное число привитых, у которых титр гемагглютинин-ингибирующих антител повысился более чем в 4 раза по сравнению с исходным уровнем среди всех иммунопротективных людей (должен быть более 40%); фактор сероконверсии или средний геометрический прирост — повышение средних геометрических титров гемагглютинин-ингибирующих антител на 21-й день по сравнению с исходным уровнем, выражающийся в кратности увеличения (должен быть более 2,5). Вакцина признается достаточно иммуногенной и эффективной, если

она удовлетворяет по крайней мере одному из трех критериев [1].

Определение IgG антител к SARS-CoV-2

Для выявления IgG к SARS-CoV-2 использовали двухстадийный непрямой вариант твердофазного ИФА тест-системы «SARS-CoV-2-IgG-ИФА-БЕСТ» АО «Вектор-Бест», Россия. Рассчитывали коэффициент позитивности (КП) — соотношение значения оптической плотности опытного образца (ОП обр.) к значению оптической плотности отрицательного контрольного образца (ОП К) + 0,2. Результат считался отрицательным при КП < 0,9, положительным — при КП ≥ 1,1 и пограничным — при 0,9 < КП < 1,1.

Статистические методы

Статистический анализ представлен расчетом частот и долей для категориальных переменных, проверки на нормальность количественных переменных с помощью критериев Колмогорова—Смирнова (с коррекцией значимости Лиллиефорса) и Шапиро—Уилка. Для сравнения долей использован критерий хи-квадрат, для сравнения количественных показателей — непараметрический критерий Манна—Уитни. При проверке гипотез использованы уровни значимости 0,01 (1%) и 0,05 (5%). Визуализация результатов выполнена в табличной и графической форме. Для расчетов использованы электронные таблицы Excel 2010 и статистический пакет SPSS v. 26.

Для выявления IgG к SARS-CoV-2 использовали двухстадийный непрямой вариант твердофазного ИФА тест-системы «SARS-CoV-2-IgG-ИФА-БЕСТ» АО «Вектор-Бест», Россия. Рассчитывали коэффициент позитивности (КП) — соотношение значения оптической плотности опытного образца (ОП обр.) к значению оптической плотности отрицательного контрольного образца (ОП К) + 0,2. Результат считался отрицательным при КП < 0,8, положительным — при КП ≥ 1,1 и пограничным — при 0,8 < КП < 1,1.

Результаты

Исследования уровня поствакцинальных IgG-АТ к штаммам вируса гриппа показали, что доля медицинских работников с защитным (≥ 1:40) уровнем к вирусу гриппа через 6 месяцев после вакцинации по группам участников достигает протективного (≥ 70%) значения только у лиц, получавших моновакцину против пневмококковой инфекции (табл. 1) в сравнении с лицами, которые были привитыми моновакциной против гриппа (61,7%) ($p < 0,001$), а также с группой работников иммунизированных против гриппа в сочетании с вакциной против *S. pneumoniae* (68,9%) ($p < 0,01$). Т. е. вакцина против пневмококка способно индуцировать синтез IgG-АТ к вирусу гриппа достигающих протективных значений.

Иная картина раскрывается по распределению лиц с высокими ($\geq 1:160$) поствакцинальными IgG-АТ к вирусу гриппа через 6 месяцев среди привитых и неиммунизированных медицинских работников, где заметно, что в группах, имеющих сезонную вакцинацию против гриппа, их доля выше и регистрируется в пределах от 31,7% до 33,8% соответственно в группе II ($p = 0,043$) и группе IV ($p = 0,04$), чем в группе без специфической профилактики респираторных инфекций (группа I).

Одной из важных задач проведенного исследования являлось выявление взаимосвязи между гуморальным специфическим иммунитетом после вакцинации против гриппа и наличием постинфекционных IgG-АТ к SARS-CoV-2 среди медицинского персонала, ранее не получавших вакцину против COVID-19. В начале пандемии изучение популяционного иммунитета к коронавирусной инфекции в Российской Федерации (РФ), инициированного Роспотребнадзором,

было важным этапом для усовершенствования комплекса противоэпидемических мероприятий, которое проводилось на всей территории РФ [2]. Анализ результатов серопозитивных ($\geq 1:10$) IgG-АТ к штаммам вируса гриппа и их сопоставимости с серопревалентными к COVID-19 лиц показал, что среди медицинского персонала, вакцинированного против сезонного гриппа через 6 месяцев, доля серопозитивных лиц (свидетельствующая о вероятной перенесенной бессимптомной формы COVID-19) выше и составляет от 65,4% ($p = 0,026$) до 64,5% ($p = 0,04$) в сравнении с непривитыми работниками – 48,8% (табл. 2).

Поиск взаимосвязи между долей лиц, имевших серопротективные ($\geq 1:40$) значения IgG-АТ к гриппу и одновременно имевших постинфекционные IgG-АТ к SARS-CoV-2 (серопревалентными к COVID-19) не выявил связи, хотя прослеживалась аналогичная тенденция, указанная выше (табл. 2).

ТАБЛИЦА 1. ДОЛЯ МЕДИЦИНСКОГО ПЕРСОНАЛА С ЗАЩИТНЫМ И ВЫСОКИМ УРОВНЕМ IgG-АТ К ВИРУСУ ГРИППА ЧЕРЕЗ 6 МЕСЯЦЕВ ПОСЛЕ ВАКЦИНАЦИИ ПО ГРУППАМ УЧАСТНИКОВ

TABLE 1. PROPORTION OF MEDICAL PERSONNEL WITH PROTECTIVE AND HIGH IgG-AT LEVELS TO THE INFLUENZA VIRUS 6 MONTHS AFTER VACCINATION BY PARTICIPANT GROUPS

Группы Groups	Всего чел. Total ppl.	Исследованы на наличие IgG-АТ к гриппу Investigated for the presence of IgG-AT for the flu	С защитным уровнем ($\geq 1:40$) With a protection level ($\geq 1:40$)		p	С высоким уровнем IgG-АТ ($\geq 1:160$) With high IgG-AT levels ($\geq 1:160$)		p
	Абс. Abs.		Абс. Abs.	%		Абс. Abs.	%	
Группа I (непривитые) Group I (unvaccinated)	281	141	85	60,3	(I, II) = 0,392 (I, III) = 0,120 (I, IV) = 0,226 (II, III) < 0,001 (II, IV) = 0,305 (III, IV) = 0,010	28	19,8	(I, II) = 0,043 (I, III) = 0,698 (I, IV) = 0,04 (II, III) = 0,123 (II, IV) = 0,164 (III, IV) = 0,113
Группа II (V грипп) Group II (V flu)	98	60	37	61,7		19	31,7	
Группа III (V пневмококк) Group III (V pneumococcus)	60	14	11	78,6		2	14,3	
Группа IV (V сочетанная) Group IV (V combined)	108	45	31	68,9		15	33,8	

Примечание. V – вакцинация; p – различия между показателями лиц, серопревалентных к COVID-19.

Note. V, vaccination; p, differences between indicators of seroprevalent individuals to COVID-19.

ТАБЛИЦА 2. ДОЛЯ МЕДИЦИНСКИХ СОТРУДНИКОВ, СЕРОПРЕВАЛЕНТНЫХ К COVID-19, СРЕДИ ЛИЦ, СЕРОПОЗИТИВНЫХ ($\geq 1:10$) К ГРИППУ, ЧЕРЕЗ 6 МЕСЯЦЕВ ПОСЛЕ ВАКЦИНАЦИИ ПО ГРУППАМ УЧАСТНИКОВ

TABLE 2. PROPORTION OF MEDICAL STAFF SEROPREVALENT TO COVID-19 AMONG PERSONS SEROPOSITIVE ($\geq 1:10$) TO INFLUENZA 6 MONTHS AFTER VACCINATION BY PARTICIPANT GROUPS

Группы Groups	Всего Total	Серопозитивные к гриппу ($\geq 1:10$) Seropositive to influenza ($\geq 1:10$)		Серопревалентные к COVID-19 из числа обследованных Seroprevalent to COVID-19 from among the examined		p
	Абс. Abs.	Абс. Abs.	%	Абс. Abs.	%	
Группа I (непривитые) Group I (unvaccinated)	141	131	92,9	64	48,8	(I, II) = 0,026 (I, III) = 0,313 (I, IV) = 0,040 (II, III) = 0,242 (II, IV) = 0,187 (III, IV) = 0,262
Группа II (V грипп) Group II (V flu)	60	52	86,7	34	65,4	
Группа III (V пневмококк) Group III (V pneumococcus)	14	13	92,8	8	61,5	
Группа IV (V сочетанная) Group IV (V combined)	45	31	68,9	20	64,5	

Примечание. V – вакцинация; p – различия между показателями лиц, серопревалентных к COVID-19.

Note. V, vaccination; p, differences between indicators of seroprevalent individuals to COVID-19.

Обсуждение

В настоящее время существуют много гипотез с возможными вариантами реагирования иммунной системы, объясняющих положительный клинический ответ применения сезонной вакцинации против гриппа в противодействии проникновению SARS-CoV-2 и благоприятному исходу инфекции. Одна из них – давно известная гипотеза «тренированного иммунитета» при применении вакцины БЦЖ, живой вакцины против полиомиелита, кори, которая свидетельствует, что клетки врожденного иммунитета могут быть активированы при встрече с экзогенными или эндогенными антигенами, вызывая долгосрочное метаболическое и эпигенетическое перепрограммирование этих клеток и приводя к усилению иммунного ответа при повторном инфицировании [6, 18, 23].

В последнее время привлекает особое внимание инактивированная вакцина против гриппа, которая кроме индукции гуморального иммунного ответа, активирует эффекторы клеточного иммунитета, с увеличением количества NK-клеток (CD16/56), NKT лимфоцитов (CD3/CD16/56), В-лимфоцитов (CD45/CD20),

активированных (CD3/HLA-DR) и цитотоксических (CD8/HLA-DR) Т лимфоцитов, а также клеток с маркером ранней активации (CD45/CD25) [3]. При этом, наибольшим потенциалом в индукции клеточного ответа с включением регуляторных механизмов, предупреждающих гиперактивацию, обладает иммуноадьювантная вакцина, стимулирующая нарастание численности NK (CD16/56), NKT-клеток (CD3/CD16/56), В-лимфоцитов (CD45/CD20), активированных (CD3/HLA-DR) и цитотоксических (CD8/HLA-DR) Т-лимфоцитов, Т-регуляторных клеток (Tregs, CD4/CD25/FoxP3). Следовательно, исследованная нами вакцина с иммуноадьювантом – сополимер N-винилпирролидона и 2-метил-5-винилпиридина может способствовать формированию не только специфических антител, но и оказывать транзитное, иммуномодулирующее влияние при встрече с иными возбудителями.

В период пандемии COVID-19 экспериментально было подтверждено индуцированное влияние инактивированной вакцины против гриппа в роли «тренированного иммунитета» против SARS-CoV-2 [9]. После демонстрации снижения

относительного риска заражения SARS-CoV-2 на 37–49% среди медицинских работников, привитых квадριвалентной инактивированной вакциной против гриппа (по сравнению с невакцинированными лицами), авторы при использовании *in vitro* модели показали, что после стимуляции мононуклеарных клеток периферической крови тем же препаратом и вакциной против туберкулеза (БЦЖ) наблюдалось увеличение продукции цитокинов. Повторная стимуляция этих клеток инактивированным путем нагревания штаммом SARS-CoV-2 вызывала более высокую выработку антагониста рецептора IL-1, IL-1ra, в то время как продукция провоспалительных IL-1 β и IL-16 снижалась [9].

Были предложены другие иммунологические механизмы влияния инактивированной вакцины против гриппа на механизмы адаптивного иммунитета (активация клеток и перекрестная реактивность) [10, 15]. Активация клеточных эффекторов происходила по типу гетерологичной реакции, которая распространялась на Т-клетки с различной специфичностью. Возможно, эти гетерологичные Т-клетки, активируются под воздействием цитокинов во время формирования классического иммунного ответа под влиянием вакцины [25]. Теория перекрестной реактивности утверждает, что Т-клетки, участвующие в адаптивном иммунном ответе, могут перекрестно реагировать с антигеном, имеющим некоторую степень сходства аминокислот [15]. Так, при исследовании поликлональных сывороток, полученных от SARS-CoV-2-положительных пациентов с высокими титрами нейтрализующих антител против различных Spike-белков вируса, обнаружена некоторая степень перекрестной реактивности с гемагглютинином вируса гриппа как при использовании иммуноферментного анализа (ELISA), так и в вестерн-блоттинга [17]. Однако последующий анализ показал, что эти перекрестно-реактивные связывающие гемагглютинин антитела не нейтрализуют. В другой работе авторы исследовали роль небольшого пептида NGVEGF, который идентичен или очень похож на пептид, обнаруженный в большинстве современных штаммов A(H1N1)pdm09, в индукции перекрестно-реактивных антител [4]. Этот пептид присутствует в наиболее критической части (N481-F486) рецептор-связывающего домена (RBD) белка-шипа SARS-CoV-2, который взаимодействует с рецептором ACE2, тогда как у штаммов гриппа A(H1N1)pdm09. Пептид NGVEGF/NGVKGf расположен в иммунодоминантной области нейраминидазы. Примерно две трети обследованных доноров имели обнаруживаемые уровни антител к этому пептиду. Им-

мунизация инактивированной вакциной против гриппа усиливала иммунный ответ против SARS-CoV-2: пациенты, не зараженные гриппом, имели низкую активность связывания (в среднем 32,7%), которая повышалась при введении данной вакцины (в среднем 55%) и дополнительно возрастала под влиянием вакцины BNT162b2 (в среднем 94%). Пептиды NGVEGF также активировали клетки CD8⁺ у 20% доноров. Всего авторы идентифицировали 11 дополнительных пептидов клеток CD8⁺, которые потенциально вступали в перекрестную реакцию как с SARS-CoV-2, так и с вирусами гриппа; в зависимости от типа человеческого лейкоцитарного антигена (HLA) эти пептиды могут защищать от SARS-CoV-2 примерно у 40–71% людей [4].

Механизм активации клеток был частично доказан и другими авторами, в частности, в когорте медицинских работников антиген-специфичные CD4⁺ клетки A(H1N1) присутствовали у 92% и 76% SARS-CoV-2-положительных и SARS-CoV-2-отрицательных лиц соответственно [19]. Ответ CD4⁺ A(H1N1) клеток также показал сильную положительную корреляцию со специфичными для SARS-CoV-2 CD4⁺ клетками [19].

Возникают и другие вопросы по полученным нами результатам исследования относительно выявленной высокой доли серопозитивных к гриппу ($\geq 1:10$) лиц среди непривитых против сезонного гриппа (92,9%) и привитых только против пневмококка (92,8%), но при этом у обследованных не прослеживается значимой взаимосвязи серопозитивных к гриппу лиц (невакцинированных) с долей серопревалентных к COVID-19. Возможно, что только специфическая вакцинация против гриппа, в отличие от естественной бустеризации циркулирующими сезонными разновидностями вирусов гриппа, способна к стимуляции постинфекционных антител SARS-CoV-2. Т. е. можно предположить, что вакцинация против гриппа выступает в роли индуктора гуморального иммунитета не только к вирусу гриппа, но и к недавно перенесенным вирусным инфекциям.

Заключение

Таким образом, полученные нами результаты, выявили наличие большой доли серопозитивных лиц к SARS-CoV-2 среди медперсонала, вакцинированного против сезонного гриппа. Эти данные согласуются многочисленными публикациями других авторов о возможности неспецифической стимуляции различных механизмов иммунного ответа при введении вакцины против гриппа, сопровождающейся клиническим эффектом по отношению к течению и исходу COVID-19.

Список литературы / References

1. Методические указания МУ 3.3.2.1758-03. 3.3.2. Медицинские иммунобиологические препараты. Методы определения показателей качества иммунобиологических препаратов для профилактики и диагностики гриппа. М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2009. 14 с. [Электронный ресурс]. Режим доступа: https://www.rospotrebnadzor.ru/upload/iblock/951/mu-3.3.2.2437_09.pdf. [Methodological guidelines MU 3.3.2.1758-03. 3.3.2. Medical immunobiological preparations. Methods for determining the quality indicators of immunobiological preparations for the prevention and diagnosis of influenza]. Moscow: Federal Center for Hygiene and Epidemiology of Rospotrebnadzor, 2009. 14 p. [Electronic resource]. Available at: https://www.rospotrebnadzor.ru/upload/iblock/951/mu-3.3.2.2437_09.pdf.
2. Попова А.Ю., Ежлова Е.Б., Мельникова А.А., Башкетова Н.С., Фридман Р.К., Лялина Л.В., Смирнов В.С., Чхинджерия И.Г., Гречанинова Т.А., Агапов К.А., Арсентьева Н.А., Баженова Н.А., Бацунов О.К., Данилова Е.М., Зуева Е.В., Комкова Д.В., Кузнецова Р.Н., Любимова Н.Е., Маркова А.Н., Хамитова И.В., Ветров В.В., Миличкина А.М., Дедков В.Г., Тотолян А.А. Популяционный иммунитет к вирусу SARS-CoV-2 среди населения Санкт-Петербурга в активную фазу эпидемии COVID-19. COVID19-PREPRINTS.MICROBE.RU. [Popova A.Yu., Ezhlova E.B., Melnikova A.A., Bashketova N.S., Fridman R.K., Lyalina L.V., Smirnov V.S., Chkhindzherya I.G., Grechaninova T.A., Agapov K.A., Arsentieva N.A., Bazhenova N.A., Batsunov O.K., Danilova E.M., Zueva E.V., Komkova D.V., Kuznetsova R.N., Lyubimova N.E., Markova A.N., Khamitova I.V., Vetrov V.V., Milichkina A.M., Dedkov V.G., Totolian A.A. Seroprevalence to SARS-CoV-2 virus among population in Saint-Petersburg in the active phase of the epidemic COVID-19. COVID19PREPRINTS.MICROBE.RU. 2020. (In Russ.)] doi: 10.21055/preprints-3111752.10.
3. Хромова Е.А., Ахматова Н.К., Костинов М.П., Сходова С.А., Столпникова В.Н., Власенко А.Е., Полищук В.Б., Шмитко А.Д. Влияние иммуноадьювантной и безадьювантных вакцин против гриппа на иммунофенотип лимфоцитов *in vitro* // Инфекция и иммунитет, 2023. Т. 13, № 3. С. 430-438. [Khromova E.A., Akhmatova N.K., Kostinov M.P., Skhodova S.A., Stolpnikova V.N., Vlasenko A.E., Polishchuk V.B., Shmitko A.D. The impact of adjuvanted and non-adjuvanted influenza vaccines on *in vitro* lymphocyte immunophenotype. *Inktsiya i immunitet* = Russian Journal of Infection and Immunity, 2023, Vol. 13, no. 3, pp. 430-438. doi: 10.15789/2220-7619-TIO-1250.
4. Almazán N.M., Rahbar A., Carlsson M., Hoffman T., Kolstad L., Rönnerberg B., Pantalone M.R., Fuchs I.L., Naclér A., Ohlin M., Sacharczuk M., Religa P., Amér S., Molnár C., Lundkvist A., Susrud A., Sörensen B., Söderberg-Nauclér C. Influenza A H1N1-mediated pre-existing immunity to SARS-CoV-2 predicts COVID-19 outbreak dynamics. *medRxiv*, 2022. doi: 10.1101/2021.12.23.21268321.
5. Arts R.J.W., Moorlag S.J.C.F.M., Novakovic B., Li Y., Wang S.-Y., Oosting M., Kumar V., Xavier R.J., Wijmenga C., Joosten L.A.B., Reusken C.B.E.M., Benn C.S., Aaby P., Koopmans M.P., Stunnenberg H.G., van Crevel R., Netea M.G. BCG Vaccination Protects against Experimental Viral Infection in Humans through the Induction of Cytokines Associated with Trained Immunity. *Cell Host Microbe*, 2018, Vol. 23, no. 1, pp. 89-100e5.
6. Bekkering S., Domínguez-Andrés J., Joosten L.A.B., Riksen N.P., Netea M.G. Trained immunity: Reprogramming innate immunity in health and disease. *Annu. Rev. Immunol.*, 2021, Vol. 39, pp. 667-693.
7. Candelli M., Pignataro G., Torelli E., Gulli A., Nista E.C., Petrucci M., Saviano A., Marchesini D., Covino M., Ojetti V., Antonelli M., Gasbarrini A., Franceschi F. Effect of influenza vaccine on COVID-19 mortality: a retrospective study. *Intern. Emerg. Med.*, 2021, Vol. 16, no. 7, pp. 1849-1855.
8. Conlon A., Ashur C., Washer L., Eagle K.A., Hofmann Bowman M.A. Impact of the influenza vaccine on COVID-19 infection rates and severity. *Am. J. Infect. Control*, 2021, Vol. 49, no. 6, pp. 694-700.
9. Debisarun P.A., Gössling K.L., Bulut O., Kilic G., Zoodsma M., Liu Z., Oldenburg M., Rüchel N., Zhang B., Xu C.J., Struycken P., Koeken V.A.C.M., Domínguez-Andrés J., Moorlag S.J.C.F.M., Taks E., Ostermann P.N., Müller L., Schaal H., Adams O., Borkhardt A., Oever J.T., Crevel R.V., Li Y., Netea M.G. Induction of trained immunity by influenza vaccination – impact on COVID-19. *PLoS Pathog.*, 2021, Vol. 17, e1009928. doi: 10.1371/journal.ppat.1009928.
10. Domnich A., Orsi A., Trombetta C.S., Guarona G., Panatto D., Icardi G. COVID-19 and seasonal influenza vaccination: cross-protection, co-administration, combination vaccines, and hesitancy. *Pharmaceuticals*, 2022, Vol. 15, no. 3, 322. doi: 10.3390/ph15030322.
11. Escobar L.E., Molina-Cruz A., Barillas-Mury C. BCG vaccine protection from severe coronavirus disease 2019 (COVID-19). *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 2020, Vol. 117, no. 30, pp. 17720-17726.
12. Greco M., Cucci F., Portulano P., Lazzari R.A., Caldararo C., Sicuro F., Catanese C., Lobreglio G. Effects of Influenza Vaccination on the Response to BNT162b2 Messenger RNA COVID-19 Vaccine in Healthcare Workers. *J. Clin. Med. Res.*, 2021, Vol. 13, pp. 549-555.
13. Kleinnijenhuis J., Quintin J., Preijers F., Joosten L.A.B., Iffrim D.C., Saeed S., Jacobs C., van Loenhout J., de Jong D., Stunnenberg H.G., Xavier R.J., van der Meera J.W.M., van Crevela R., Netea M.G. Bacille Calmette-Guérin Induces NOD2-dependent nonspecific protection from reinfection via epigenetic reprogramming of monocytes. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 2012, Vol. 109, pp. 17537-17542.
14. Kovačić D., Gajić A.A., Latinović D., Softić A. Hypothetical immunological and immunogenetic model of heterogenous effects of BCG Vaccination in SARS-CoV-2 infections: BCG-induced trained and heterologous immunity. *J. Med. Sci.*, 2021, Vol. 90, e551. doi: 10.20883/medical.e551.
15. Marín-Hernández D., Nixon D.F., Hupert N. Heterologous vaccine interventions: Boosting immunity against future pandemics. *Mol. Med.* 2021, Vol. 27, no. 1, 54. doi: 10.1186/s10020-021-00317-z.

16. Murchu E.O., Byrne P., Carty P.G., Gascun C.D., Keogan M., O'Neill M., Harrington P., Ryan M. Quantifying the Risk of SARS-CoV-2 Reinfection over Time. *Rev. Med. Virol.*, 2022, Vol. 32, e2260. doi: 10.1002/rmv.2260.
17. Murugavelu P., Reshma Perween R., Shrivastava T., Singh V., Parray H.A., Singh S., Chiranjivi A.K., Thiruvengadam R., Singh S., Yadav N., Jakhar K., Sonar S., Mani S., Bhattacharyya S., Sharma C., Vishwakarma P., Khatri R., Panchal A.K., Das S., Ahmed S., Samal S., Kshetrapal P., Bhatnagar S., Luthra K., Kumar R. Non-neutralizing SARS-CoV-2 directed polyclonal antibodies demonstrate cross-reactivity with the HA glycans of influenza virus. *Int. Immunopharmacol.*, 2021, Vol. 99, 108020. doi: 10.1016/j.intimp.2021.108020.
18. Netea M.G., Domínguez-Andrés J., Barreiro L.B., Chavakis T., Divangahi M., Fuchs E., Joosten L.A.B., van der Meer J.W.M., Mhlanga M.M., Mulder W.J.M., Riksen N.P., Schlitzer A., Schultze J.L., Benn C.S., Sun J.C., Xavier R.J., Latz E. Defining trained immunity and its role in health and disease. *Nat. Rev. Immunol.*, 2020, Vol. 20, pp. 375-388.
19. Pallikkuth S., Williams E., Pahwa R., Hoffer M., Pahwa S. Association of flu specific and SARS-CoV-2 specific CD4 T cell responses in SARS-CoV-2 infected asymptomatic health care workers. *Vaccine*, 2021, Vol. 39, no. 41, pp. 6019-6024.
20. Poniedziałek B., Hallmann E., Sikora D., Szymański K., Kondratiuk K., Żurawski J., Rzymek P., Brydak L. Relationship between Humoral Response in COVID-19 and Seasonal Influenza Vaccination. *Vaccines (Basel)*, 2022, Vol. 10, no. 10, 1621. doi: 10.3390/vaccines10101621.
21. Pontiroli A.E., Scovenna F., Carlini V., Tagliabue E., Martin-Delgado J., Sala L., Tanzi E., Zanoni I. Effect of vaccination against influenza viruses on infection, hospitalization, and death from respiratory COVID-19: A Systematic Review and Meta-Analysis. SSRN, 2023. doi: 10.2139/ssrn.4519551.
22. Puro V., Castilletti C., Agrati C., Goletti D., Leone S., Agresta A., Cimini E., Tartaglia E., Casetti R., Colavita F., Meschi S., Matusali G., Lapa D., Fard S.N., Aiello A., Farrone C., Galli P., Capobianchi M.R., Ippolito G. Impact of prior influenza and pneumococcal vaccines on humoral and cellular response to SARS-CoV-2 BNT162b2 Vaccination. *Vaccines*, 2021, Vol. 9, 615. doi: 10.3390/vaccines9060615.
23. Sánchez-Ramón S., Conejero L., Netea M.G., Sancho D., Palomares Ó., Subiza J.L. Trained immunity-based vaccines: A new paradigm for the development of broad-spectrum anti-infectious formulations. *Front. Immunol.* 2018, Vol. 9, 2936. doi: 10.3389/fimmu.2018.02936.
24. Su W., Wang H., Sun C., Li N., Guo X., Song Q., Liang Q., Liang M., Ding X., Sun Y. The Association between previous influenza vaccination and COVID-19 infection risk and severity: a systematic review and meta-analysis. *Am. J. Prev. Med.*, 2022, Vol. 63, no. 1, pp. 121-130.
25. van Aalst S., Ludwig I.S., van der Zee R., van Eden W., Broere F. Bystander activation of irrelevant CD4⁺ T cells following antigen-specific vaccination occurs in the presence and absence of adjuvant. *PLoS One*, 2017, Vol. 12, e0177365. doi: 10.1371/journal.pone.0177365.
26. Wilcox C.R., Islam N., Dambha-Miller H. Association between influenza vaccination and hospitalisation or all-cause mortality in people with COVID-19: A retrospective cohort study. *BMJ Open Respir. Res.*, 2021 Vol. 8, no. 1, e000857. doi: 10.1136/bmjresp-2020-000857.

Авторы:

Костинов М.П. — д.м.н., профессор, член-корр. РАН, главный научный сотрудник, заведующий лабораторией вакцинопрофилактики и иммунотерапии аллергических заболеваний ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова»; заведующий кафедрой эпидемиологии и современных технологий вакцинации Института профессионального образования ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Министерства здравоохранения РФ (Сеченовский университет), Москва, Россия

Настаева Н.Ю. — врач-эпидемиолог ФГБУЗ «Новороссийский клинический центр Федерального медико-биологического агентства», г. Новороссийск, Россия

Никитюк Н.Ф. — д.м.н., профессор, ведущий научный сотрудник лаборатории вакцинопрофилактики и иммунотерапии аллергических заболеваний ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова»; преподаватель кафедры эпидемиологии и современных технологий вакцинации Института профессионального образования ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Министерства здравоохранения РФ (Сеченовский университет), Москва, Россия

Authors:

Kostinov M.P., PhD, MD (Medicine), Professor, Corresponding Member, Russian Academy of Sciences, Head, Laboratory of Vaccine Prophylaxis and Immunotherapy of Allergic Diseases, I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera; Head, Department of Epidemiology and Modern Vaccination Technologies of the Professional Education Institute, I. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russian Federation

Nastaeva N.Yu., Epidemiologist, Novorossiysk Clinical Center, Federal Medical and Biological Agency, Novorossiysk, Russian Federation

Nikityuk N.F., PhD, MD (Medicine), Professor, Leading Research Associate, Laboratory of Vaccine Prophylaxis and Immunotherapy of Allergic Diseases, I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera; Lecturer, Department of Epidemiology and Modern Vaccination Technologies of the Professional Education Institute, I. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russian Federation

Ахматова Н.К. — д.м.н., профессор, ведущий научный сотрудник лаборатории механизмов регуляции иммунитета ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова», Москва, Россия

Akhmatova N.K., PhD, MD (Medicine), Professor, Leading Research Associate, Laboratory of Immunity Regulation Mechanisms, I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation

Албаханса Мана Иветт — аспирант кафедры эпидемиологии и современных технологий вакцинации Института профессионального образования ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Министерства здравоохранения РФ (Сеченовский университет), Москва, Россия

Albahansa Mana Yvette, Postgraduate Student, Department of Epidemiology and Modern Vaccination Technologies of Professional Education Institute, I. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russian Federation

Юшкова С.В. — аспирант кафедры эпидемиологии и современных технологий вакцинации Института профессионального образования ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Министерства здравоохранения РФ (Сеченовский университет), Москва, Россия

Yushkova S.V., Postgraduate Student, Department of Epidemiology and Modern Vaccination Technologies of Professional Education Institute, I. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russian Federation

Андреева Н.П. — к.м.н., доцент кафедры организации здравоохранения и информационных технологий в медицине ФГБОУ ВО «Чувашский государственный университет имени И.Н. Ульянова»; врач — аллерголог-иммунолог БУ «Городская детская клиническая больница» Министерства здравоохранения Чувашской Республики; главный внештатный детский специалист аллерголог-иммунолог Министерства здравоохранения Чувашской Республики, г. Чебоксары, Чувашская Республика, Россия

Andreeva N.P., PhD (Medicine), Associate Professor, Department of Health Organization and Information Technologies in Medicine, I. Ulyanov Chuvash State University, Cheboksary; Allergologist-Immunologist, City Children's Clinical Hospital of Cheboksary; Chief Freelance Pediatric Specialist Allergologist-Immunologist of the Ministry of Health of the Chuvash Republic, Cheboksary, Chuvash Republic, Russian Federation

Костинова А.М. — к.м.н., ассистент кафедры эпидемиологии и современных технологий вакцинации Института профессионального образования ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Министерства здравоохранения РФ (Сеченовский университет), Москва, Россия

Kostinova A.M., PhD (Medicine), Assistant Professor, Department of Epidemiology and Modern Vaccination Technologies of the Institute of Professional Education, I. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russian Federation

Линок А.В. — к.м.н., доцент кафедры эпидемиологии и современных технологий вакцинации Института профессионального образования ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Министерства здравоохранения РФ (Сеченовский университет); научный сотрудник лаборатории эпидемиологического анализа и мониторинга инфекционных заболеваний ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова», Москва, Россия

Linok A.V., PhD (Medicine), Associate Professor, Department of Epidemiology and Modern Vaccination Technologies of the Institute of Professional Education, I. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russian Federation; Research Associate, Laboratory for Epidemiological Analysis and Monitoring of Infectious Diseases, I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation

Локтионова М.Н. — к.м.н., доцент кафедры эпидемиологии и современных технологий вакцинации Института профессионального образования ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Министерства здравоохранения РФ (Сеченовский университет), Москва, Россия

Loktionova M.N., PhD (Medicine), Associate Professor, Department of Epidemiology and Modern Vaccination Technologies of the Professional Education Institute, I. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russian Federation

Храпунова И.А. — д.м.н., профессор кафедры эпидемиологии и современных технологий вакцинации Института профессионального образования ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Министерства здравоохранения РФ (Сеченовский университет), Москва, Россия

Khrapunova I.A., PhD, MD (Medicine), Professor, Department of Epidemiology and Modern Vaccination Technologies of the Institute of Professional Education, I. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russian Federation

ИЗМЕНЕНИЯ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО ФЕНОТИПА ЦИРКУЛИРУЮЩИХ МОНОЦИТОВ В ДИНАМИКЕ БЕРЕМЕННОСТИ

Бухтуева Н.Г.¹, Леплина О.Ю.², Шевела Е.Я.², Тихонова М.А.²,
Пасман Н.М.³, Останин А.А.², Черных Е.Р.²

¹ ГБУЗ НСО «Городская больница № 1», г. Новосибирск, Россия

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

³ Институт медицины и психологии ФГАОУ ВО «Новосибирский национальный исследовательский
государственный университет», г. Новосибирск, Россия

Резюме. Перестройка иммунной системы при беременности представляет строго контролируемый динамический процесс, в рамках которого первый и третий триместр являются провоспалительными, а второй — соответствует противовоспалительной фазе. Однако вовлеченность моноцитов в регуляцию баланса между воспалительным и противовоспалительным статусом остается мало изученной. Известно, что функциональный фенотип моноцитов зависит от их субпопуляционной принадлежности, оцениваемой по экспрессии CD14 и CD16, и сопряжен с экспрессией M1(CCR2)- и M2(CD206)-ассоциированных молекул, характеризующих, соответственно, моноциты с про- и противовоспалительной активностью. В настоящей работе методом проточной цитофлуориметрии исследована экспрессия CCR2 и CD206 в субпопуляциях классических (CD14⁺⁺CD16⁻, кМо), промежуточных (CD14⁺⁺CD16⁺, пМо) и неклассических (CD14⁺CD16⁺⁺, нМо) моноцитов у беременных на различных сроках гестации в сравнении с небеременными. В исследование были включены 14 беременных в первом, 20 — во втором и 26 — в третьем триместре, а также 29 фертильных небеременных. Однофакторный дисперсионный анализ выявил существенные различия в экспрессии CCR2 и CD206 в указанных группах, которые были наиболее выражены в классических и промежуточных моноцитах и сильнее проявлялись в отношении экспрессии CD206. В целом моноциты беременных характеризовались сниженной экспрессией CCR2 и повышенной экспрессией CD206, что свидетельствовало о смещении баланса в сторону противовоспалительного профиля. Эти изменения проявлялись уже в первом триместре (повышенный уровень средней интенсивности флуоресценции [MFI] CD206 в кМо и пМо; $p < 0,05$) и достигали наибольшей выраженности во втором триместре, проявляясь достоверно повышенной экспрессией CD206 (% клеток, MFI) и сниженной экспрессией CCR2 (% клеток,

Адрес для переписки:

Леплина Ольга Юрьевна
ФГБНУ «Научно-исследовательский институт
фундаментальной и клинической иммунологии»
630099, Россия, г. Новосибирск, ул. Ядринцевская, 14.
Тел.: 8 (383) 228-21-01.
Факс: 8 (383) 222-70-28.
E-mail: oleplina@mail.ru, ct_lab@mail.ru

Address for correspondence:

Olga Yu. Leplina
Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology
14 Yadrintsevskaya St
Novosibirsk
630099 Russian Federation
Phone: +7 (383) 228-21-01.
Fax: +7 (383) 222-70-28.
E-mail: oleplina@mail.ru, ct_lab@mail.ru

Образец цитирования:

Н.Г. Бухтуева, О.Ю. Леплина, Е.Я. Шевела,
М.А. Тихонова, Н.М. Пасман, А.А. Останин,
Е.Р. Черных «Изменения функционального фенотипа
циркулирующих моноцитов в динамике беременности»
// Медицинская иммунология, 2025. Т. 27, № 1.
С. 179-196.
doi: 10.15789/1563-0625-COT-2990

© Бухтуева Н.Г. и соавт., 2025
Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

N.G. Bukhtueva, O.Yu. Leplina, E.Ya. Shevela,
M.A. Tikhonova, N.M. Pasman, A.A. Ostanin, E.R. Chernykh
“Changes of the functional phenotype of circulating monocytes
during pregnancy”, Medical Immunology (Russia)/
Meditsinskaya Immunologiya, 2025, Vol. 27, no. 1,
pp. 179-196.
doi: 10.15789/1563-0625-COT-2990

© Bukhtueva N.G. et al., 2025
The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License
DOI: 10.15789/1563-0625-COT-2990

MFI) во всех субпопуляциях моноцитов. В третьем триместре доля CD206⁺ кМо по сравнению со вторым триместром снижалась ($p < 0,05$), а относительное содержание CCR2⁺ клеток в кМо и пМо повышалось. Характерно, что в первом и третьем триместрах выявленные изменения сочетались с усилением провоспалительного профиля моноцитов, которое в первом триместре было рестриктировано субпопуляцией неклассических моноцитов, а в третьем триместре опосредовалось промежуточными и неклассическими моноцитами. Полученные данные свидетельствуют о вовлеченности моноцитов в регуляцию про- и противовоспалительного баланса в динамике гестации с преобладающим формированием M2-профиля в классических моноцитах в первом и третьем триместрах и всех субпопуляциях моноцитов во 2-м триместре и усилением M1-провоспалительного профиля в промежуточных и неклассических моноцитах в первом и третьем триместрах.

Ключевые слова: субпопуляции моноцитов, беременность, иммунная адаптация, M1-ассоциированные маркеры, M2-ассоциированные маркеры, CCR2, CD206

CHANGES OF THE FUNCTIONAL PHENOTYPE OF CIRCULATING MONOCYTES DURING PREGNANCY

Bukhtueva N.G.^a, Leplina O.Yu.^b, Shevela E.Ya.^b, Tikhonova M.A.^b,
Pasman N.M.^c, Ostanin A.A.^b, Chernykh E.R.^b

^a City Hospital No. 1, Novosibirsk, Russian Federation

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

^c Institute of Medicine and Psychology, Novosibirsk National Research State University, Novosibirsk, Russian Federation

Abstract. Rearrangement of the immune system during pregnancy is a strictly controlled, dynamic process in which the first and third trimesters are, respectively, pro-inflammatory, and anti-inflammatory periods. However, monocyte involvement in regulating the pro/anti-inflammatory balance remains poorly understood. The functional phenotype of monocytes is known to depend on their subsets assessed by CD14 and CD16 expression, and is associated with expression of M1(CCR2)- and M2(CD206) molecules, associated with pro- and anti-inflammatory activity, respectively. Here we have investigated the expression of CCR2 and CD206 in classical (CD14⁺⁺CD16⁻, cMo), intermediate (CD14⁺⁺CD16⁺, iMo), and non-classical monocytes (CD14⁺CD16⁺⁺, nMo) in pregnant women at different gestational ages in comparison with non-pregnant women. The study included 14 pregnant women in the first trimester, 20 in the second trimester, 26 in the third trimester, and 29 fertile non-pregnant women. One-way analysis of variance in these groups revealed significant differences CCR2 and CD206 expression (more pronounced in classical and intermediate monocytes and stronger in relation to CD206 expression). Overall, monocytes from pregnant women had decreased CCR2⁺ and increased CD206 expression, suggesting a shift towards an anti-inflammatory profile. These changes appeared in the first trimester (increased CD206 mean fluorescence intensity [MFI] in cMo and iMo, $p < 0.05$) and reached their maximum in the second trimester, manifested by significant increase in CD206 and decrease in CCR2 expression (% of cells, MFI) in all monocyte subsets. In the third trimester, CD206⁺ cMo decreased, as compared to the second trimester ($p < 0.05$), and the percentage of CCR2⁺ cMo and iMo increased. Of note, these changes in the first and third trimesters were combined with increased pro-inflammatory expression profile of non-classical monocytes which was restricted by the non-classical monocyte subpopulation in the first trimester, then being mediated by intermediate and non-classical monocytes in the third trimester. The data obtained suggest involvement of monocytes in regulation of the pro- and anti-inflammatory balance during pregnancy, with predominant development of the M2 profile in classical monocytes during the first and third trimesters, and in all monocyte subsets over second trimester, along with increase in the M1 proinflammatory profile of intermediate and non-classical monocytes in the first and third trimesters.

Keywords: monocyte subsets, pregnancy, immune adaptation, M1-associated markers, M2-associated markers, CCR2, CD206

Работа выполнена за счет средств федерального бюджета на проведение фундаментальных научных исследований (FGMN 0415-2021-0003 и FGMN 0415-2024-0011).

Введение

Успешное вынашивание беременности требует подавления иммунного ответа матери против фетальных антигенов при сохранении способности элиминировать инфекционные патогены. Решение этих задач достигается за счет перестройки иммунной системы, проявляющейся в самых общих чертах ослаблением адаптивного и активацией врожденного иммунитета [3]. Считается, что снижение цитотоксической функции лимфоцитов на фоне иммунологической толерантности восполняется активацией клеток врожденного иммунитета и, в частности, моноцитов, способных непосредственно уничтожать патогены [25, 43]. Действительно, наибольшее количество дифференциально экспрессируемых генов со сниженной экспрессией регистрируется в Т-клетках, а с повышенной — в моноцитах [32].

Содержание моноцитов при беременности возрастает, и они характеризуются признаками активации и усилением провоспалительной активности, о чем свидетельствует усиление экспрессии активационных маркеров, повышенная продукция свободных метаболитов кислорода и провоспалительных цитокинов, а также активация генов, ассоциированных с LPS-, AP-1-, IL-18-, IL-1-, MAPK-сигнальными путями [17, 22, 30, 42].

Будучи пластичной популяцией, активированные моноциты в процессе поляризации могут, однако, приобретать не только провоспалительный, но и противовоспалительный фенотип и осуществлять «регуляторную» функцию, направленную на подавление воспаления и реакций адаптивного иммунитета [15, 38]. Выявленный дефицит моноцитов с противовоспалительной/«регуляторной» активностью при аутоиммунной патологии [19, 49] и повышенное содержание при опухолевом росте [28, 31] позволяют предполагать, что «регуляторные» моноциты могут участвовать в ограничении аутоиммунного ответа и поддержании иммунологической толерантности при беременности. Действительно, в отдельных сообщениях приводятся данные о сниженной продукции моноцитами провоспалительных цитокинов [44, 48], повышенной экспрессии генов IL-10 и IDO [29] и активации генов, подавляющих иммунный ответ у беременных [10]. Однако противовоспалительная активность моноцитов при гестации исследована в значительно меньшей степени.

В периферической крови человека моноциты представлены гетерогенной популяцией, которая в соответствии со стандартной классификацией по экспрессии CD14/CD16 включает 3 функционально и количественно различные субпопуляции — классические (кМо, CD14⁺⁺CD16⁻), промежуточные (пМо, CD14⁺⁺CD16⁺) и неклассические (нМо, CD14⁺CD16⁺⁺) моноциты [11, 54]. Среди этих субпопуляций классические и промежуточные моноциты считаются провоспалительными, а неклассические — противовоспалительными, и возрастание при беременности пМо интерпретируется как усиление провоспалительного профиля [17].

Другой классификацией является разделение моноцитов по экспрессии M1- и M2-ассоциированных маркеров. Связь фенотипа с про- и противовоспалительной активностью в наибольшей степени продемонстрирована для макрофагов. Способность активированных *in vitro* макрофагов выполнять оппозитные функции позволила выделить классически активированные провоспалительные (M1) и альтернативно активированные противовоспалительные макрофаги (M2) и охарактеризовать M1- (CCR-2, CD80, CD86) и M2- (CX3CR1, CD163, CD206) ассоциированные маркеры [12, 21, 25]. Позже выяснилось, что циркулирующие моноциты также экспрессируют характерные для M1- и M2-макрофагов маркеры и демонстрируют признаки поляризации, что позволило обозначить их как M1- и M2-подобные моноциты. Изменение M1/M2-баланса моноцитов выявлено при раке, аутоиммунной патологии, хроническом воспалении и старении [13, 35, 50], однако при беременности не исследовалось. Между тем, учитывая важную роль иммунологической толерантности в поддержании беременности и смену провоспалительного и противовоспалительного статуса в ходе беременности [14], можно полагать, что циркулирующие моноциты проявляют не только провоспалительную, но и противовоспалительную активность и баланс M1/M2-фенотипов может играть важную роль в индукции иммунологической толерантности и чередовании иммунологических фаз в ходе гестации.

В настоящей работе мы исследовали экспрессию CCR2 и CD206 в качестве M1- и M2-ассоциированных маркеров в классических, промежуточных и неклассических моноцитах у беременных на различных сроках гестации в сравнении с фертильными небеременными.

Материалы и методы

Исследование базировалось на обследовании беременных с неосложненной гестацией и фертильных небеременных в качестве контрольной

группы. Отбор в группу беременных проводили на основе следующих критериев: возраст от 18 до 42 лет; одноплодная беременность в естественном цикле. Критериями исключения являлось несоответствие критериям включения, отягощенный акушерский анамнез (наличие привычного невынашивания, развитие преэклампсии, синдрома задержки развития плода в анамнезе); наличие вредных привычек, онкологических и аутоиммунных заболеваний, ожирения 3-4-й стадии, психических расстройств; выявление на момент обследования признаков декомпенсации экстрагенитальной патологии, гестационных осложнений и признаков родовой деятельности, преждевременные роды и патология плода. Группу сравнения составили фертильные небеременные без отягощенного соматического анамнеза в возрасте от 23 до 42 лет, имеющие в анамнезе не менее 1 родов. Забор крови в этой группе осуществляли на 5-10-й день менструального цикла. Исследования проводили после получения от всех участников письменного информированного согласия.

Мононуклеарные клетки (МНК) выделяли стандартно методом центрифугирования гепаринизированной крови в градиенте плотности фиколла-верографина ($p = 1,078$). Лизис эритроцитов при необходимости проводили раствором VersaLyse (Beckman Coulter, Франция) в соответствии с инструкцией. Оценку классических, промежуточных и неклассических моноцитов проводили по общепринятой методике с использованием PerCP-(HLA-DR), FITC-(CD16) и PacificBlue-(CD14) меченных моноклональных антител (BD PharMingen, США). Относительное содержание $CCR2^+$ и $CD206^+$ клеток определяли в гейтах классических, промежуточных и неклассических моноцитов с использованием APC-(CCR2) и PE-(CD206) меченных моноклональных антител. В отдельной серии экспериментов исследовали возможные сочетания экспрессии CCR2 и CD206, оценивая с помощью AlexaFluor 647-(CCR2) и PE-(CD206) меченных моноклональных антител (BioLegend, США) популяции $CCR2^+CD206^-$, $CCR2^+CD206^+$, $CCR2^-CD206^+$ и $CCR2^-CD206^-$ клеток в классических, промежуточных и неклассических моноцитах.

Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием пакета программ Statistica 6.0. Данные представлены в виде медианных значений и квартильного диапазона ($Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})$). Для выявления значимых различий в группах использовали однофакторный дисперсионный анализ Краскела–Уоллиса, для сравнения показателей двух выборок – непараметрические критерии U (Манна–Уитни) и W

(Вилкоксона) соответственно для несвязанных и связанных выборок. Различия считали достоверными при уровне значимости $p < 0,05$.

Результаты

Чтобы выяснить, как меняется субпопуляционный состав Мо и экспрессия M1- и M2-ассоциированных молекул в динамике гестации, относительное содержание кМо, пМо и нМо и экспрессию CCR2 и CD206 в этих субпопуляциях исследовали в трех группах беременных со сроками гестации, соответствовавших 1-му, 2-му и 3-му триместрам беременности. Характеристика беременных в указанных группах представлена в таблице 1. В первую группу вошли 14 беременных со сроком гестации от 8 до 13 недель, во вторую – 20 беременных со сроком от 17,5 до 20 недель и в третью – 26 беременных со сроком от 35 до 40 недель. Как видно, сформированные группы были однородны по возрасту, гравидарности и паритету беременности. Анализ соматического статуса не выявил различий по сопутствующей компенсированной экстрагенитальной патологии. Все беременные наблюдались до момента родоразрешения. Частота родоразрешения через Кесарево сечение в группах беременных, обследованных в 1-м и 2-м триместрах, была одинаковой и составляла 35%, а у обследованных в 3-м триместре – 60%. Более высокий показатель хирургического родоразрешения в этой группе объяснялся наличием рубца на матке ($n = 12$), либо необходимостью исключить потужной период ($n = 4$) и не был связан с гестационными осложнениями. Новорожденные у всех обследованных беременных имели удовлетворительное состояние (отсутствие гипоксии, $\geq 7/8$ баллов по Апгар). Группу сравнения составили 29 здоровых фертильных женщин детородного возраста от 23 до 42 лет.

Сравнительная оценка субпопуляций моноцитов в динамике беременности (табл. 2) выявила возрастание пМо, которое регистрировалось уже в 1-м триместре, и достигало максимума во 2-м триместре, достоверно превышая аналогичный показатель у небеременных и беременных в 1-м триместре. Изменения кМо проявлялись небольшим снижением доли этих клеток в 3-м триместре, которое, однако, не достигало статистической достоверности. Относительное содержание нМо во всех триместрах не отличалось от уровня небеременных.

Анализ экспрессии M1- (CCR2) и M2- (CD206) ассоциированных молекул у 21 женщины контрольной группы показал (табл. 3), что у небеременных наибольшее количество $CCR2^+$ клеток было сосредоточено в кМо, а наименьшее – в нМо. При этом доля $CCR2^+$ клеток достоверно различалась между субпопуляциями моноцитов.

ТАБЛИЦА 1. ХАРАКТЕРИСТИКА БЕРЕМЕННЫХ ЖЕНЩИН

TABLE 1. CHARACTERISTICS OF PREGNANT WOMEN

Параметры Parameters	Беременные женщины Pregnant women			p_U
	1-й триместр 1 st trimester n = 14	2-й триместр 2 nd trimester n = 20	3-й триместр 3 rd trimester n = 26	
	1	2	3	
Возраст, лет Age, years Me (min-max)	29,5 (21-41)	29,5 (18-39)	30 (19-38)	$p_{1-2} = 0,98$ $p_{1-3} = 0,89$ $p_{2-3} = 0,84$
Срок беременности, недель Pregnancy, weeks Me (min-max)	9 (9-10)	18 (17,5-20,0)	38 (35,0-39,5)	
Количество беременностей Number of pregnancy Me (min-max)	2 (1-4)	1,5 (1-2)	2 (1-4)	$p_{1-2} = 0,31$ $p_{1-3} = 0,97$ $p_{2-3} = 0,18$
Паритет родов Childbirth parity Me (min-max)	1,5 (1-3)	1 (1-2)	2 (1-2)	$p_{1-2} = 0,23$ $p_{1-3} = 0,91$ $p_{2-3} = 0,20$
Компенсированная экстрагенитальная патология, n (%) Compensated extragenital pathology, n (%)				p_{FET}
Частота в целом по группе Extragenital pathology rate	9/14 (64%)	16/20 (80%)	20/26 (77%)	$p_{1-2} = 0,74$ $p_{1-3} = 0,22$ $p_{2-3} = 0,13$
Ожирение 1-2-й ст. Obesity stage 1-2	1 (7%)	2 (10%)	3 (11%)	$p_{1-2} = 0,53$ $p_{1-3} = 0,63$ $p_{2-3} = 0,91$
Гипертоническая болезнь 1-й ст. Hypertonic disease stage 1	1 (7%)	1 (5%)	1 (3%)	
Субклинический гипотиреоз Subclinical hypothyroidism	0	3 (15%)	2 (7%)	
Хронический пиелонефрит Chronic pyelonephritis	0	1 (5%)	2 (7%)	
Хронический гастрит Chronic gastritis	1 (7%)	1 (5%)	1 (3%)	
Другая патология Another pathology	6 (43%)	8 (40%)	11 (42%)	
Кесарево сечение, n (%) Cesarean section, n (%)	5 (35%)	7 (35%)	16 (60%)	

Примечание. p – достоверность различий. p_U – критерий Манна-Уитни; p_{FET} – точный критерий Фишера.

Note. p, significance of differences; p_U , Mann-Whitney U test; p_{FET} , Fisher's exact test.

Так, относительное содержание CCR2⁺ клеток в пМо было достоверно ниже, чем в кМо, а доля CCR2⁺ клеток в нМо – ниже, чем в пМо и кМо. Различия в экспрессии CCR2 проявлялись также при оценке средней интенсивности флуоресценции CCR2 (MFI). Уровни MFI CCR2 были наибольшими в кМо и наименьшими в нМо, однако различия в интенсивности экспрессии CCR2 между субпопуляциями моноцитов в этом случае проявлялись на уровне выраженных тенденций. Содержание CD206⁺ клеток было наибольшим в

субпопуляциях пМо и нМо, достоверно превышая уровень этих клеток в кМо. Интенсивность экспрессии CD206 в нМо была также достоверно выше, чем в пМо.

Чтобы выяснить, меняется ли в ходе беременности экспрессия CCR2 и CD206, был проведен однофакторный дисперсионный анализ Краскела–Уоллиса (табл. 4), характеризующий различия медиан анализируемых параметров в 4 группах, включая небеременных и беременных в 1-м, 2-м и 3-м триместрах. Как видно, относительное

ТАБЛИЦА 2. СУБПОПУЛЯЦИИ МОНОЦИТОВ В ДИНАМИКЕ БЕРЕМЕННОСТИ

TABLE 2. MONOCYTE SUBSETS DURING PREGNANCY

Субпопуляции Мо (%) Mo subsets (%)	Фертильные небеременные Fertile non-pregnant n = 21	Беременные Pregnant			p _U
		1-й триместр 1 st trimester n = 14	2-й триместр 2 nd trimester n = 19	3-й триместр 3 rd trimester n = 22	
		0	1	2	3
кМо (сМо) CD14 ⁺⁺ 16 ⁻	90 (88-93)	92 (88-93) p ₀₋₁ = 0,61	91 (87-92) p ₀₋₂ = 0,81	88 (84-90) p ₀₋₃ = 0,2	p ₁₋₃ = 0,13 p ₁₋₂ = 0,41 p ₂₋₃ = 0,32
пМо (iМо) CD14 ⁺⁺ 16 ⁺	2,6 (2,1-4,5)	3,3 (2,7-4,4) p ₀₋₁ = 0,26	4,9 (4,0-6,5) p ₀₋₂ = 0,003	4,2 (2,6-6,0) p ₀₋₃ = 0,09	p ₁₋₃ = 0,42 p ₁₋₂ = 0,035 p ₂₋₃ = 0,22
нМо (nМо) CD14 ⁺ 16 ⁺⁺	2,6 (1,5-3,6)	2,3 (1,5-2,9) p ₀₋₁ = 0,51	2,1 (2,0-2,9) p ₀₋₂ = 0,58	2,8 (1,6-4,6) p ₀₋₃ = 0,5	p ₁₋₃ = 0,24 p ₁₋₂ = 0,95 p ₂₋₃ = 0,30

Примечание. Данные представлены в виде медианы (Me) и интерквартильного диапазона (Q_{0,25}-Q_{0,75}); p_U – достоверность различий между группами; U – критерий Манна-Уитни.

Note. Data are presented as median (Me) and interquartile range (Q_{0,25}-Q_{0,75}); p_U – the significance of the differences between groups; Mann-Whitney U test.

содержание CCR2⁺Мо между анализируемыми группами достоверно различалось, причем уровни этих клеток у беременных были ниже, чем у небеременных. Наиболее выраженные различия в содержании CCR2⁺ клеток регистрировались в субпопуляции кМо и пМо, и менее выраженные, но тем не менее статистически значимые – в субпопуляции нМо. Изменения в содержании

CD206⁺ клеток при беременности были выражены еще в большей степени. Причем доля этих клеток у беременных была в целом выше, чем у небеременных. Аналогично CCR2, различия в содержании CD206⁺ клеток в кМо и пМо были более выраженными, чем в нМо.

Учитывая достоверные изменения в экспрессии CCR2 и CD206 в ходе гестации, на следу-

ТАБЛИЦА 3. ЭКСПРЕССИЯ CCR2 И CD206 В СУБПОПУЛЯЦИЯХ МОНОЦИТОВ В ГРУППЕ НЕБЕРЕМЕННЫХ

TABLE 3. CCR2 AND CD206 EXPRESSION IN THE THE MONOCYTE SUBSETS IN THE NON-PREGNANT GROUP

Параметры Parameters		Субпопуляции моноцитов Mo subsets		
		кМо (сМо)	пМо (iМо)	нМо (nМо)
		1	2	3
CCR2 (M1)	%	97 (88-99)	75 (58-98) p ₁₋₂ = 0,0033	69 (44-87) p ₁₋₃ = 0,0028 p ₂₋₃ = 0,0034
	MFI	5230 (1880-8340)	4825 (2810-6000) p ₁₋₂ = 0,05	3860 (2480-4520) p ₁₋₃ = 0,08 p ₂₋₃ = 0,14
CD206 (M2)	%	4,1 (2,1-7,7)	10 (8,4-16,0) p ₁₋₂ = 0,0015	14 (7,1-19,0) p ₁₋₃ = 0,0035 p ₂₋₃ = 0,43
	MFI	1210 (760-1730)	830 (716-1430) p ₁₋₂ = 0,17	1200 (790-1860) p ₁₋₃ = 0,59 p ₂₋₃ = 0,023

Примечание. Данные представлены в виде медианы (Me) и интерквартильного диапазона (Q_{0,25}-Q_{0,75}); p – достоверность различий между группами; W – парный критерий Вилкоксона.

Note. Data are presented as median (Me) and interquartile range (Q_{0,25}-Q_{0,75}). p, the significance of the differences between groups; Wilcoxon matched pairs test.

ТАБЛИЦА 4. ИЗМЕНЕНИЯ ЭКСПРЕССИИ CCR2 И CD206 В СУБПОПУЛЯЦИЯХ МОНОЦИТОВ В ХОДЕ БЕРЕМЕННОСТИ

TABLE 4. CHANGES OF CCR2 AND CD206 EXPRESSION IN THE MONOCYTE SUBSETS DURING PREGNANCY

Группы Groups	CCR2 ⁺ клетки (%, Me (Q _{0,25} -Q _{0,75})) CCR2 ⁺ cells (%, Me (Q _{0,25} -Q _{0,75}))			CD206 ⁺ клетки (%, Me (Q _{0,25} -Q _{0,75})) CD206 ⁺ cells (%, Me (Q _{0,25} -Q _{0,75}))		
	кМо сМо	пМо iМо	нМо nМо	кМо сМо	пМо iМо	нМо nМо
Небеременные Non-pregnant	97 (88-99)	75 (58-98)	69 (44-87)	4,1 (2,1-7,7)	10 (8,4-16,0)	14 (7,1-19,0)
Беременные: 1-й триместр Pregnant: 1 st trimester	92 (68-99)	68 (48-96)	44 (35-62)	2,1 (2-5)	9,5 (6-15)	8,3 (6-13)
2-й триместр 2 nd trimester	63 (56-85)	50 (37-60)	45 (31-51)	14 (9-21)	16 (14-20)	15 (10-19)
3-й триместр 3 rd trimester	68 (52-86)	61 (59-70)	57 (44-67)	9,7 (7-10)	26 (18-31)	23 (13-26)
ANOVA	p = 0,0015	p = 0,009	p = 0,037	p = 0,0000	p = 0,0000	p = 0,009
	H = 15,4	H = 11,4	H = 8,5	H = 29,8	H = 22,8	H = 11,6

Примечание. H – критерий Краскела–Уоллиса.

Note. H, Kruskal–Wallis test.

ющем этапе мы провели попарное сравнение относительного содержания CCR2⁺ и CD206⁺ клеток между группами небеременных и беременных, обследованных в 1-м, 2-м и 3-м триместрах (рис. 1). При этом наряду с относительным содержанием клеток сравнивались различия в интенсивности экспрессии (MFI) молекул CCR2 и CD206. Изменения в экспрессии CCR2 в 1-м триместре выявлялись только в субпопуляции нМо в виде 2-кратного усиления интенсивности экспрессии данного маркера, которое сочеталось со снижением доли CCR2⁺ нМо. Во 2-м триместре наблюдалось снижение содержания CCR2⁺ клеток в субпопуляциях кМо и пМо, что подтверждалось достоверно меньшим их содержанием по сравнению с таковым у беременных в 1-м триместре и небеременных. Доля CCR2⁺ клеток в нМо по сравнению с 1-м триместром не менялась, оставаясь сниженной. Кроме того, CCR2⁺ клетки во всех субпопуляциях Мо во 2-м триместре характеризовались сниженными показателями MFI, уровни которых были ниже аналогичных показателей беременных в 1-м триместре и небеременных. В 3-м триместре отмечалось усиление экспрессии CCR2 в сравнении со 2-м триместром. В кМо это проявлялось увеличением интенсивности экспрессии CCR2 до нижнего порога данного показателя у небеременных, тогда как относительное содержание CCR2⁺ клеток значимо не менялось, оставаясь сниженным (в сравнении с небеременными). В то же время

в пМо и нМо отмечалось достоверное возрастание доли CCR2⁺ клеток до уровня небеременных. Таким образом, изменения в содержании CCR2⁺ клеток в различных субпопуляциях Мо имели свою динамику. В кМо содержание этих клеток снижалось во 2-м триместре и сохранялось сниженным в 3-м триместре, в пМо – также уменьшалось во 2-м триместре, но восстанавливалось в 3-м триместре; в нМо – уменьшалось уже в 1-м триместре, сохранялось на этом уровне во 2-м триместре и восстанавливалось до уровня небеременных в 3-м триместре.

Изменения в содержании CD206⁺Мо регистрировались уже в 1-м триместре. Несмотря на снижение доли CD206⁺ клеток в нМо (самой малочисленной субпопуляции Мо), интенсивность экспрессии CD206 в доминирующей по численности субпопуляции кМо, а также в пМо по сравнению с аналогичными показателями небеременных достоверно возрастала. Во втором триместре относительное количество CD206⁺ клеток во всех субпопуляциях увеличивалось, достоверно превышая уровень таковых в 1-м триместре. При этом доля CD206⁺ кМо статистически значимо, а CD206⁺ пМо – на уровне выраженного тренда превышала содержание таковых у небеременных. Интенсивность экспрессии CD206 в субпопуляциях Мо сохранялась на уровне первого триместра. В 3-м триместре содержание CD206⁺ клеток и интенсивность экспрессии CD206 в кМо (по сравнению со 2-м триместром) достоверно сни-

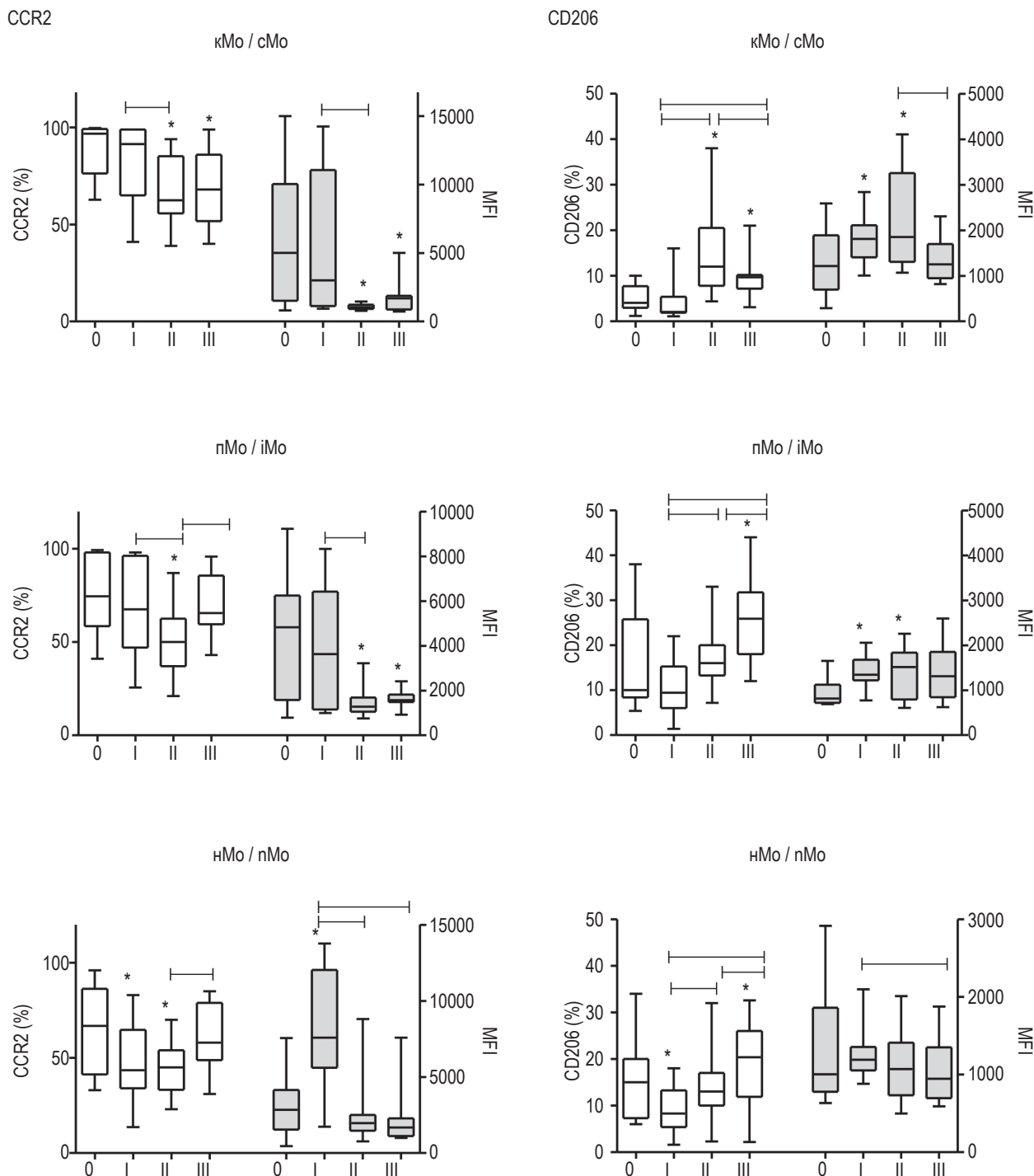


Рисунок 1. Экспрессия CCR2 и CD206 в субпопуляциях моноцитов в динамике беременности

Примечание. Содержание CCR2⁺ и CD206⁺ клеток (%) и интенсивность экспрессии (MFI) в субпопуляциях кМо, пМо и нМо представлены в виде медиан, интерквартильного диапазона (боксы) и диапазона «мин-макс». Анализируемые группы – небеременные (0), беременные в 1-м (1), 2-м (2) и 3-м (3) триместрах. * – достоверность различий с группой небеременных, $p_U < 0,05$, U-критерий Манна-Уитни, — — достоверность различий между группами беременных, $p_W < 0,05$, W-парный критерий Вилкоксона.

Figure 1. CCR2 and CD206 expression in monocyte subsets during pregnancy

Note. The content of CCR2⁺ and CD206⁺ cells (%) and the intensity of expression (mean fluorescence intensity, MFI) in the cMo, iMo and nMo subsets are presented as median, the interquartile range (IQR, boxes) and the Min-Max ranges. Analyzed groups are non-pregnant (0), pregnant in the 1st (1), 2nd (2) and 3rd (3) trimesters. *, the significance of the differences with the non-pregnant group, $p_U < 0.05$, Mann-Whitney U test, — —, the significance of the differences between groups of pregnant women, $p_W < 0.05$, Wilcoxon matched pairs test.

жались. Тем не менее доля этих клеток все еще оставалась повышенной, превышая уровень небеременных. В то же время в субпопуляциях пМо и нМо содержание CD206⁺ клеток продолжало увеличиваться, достигая в 3-м триместре наибольших значений и превышая уровень таковых в группах небеременных, а также беременных в 1-м и 2-м триместрах. Таким образом, в кМо и пМо увеличение экспрессии CD206⁺ клеток наблюдалось, начиная с 1-го триместра, и достигало наибольшего уровня во 2-м (для кМо) и 3-м (для пМо) триместрах, тогда как в нМо — про-градиентному возрастанию CD206⁺ клеток во 2-м и 3-м триместрах предшествовало транзитное снижение этих клеток в 1-м триместре.

Учитывая разнонаправленные изменения в экспрессии CCR2 и CD206 и различную динамику этих изменений в субпопуляциях моноцитов, далее проанализировали, как в ходе гестации меняется индекс соотношения CCR2/CD206-клеток в качестве интегрального показателя баланса моноцитов с M1- и M2-подобным фенотипом. Однофакторный дисперсионный анализ продемонстрировал, что небеременные и беременные на разных сроках гестации характеризовались достоверными различиями индекса CCR2/CD206. Эти различия наиболее ярко проявлялись в субпопуляции кМо ($H = 26,1$; $p = 0,0000$) и пМо ($H = 21,5$; $p = 0,0001$) и в виде тенденции — в субпопуляции нМо ($H = 6,4$; $p = 0,09$). Проведенное далее попарное сравнение анализируемых индексов между группами показало, что в 1-м триместре, CCR2/CD206 со-

отношение в кМо и нМо умеренно возрастало, не достигая статистической значимости. В то же время во 2-м и 3-м триместрах этот показатель был достоверно ниже, чем в 1-м триместре, что было наиболее выражено в субпопуляции кМо (табл. 5).

Согласно данным литературы изменения иммунной системы при гестации носят динамичный характер с чередованием 3 фаз — воспалительной, противовоспалительной и снова воспалительной, соответствующих в целом триместрам беременности [14]. Поскольку CCR2/CD206 соотношение отражает баланс M1/M2-профилей моноцитов, обладающих соответственно про- и противовоспалительной активностью, снижение индекса CCR2/CD206 в субпопуляциях моноцитов во 2-м триместре свидетельствует о сдвиге баланса в сторону M2-фенотипа и участия моноцитов в формировании противовоспалительного статуса.

Теоретически снижение индекса CCR2/CD206 может быть обусловлено уменьшением CCR2⁺ клеток, увеличением CD206⁺ клеток, либо одновременным уменьшением CCR2⁺ и увеличением CD206⁺ моноцитов. Согласно представленным выше данным (рис. 1), переход из 2-го в 3-й триместр сопровождался достоверным снижением доли CD206⁺ клеток в кМо в отсутствие значимых изменений в содержании CCR2⁺ клеток, тогда как в субпопуляциях пМо и нМо — манифестировал возрастанием доли CCR2⁺ клеток. Увеличение относительного содержания CCR2⁺ клеток в последнем случае сочеталось с одно-

ТАБЛИЦА 5. CCR2/CD206-СООТНОШЕНИЕ В СУБПОПУЛЯЦИЯХ МОНОЦИТОВ В ДИНАМИКЕ БЕРЕМЕННОСТИ

TABLE 5. CCR2/CD206 RATIO IN THE MONOCYTE SUBSETS DURING PREGNANCY

	CCR2/CD206 Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)				
	Небеременные Non-pregnant	1-й триместр 1 st trimester	2-й триместр 2 nd trimester	3-й триместр 3 rd trimester	p_w
		1	2	3	
кМо сМо	20 (10-28)	28 (18-44) $p = 0,22$	4,7 (2,7-11,0) $p = 0,0003$	6,8 (4,4-9,9) $p = 0,007$	$p_{1-3} = 0,002$ $p_{1-2} = 0,00003$ $p_{2-3} = 0,18$
пМо iМо	7,9 (5,1-11,0)	6,2 (4,9-11) $p = 0,98$	3,3 (1,8-5,4) $p = 0,003$	2,6 (2,3-3,3) $p = 0,005$	$p_{1-3} = 0,0002$ $p_{1-2} = 0,0007$ $p_{2-3} = 0,74$
нМо nМо	4,3 (2,2-12,0)	5,4 (4,5-6,8) $p = 0,23$	2,8 (2,3-5,1) $p = 0,45$	3,0 (2,1-3,7) $p = 0,22$	$p_{1-3} = 0,006$ $p_{1-2} = 0,02$ $p_{2-3} = 0,73$

Примечание. p – достоверность различий по сравнению с группой небеременных; p_{1-3} , p_{1-2} и p_{2-3} – достоверность различий между группами беременных с различным сроком гестации. W – парный критерий Вилкоксона.

Note. p , the significance of the differences with the non-pregnant group; p_{1-3} , p_{1-2} and p_{2-3} , the significance of the differences between groups of pregnant women with different gestation period; W , Wilcoxon matched pairs test.

ТАБЛИЦА 6. КОЭКСПРЕССИЯ CCR2 И CD206 В СУБПОПУЛЯЦИЯХ МОНОЦИТОВ

TABLE 6. CCR2 AND CD206 CO-EXPRESSION IN MONOCYTE SUBSETS

Группы Groups	Субпопуляции моноцитов Monocyte subsets			P _w		
	кМо сМо	пМо iМо)	нМо nМо	1-2	1-3	2-3
	1	2	3			
CCR2*CD206 ⁻ (%)						
Небеременные Non-pregnant	71 (68-75)	52 (46-61)	49 (41-52)	0,012	0,012	0,65
Беременные Pregnant	60 (51-62) p = 0,007	48 (46-49) p = 0,25	43 (36-53) p = 0,56	0,007	0,007	0,33
CCR2*CD206 ⁺ (%)						
Небеременные Non-pregnant	2,1 (1,8-4,8)	10 (6,7-13,0)	12 (7,9-12,0)	0,012	0,012	0,59
Беременные Pregnant	8,7 (7,1-12,0) p = 0,01	16 (15-27) p = 0,005	15 (12-17) p = 0,27	0,01	0,015	0,21
CCR2*CD206 ⁺ (%)						
Небеременные Non-pregnant	0,95 (0,25-2,50)	4,5 (2,4-10,0)	5,5 (3,6-15,0)	0,012	0,018	0,1
Беременные Pregnant	4,2 (2,9-7,0) p = 0,005	7 (5,2-11,0) p = 0,33	8,2 (8-12) p = 0,23	0,11	0,12	0,4
CCR2*CD206 ⁻ (%)						
Небеременные Non-pregnant	22 (18-28)	30 (28-33)	30 (26-37)	0,017	0,018	0,99
Беременные Pregnant	26 (21-40) p = 0,44	17 (15-30) p = 0,08	21 (17-38) p = 0,27	0,12	0,77	0,12
% CCR2*CD206 ⁺ коэкспрессирующих клеток в популяции CCR2 ⁺ Мо % CCR2*CD206 ⁺ co-expressing cells in the CCR2 ⁺ Mo subset						
Небеременные Non-pregnant	3 (2,3-6,4)	16 (11-22)	19 (13-30)	0,012	0,018	0,035
Беременные Pregnant	15 (10-19) p = 0,004	31 (25-37) p = 0,005	25 (21-39) p = 0,25	0,007	0,008	0,37

Примечание. Представлены данные экспрессии и коэкспрессии CCR2 и CD206 в субпопуляциях моноцитов небеременных (n = 8) и беременных (n = 9) в 3-м триместре; p – достоверность различий с аналогичным показателем небеременных, U – критерий Манна–Уитни; p_w – достоверность различий между субпопуляциями моноцитов, W – парный критерий Вилкоксона.

Note. Data of CCR2 and CD206 expression and co-expression are presented in monocyte subsets of non-pregnant (n = 8) and pregnant women (n = 9) in the 3rd trimester; p, the significance of the differences with a similar parameter of non-pregnant, Mann–Whitney U test; p_w, the significance of the differences between monocyte subsets, Wilcoxon matched pairs test.

временным возрастанием относительного содержания CD206⁺ клеток. Эти данные, с одной стороны, объясняют, почему умеренное возрастание индекса CCR2/CD206, наблюдаемое в 3-м триместре в кМо, не выявлялось в пМо и нМо, а с другой стороны – свидетельствуют о том, что усиление воспалительного потенциала в различных субпопуляциях Мо происходит различными путями, в частности в кМо – за счет снижения экспрессии CD206, а в субпопуляциях пМо и нМо – за счет увеличения экспрессии CCR2.

При этом оставалось неясным, с чем связано одновременное возрастание CD206⁺ клеток в субпопуляциях пМо и нМо – либо с присутствием в компартменте циркулирующих моноцитов клеток с промежуточным M1/M2-фенотипом, одновременно коэкспрессирующих CCR2 и CD206, или с одновременным компенсаторным возрастанием CD206⁺M2-клеток на фоне увеличения CCR2⁺M1-моноцитов.

Чтобы проверить это предположение, на следующем этапе проанализировали различные

комбинации экспрессии CCR2 и CD206 у фертильных небеременных и сравнили эти показатели с аналогичными параметрами беременных в 3-м триместре (табл. 6). В процессе анализа оценивалось относительное содержание четырех типов клеток (CCR2⁺CD206⁻, CCR2⁺CD206⁺, CCR2⁻CD206⁺ и CCR2⁻CD206⁻ клеток) в субпопуляциях моноцитов и доля дабл-позитивных клеток среди всех CCR2-позитивных моноцитов.

Анализ фенотипов моноцитов в группе небеременных показал, что наряду с клетками с изолированной экспрессией CCR2 (CCR2⁺CD206⁻) и CD206 (CCR2⁻CD206⁺) во всех субпопуляциях моноцитов присутствовали дабл-позитивные клетки со смешанным фенотипом (CCR2⁺CD206⁺) и дабл-негативные (CCR2⁻CD206⁻) клетки. Относительное содержание CCR2⁺CD206⁺ клеток было наиболее высоким в субпопуляциях пМо и нМо и достоверно превышало уровень таковых в кМо. Удельный вес этих клеток среди общей популяции CCR2⁺ клеток в пМо и нМо был достоверно выше, чем в кМо. Характерно, что относительное содержание CCR2⁺CD206⁺ клеток в пМо и нМо двукратно превышало уровень CCR2⁻CD206⁺ клеток. Т. е. две трети CD206-позитивных пМо и нМо были представлены моноцитами со смешанным M1/M2-фенотипом и только одна треть имеет фенотип M2-моноцитов.

В группе беременных, обследованных в третьем триместре, значительная часть CD206-экспрессирующих моноцитов была также представлена клетками со смешанным фенотипом. Содержание этих клеток в промежуточных и неклассических моноцитах было достоверно выше, чем в кМо, и во всех субпопуляциях моноцитов практически двукратно превышало долю CCR2⁻CD206⁺ клеток. При этом повышенное содержание CD206-экспрессирующих клеток в третьем триместре в кМо было обусловлено увеличением моноцитов как со смешанным M1/M2 (CCR2⁺CD206⁺), так и M2 (CCR2⁻CD206⁺) фенотипом, тогда как в пМо — экспансией клеток преимущественно со смешанным фенотипом. Увеличение последних объясняет описанное нами в третьем триместре одновременное увеличение популяций CCR2⁺ и CD206⁺ клеток при их изолированной оценке (см. рис. 1). В свою очередь сниженное содержание CCR2⁺ клеток в кМо в 3-м триместре, судя по полученным данным, связано исключительно с меньшим содержанием моноцитов с M1-фенотипом (CCR2⁺CD206⁻). Другой особенностью пМо у беременных в третьем триместре является меньшее (на уровне выраженного тренда) содержание дабл-негативных (CCR2⁻CD206⁻) клеток, что может указывать на более интенсивную поляризацию этой субпопуляции моноцитов при гестации.

Обсуждение

Адаптация иммунной системы при беременности представляет строго контролируемый динамический процесс, который включает 3 иммунологических фазы, соответствующие триместрам беременности — воспалительную фазу (на этапе имплантации эмбриона и ранней плацентации); противовоспалительную фазу (на стадии быстрого роста плода) и снова воспалительную фазу (в период подготовки к родам) [14, 26]. В настоящей работе мы попытались оценить вовлеченность моноцитов в обеспечение динамичных изменений баланса между воспалительным и противовоспалительным статусом, исследуя фенотипические профили моноцитов в динамике беременности.

При оценке субпопуляций Мо с использованием стандартной классификации по экспрессии CD14/CD16-молекул [54], мы выявили повышенное содержание пМо (CD14⁺CD16⁺), наиболее выраженное во 2-м триместре беременности, что хорошо согласуется с данными литературы [16]. Однако это не отражало смены иммунологических фаз в ходе гестации. Поэтому для дальнейшего изучения про- и противовоспалительных профилей моноцитов мы исследовали экспрессию хемокинового рецептора CCR2 и скавенджер рецептора CD206 в качестве молекул, ассоциированных с M1/провоспалительным и M2/противовоспалительным фенотипом, соответственно. Присутствие M1- и M2-ассоциированных молекул на циркулирующих моноцитах и их связь с про- и противовоспалительным потенциалом макрофагов/моноцитов позволили охарактеризовать изменения M1/M2-баланса при многих патологиях — сахарном диабете, ревматоидном артрите, геморрагической лихорадке, атеросклерозе, раке [18, 21, 33, 50], однако баланс M1/M2-моноцитов в динамике гестации ранее не исследовался.

Оценка CCR2⁺ и CD206⁺ клеток в субпопуляциях классических, промежуточных и неклассических моноцитов в группе фертильных небеременных показала, что доля CCR2⁺ клеток была наибольшей в кМо, а максимальное содержание CD206⁺ клеток выявлялось в субпопуляции нМо. Учитывая, что кМо участвуют в индукции/поддержании воспалительной реакции, а нМо вовлечены в разрешение воспаления [27], полученные данные косвенно подтверждают принадлежность CCR2⁺ и CD206⁺ клеток к моноцитам с соответственно про- и противовоспалительным фенотипом.

Сравнение относительного содержания CCR2- и CD206-клеток в 4 группах, включающих небеременных и беременных, обследованных в 1-м, 2-м и 3-м триместрах, показало, что экс-

прессия CCR2 и CD206 в ходе гестации подвержена достоверным изменениям, которые судя по данным однофакторного дисперсионного анализа, происходят во всех субпопуляциях моноцитов с наибольшей выраженностью в кМо и пМо и сильнее проявляются в отношении экспрессии CD206. Связанные с гестацией изменения в целом проявлялись снижением экспрессии CCR2 и возрастанием экспрессии CD206 и свидетельствовали о смещении баланса в сторону моноцитов с M2-фенотипом. Эти изменения были наиболее выражены во 2-м триместре, проявляясь однотипно во всех субпопуляциях моноцитов снижением доли CCR2⁺ клеток и интенсивности экспрессии CCR2 (в сравнении с аналогичными показателями небеременных и беременных в 1-м триместре) и возрастанием CD206⁺ клеток (по сравнению с 1-м триместром), и обуславливали достоверное снижение соотношения CCR2⁺/CD206⁺ клеток во всех субпопуляциях Мо в сравнении с таковыми в 1-м триместре, а для классических и промежуточных Мо также по сравнению с небеременными, что подтверждало универсальный характер смещения M1/M2-баланса в сторону противовоспалительного профиля.

Согласно данным литературы, быстрый рост плода во 2-м триместре соответствует противовоспалительной фазе иммунной перестройки, необходимой для поддержания иммунологической толерантности и во многом опосредуется локальными механизмами, в том числе децидуальными M2-макрофагами [52]. В то же время изменения моноцитов при беременности описываются в ключе активированного статуса и усиления провоспалительной активности. На это указывает характерное для воспалительных заболеваний возрастание пМо [27], экспрессия активационных маркеров и возрастание в сыворотке растворимых рецепторов (CD14, CD163), а также повышенная продукция активных метаболитов кислорода и провоспалительных цитокинов [17, 40, 45]. Считается, что указанные изменения, являясь компенсаторной реакцией усиления врожденного иммунитета на фоне ослабления реакций адаптивного иммунитета, прогредиентно возрастают по мере развития беременности [32]. Вместе с тем рядом авторов отмечается снижение продукции моноцитами провоспалительных цитокинов [40], особенно после 1-го триместра беременности [53], толерогенный статус моноцитов [16] и повышенная экспрессия иммуносупрессивных факторов [29], что свидетельствует об усилении M2-фенотипа.

Полученные нами результаты указывают на то, что функциональная перестройка миелоидных клеток происходит не только на локальном, но и системном уровне. При этом нами впервые

показано, что во 2-м триместре беременности изменения фенотипических профилей в классических, промежуточных и неклассических моноцитах имеют однотипный характер, проявляясь уменьшением клеток с M1-фенотипом и одновременным возрастанием клеток с M2-фенотипом. В настоящем исследовании мы не оценивали внутриклеточную продукцию про- и противовоспалительных цитокинов в популяциях CCR2- и CD206-экспрессирующих моноцитов, что является ограничением этого исследования. Тем не менее, согласно данным литературы, CD206-экспрессирующие моноциты отличаются от CCR2⁺ клеток более низкой продукцией TNF α и IL-6, большей фагоцитарной активностью и меньшей способностью к трансэндотелиальной миграции [19], а возрастание экспрессии CCR2 в кМо при старении ассоциировано со снижением экспрессии аргиназы и коингибиторных молекул [9]. Кроме того, недавно нами показано, что моноциты беременных характеризуются повышенной экспрессией тирозинкиназы Мер и аргиназы-1 [1], т. е. маркеров, которые являются ключевыми медиаторами и драйверами противовоспалительной и иммуносупрессорной активности миелоидных клеток [8, 37, 47]. Причем эти молекулы причастны к подавлению антигенпрезентирующей (в частности аллостимуляторной) активности M2-клеток [2]. Указанные факты позволяют рассматривать CCR2⁺ и CD206⁺ клетки как моноциты с про- и противовоспалительным фенотипами и интерпретировать выявленные нами изменения в экспрессии CCR2 и CD206 как свидетельство изменений M1/M2-баланса в сторону усиления противовоспалительного профиля моноцитов.

Важно отметить, что в отличие от 2-го триместра, сопряженного с формированием иммунологической толерантности, 1-я и 3-я иммунологические фазы являются воспалительными процессами [14]. Поэтому оценка моноцитов в эти сроки позволяет проанализировать значимость изменений M1/M2-баланса в формировании воспалительного статуса. Согласно полученным нами данным, усиление провоспалительного потенциала в 1-м триместре было рестриктировано минорной субпопуляцией нМо, в которой отмечалось выраженное усиление экспрессии CCR2 (MFI) и снижение относительного содержания CD206⁺ клеток. В то же время в преобладающих по численности кМо и субпопуляции пМо регистрировалось достоверное возрастание экспрессии CD206 (MFI), свидетельствующее о раннем начале формирования противовоспалительного фенотипа. Т. е., если в нМо происходило смещение в сторону усиления M1-фенотипа, то в кМо — в сторону M2-фенотипа. Разнонаправленные изменения про- и противовоспалительного про-

филей в различных субпопуляциях Мо описано в литературе при старении, когда снижение экспрессии M2-ассоциированной молекулы CD163 в кМо сочетается с одновременным увеличением CD163⁺ клеток в нМо [13]. В 1-м триместре беременности наблюдается иная ситуация — усиление M1-фенотипа в нМо и M2-фенотипа в классических и промежуточных моноцитах, что может быть связано с выполнением одновременно двух задач — поддержанием умеренно-выраженного воспалительного статуса, что опосредуется нМо, и ограничением избыточного воспалительного ответа, что контролируется кМо.

В настоящей работе мы также показали, что смещение M1/M2-баланса в сторону провоспалительного фенотипа в 3-м триместре (по сравнению со 2-м триместром) проявлялось в кМо — снижением экспрессии CD206, а в пМо и нМо — возрастанием экспрессии CCR2. При этом доля CD206⁺ кМо оставалась повышенной, а содержание CCR2⁺ пМо и нМо восстанавливалось до уровня небеременных. Усиление экспрессии CCR2⁺ в пМо и нМо поддерживает гипотезу о большей детерминированности CD16⁺ неклассических моноцитов к поляризации в сторону провоспалительного фенотипа. Выявленное нами усиление провоспалительного потенциала моноцитов в 3-м триместре согласуется с данными других авторов, продемонстрировавших возрастание стимулированной продукции провоспалительных цитокинов, в частности IL-12 [40], и экспрессии провоспалительных генов в моноцитах в конце беременности [10].

Изменения M1/M2-баланса в ходе беременности охарактеризованы на локальном уровне на границе «мать — плод». В период имплантации макрофаги имеют M1-фенотип, а после внедрения трофобласта в строму матки приобретают M1/M2-фенотип, который сохраняется до завершения плацентации (начало 2-го триместра), когда сосудистая сеть матки подвергается ремоделированию с целью установления адекватного кровоснабжения плаценты и плода. Далее (2-й триместр) происходит смещение баланса в сторону M2-макрофагов, предотвращающих отторжение плода в период его быстрого роста. Перед родами (3-й триместр) макрофаги снова приобретают M1-фенотип и играют ключевую роль в поддержании воспалительного процесса, способствующего сокращению матки, изгнанию плода, отторжению плаценты и инволюции матки [52].

Об ассоциированных с беременностью системных изменениях M1/M2-баланса моноцитов известно гораздо меньше. Так, показано, что экспрессия CCR2 на моноцитах снижается при беременности [6], однако в третьем триместре значительно увеличивается в сравнении с первым и вторым триместром [51], что в целом согласуется

с нашими данными. Bjorkander S. и соавт. выявили сниженную экспрессию CCR2 в субпопуляции кМо в 3-м триместре [7], что также не противоречит нашим данным, согласно которым, несмотря на более высокое содержание CCR2⁺ клеток в эти сроки по сравнению со 2-м триместром, доля CCR2⁺ кМо оставалась сниженной в сравнении с небеременными. В то же время Pflitsch C. и соавт. отмечает повышенное содержание CCR2⁺ пМо во 2-м и 3-м триместрах в сравнении с группой контроля, что может объясняться различиями в сроках гестации и использованием в качестве контроля доноров женского и мужского пола [40].

Относительно экспрессии M2-ассоциированных маркеров, T.I. Alahakoon и соавт. выявили возрастание CD163⁺ нМо в 3-м триместре, коррелирующее со сроком гестации [4]. Повышенное содержание клеток, экспрессирующих CD163⁺ и CD206⁺ в 3-м триместре описано также в субпопуляции кМо [23]. Поскольку маннозный рецептор CD206 вовлечен в антигенную презентацию и модуляцию клеточного иммунитета [39], возрастание CD206⁺ Мо может являться компенсаторной реакцией, направленной на сдерживание воспалительного ответа в 3-м триместре [23]. Нами впервые описаны изменения экспрессии данного маркера в динамике беременности и показано, что однотипное усиление экспрессии CD206 во всех субпопуляциях моноцитов характерно для 2-го триместра. В то же время в 1-м и 3-м триместрах эти изменения в кМо и пМ/нМо носят разнонаправленный характер. Так, возрастание MFI CD206 в кМо и пМо в 1-м триместре сочетается со снижением CD206⁺ клеток в нМо, а снижение доли CD206⁺ кМо в 3-м триместре сочетается с возрастанием содержания CD206⁺ клеток в промежуточных и неклассических Мо. Кроме того, сравнение беременных с различными сроками гестации показало, что содержание CD206⁺ кМо в 3-м триместре становится ниже, чем во 2-м триместре, свидетельствуя об ослаблении противовоспалительного потенциала кМо. Схожие данные, свидетельствующие об ослаблении противовоспалительного и усилении провоспалительного профиля моноцитов в конце беременности получены при оценке метаболизма моноцитов [41].

Важно отметить, что возрастание доли CD206⁺ пМо/нМо в 3-м триместре сочеталось с увеличением CCR2⁺ клеток, что в определенной степени связано с увеличением пула Мо, коэкспрессирующих CCR2 и CD206. Действительно, доля дабл-позитивных пМо в 3-м триместре достоверно превышала аналогичный показатель у небеременных. Данные о функциональной активности моноцитов со смешанным M1/M2-фенотипом неоднозначны. Ряд авторов рассматривает та-

кие клетки, как предшественники поляризованных моноцитов, способных приобретать M1- и M2-фенотипы, тогда как другие полагают, что эти клетки обладают преимущественно провоспалительным фенотипом [20]. Показано, что содержание моноцитов со смешанным фенотипом возрастает при инфекционно-воспалительных и аутоиммунных заболеваниях и коррелирует с тяжестью заболевания [24, 34, 36, 46]. Появление моноцитов с M1/M2-фенотипом при беременности может быть обусловлено влиянием клеток трофобласта, которые как показали исследования *in vitro*, способны индуцировать дифференцировку CD14⁺ моноцитов в клетки со смешанным (CD14⁺CD206^{high}CD86^{low}) фенотипом [5]. В любом случае, выяснение функциональной активности моноцитов со смешанным фенотипом требует дальнейших исследований.

Заключение

В ходе гестации изменения в экспрессии M1-ассоциированной молекулы CCR2 и M2-ассоциированной молекулы CD206 регистрируются во всех субпопуляциях моноцитов и в срав-

нении с небеременными проявляются в целом снижением экспрессии CCR2 и возрастанием экспрессии CD206, свидетельствуя о смещении M1/M2-баланса в сторону моноцитов с противовоспалительным фенотипом. Эти изменения выявляются уже в 1-м триместре, достигают максимума и регистрируются во всех субпопуляциях моноцитов во 2-м триместре и ослабевают в 3-м триместре. Указанные изменения в первом и третьем триместрах сочетаются с усилением провоспалительного профиля, который в первом триместре рестриктирован субпопуляцией нМо, а в третьем триместре опосредуется с участием пМо и нМо, проявляясь усилением экспрессии CCR2, в том числе за счет возрастания клеток, коэкспрессирующих CCR2 и CD206. Полученные данные свидетельствуют о вовлеченности моноцитов в регуляцию баланса про- и противовоспалительного статуса в динамике гестации, с преобладающим формированием M2-профиля в классических моноцитах и усилением в первом и третьем триместрах M1-провоспалительного профиля в субпопуляциях промежуточных и неклассических моноцитов.

Список литературы / References

1. Шевела Е.Я., Бухтуева Н.Г., Тихонова М.А., Сахно Л.В., Пасман Н.М., Черных Е.Р. Экспрессия аргиназы 1 и тирозинкиназы Mer моноцитами крови в динамике физиологической беременности // Медицинская иммунология. 2023. Т. 25, № 3. С. 507-512. [Shevela E.Ya., Bukhtueva N.G., Tikhonova M.A., Sakhno L.V., Pasman N.M., Chernykh E.R. Expression of arginase 1 and tyrosine kinase Mer by blood monocytes in the dynamics of physiological pregnancy. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2023, Vol. 25, no. 3, pp. 507-512. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-EOA-2728.
2. Шевела Е.Я., Сахно Л.В., Максимова А.А., Тихонова М.А., Останин А.А., Черных Е.Р. Экспрессия Arg1 и MerTK макрофагами человека, активированными M2-поляризирующими стимулами, и их роль в детерминировании низкой аллостимуляторной активности // Иммунология, 2022. Т. 43, № 5. С. 515-524. [Shevela E.Ya., Sakhno L.V., Maksimova A.A., Tikhonova M.A., Ostanin A.A., Chernykh E.R. Expression of Arg1 and MerTK by human macrophages activated by M2-polarizing stimuli and their role in determining low allostimulatory activity. *Immunologiya = Immunology*, 2022, Vol. 43, no. 5, pp. 515-524. (In Russ.)]
3. Abu-Raya B., Michalski C., Sadarangani M., Lavoie P.M. Maternal immunological adaptation during normal pregnancy. *Front Immunol.*, 2020, Vol. 11, 575197. doi: 10.3389/fimmu.2020.575197.
4. Alahakoon T.I., Medbury H., Williams H., Fewings N., Wang X.M., Lee V.W. Distribution of monocyte subsets and polarization in preeclampsia and intrauterine fetal growth restriction. *J. Obstet. Gynaecol. Res.*, 2018, Vol. 44, no. 12, pp. 2135-2148.
5. Aldo P.B., Racicot K., Craviero V., Guller S., Romero R., Mor G. Trophoblast induces monocytes differentiation in to CD14⁺/CD16⁺ macrophages. *Am. J. Reprod. Immunol.*, 2014, Vol. 72, no. 3, pp. 270-284.
6. Al Ofi E., Coffelt S. Monocyte subpopulations in pregnancy complicated by pre-eclampsia demonstrate a pro-inflammatory phenotype and altered angiogenesis, chemotaxis and migration. *ADC Fetal. Neonatal.*, 2012, Vol. 97, Suppl. 1. doi: 10.1136/fetalneonatal-2012-301809.7.
7. Bjorkander S., Heidari-Hamedani G., Bremme K., Gunnarsson I., Holmlund U. Peripheral monocytes expression of the chemokines receptors CCR2, CCR5 and CXCR3 is altered at parturition in healthy women and in women with systemic lupus erythematosus. *Scand. J. Immunol.*, 2013, Vol. 77, no. 3, pp. 200-212.
8. Cai B., Kasikara C., Doran A.C., Ramakrishnan R., Birge R.B., Tabas I. MerTK signaling in macrophages promotes the synthesis of inflammation resolution mediators by suppressing CaMKII activity. *Sci Signal.*, 2018, Vol. 11, aar 3721. doi: 10.1126/scisignal.aar3721.

9. Cao Y., Fan Y., Li F., Hao Y., Kong Y., Chen C., Hao X., Han D., Li G., Wang Z., Song C., Han J., Zeng H. Phenotypic and functional alterations of monocyte subsets with aging. *Immun. Ageing*, 2022, Vol. 19, 63. doi: 10.1186/s12979-022-00321-9.
10. Chen D., Wang W., Wu L., Liang L., Wang S., Cheng Y., Zhang T., Chai C., Luo Q., Sun C., Zhao W., Lv Z., Gao Y., Wu X., Sun N., Zhang Y., Zhang J., Chen Y., Tong J., Wang X., Bai Y., Sun C., Jin X., Niu J. Single-cell atlas of peripheral blood mononuclear cells from pregnant women. *Clin Transl Med.*, 2022, Vol. 12, no. 5, e821. doi: 10.1002/ctm2.821.
11. Cormican S., Griffin M.D. Human monocytes subset distinctions and function: insights from gene expression analysis. *Front. Immunol.*, 2020, Vol. 11, 1070. doi: 10.3389/fimmu.2020.01070.
12. Cornwell W.D., Kim V., Fan X., Vega M.E., Ramsey F.V., Criner G.J., Rogers T.J. Activation and polarization of circulating monocytes in severe chronic obstructive pulmonary disease. *BMC Pulm. Med.*, 2018, Vol. 18, 101. doi: 10.1186/s12890-018-0664-y.
13. Costantini A., Viola N., Berretta A., Galeazzi R., Matakchione G., Sabbatinelli J., Storci G., De Matteis S., Butini L., Rippo M.R., Procopio A.D., Caraceni D., Antonicelli R., Olivieri F., Bonafè M. Age-related M1/M2 phenotype changes in circulating monocytes from healthy/unhealthy individuals. *Aging*, 2018, Vol. 10, no. 6, pp. 1268-1280.
14. Dutta S., Sengupta P. Defining pregnancy phases with cytokine shift. *J. Pregnancy Reprod.*, 2017, Vol. 1, no. 4, pp. 1-3.
15. Evans H.G., Gullick N.J., Kelly S., Pitzalis C., Lord G.M., Kirkham B.W., Taams L.S. In vivo activated monocytes from the site of inflammation in humans specifically promote Th17 responses. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 2009, Vol. 106, pp. 6232-6237.
16. Faas M.M., de Vos P. Maternal monocytes in pregnancy and preeclampsia in humans and in rats. *J. Reprod. Immunol.*, 2017, Vol. 119, pp. 91-97.
17. Faas M.M., Spaans F., de Vos P. Monocytes and macrophages in pregnancy and pre-eclampsia. *Front. Immunol.*, 2014, Vol. 5, 298. doi: 10.3389/fimmu.2014.00298.
18. Fadini G.P., Simoni F., Cappellari R., Vitturi N., Galasso S., de Kreutzenberg S.V., Previato L., Avogaro A. Pro-inflammatory monocyte-macrophage polarization imbalance in human hypercholesterolemia and atherosclerosis. *Atherosclerosis*, 2014, Vol. 237, no. 2, pp. 805-808.
19. Fadini G.P., de Kreutzenberg S.V., Boscaro E., Albiero M., Cappellari R., Kränkel N., Landmesser U., Toniolo A., Bolego C., Cignarella A., Seeger F., Dimmeler S., Zeiher A., Agostini C., Avogaro A. An unbalanced monocytes polarization in peripheral blood and bone marrow of patients with type 2 diabetes has an impact on microangiopathy. *Diabetologia*, 2013, Vol. 56, no. 8, pp. 1856-1866.
20. Fernández-Regueras M., Carbonell C., Saleté-Granado D., García J-L., Gragera M., Pérez-Nieto M.-Á., Morán-Plata F.-J., Mayado A., Torres J.-L., Corchete L.-A., Usategui-Martín R., Bueno-Martínez E., Rojas-Pirela M., Sabio G., González-Sarmiento R., Orfao A., Laso F.-J., Almeida J., Marcos M. Predominantly pro-inflammatory phenotype with mixed M1/M2 polarization of peripheral blood classical monocytes and monocyte-derived macrophages among patients with excessive ethanol intake. *Antioxidants*, 2023, Vol. 12, 1708. doi: 10.3390/antiox12091708.
21. Fukui S., Iwamoto N., Takatani A., Igawa T., Shimizu T., Umeda M., Nishino A., Horai Y., Hirai Y., Koga T., Kawashiri S.-Y., Tamai M., Ichinose K., Nakamura H., Origuchi T., Masuyama R., Kosai K., Yanagihara K., Kawakami A. M1 and M2 monocytes in rheumatoid arthritis: a contribution of imbalance of M1/M2 monocytes to osteoclastogenesis. *Front. Immunol.*, 2018, Vol. 8, 1958. doi: 10.3389/fimmu.2017.01958.
22. Germain S.J., Sacks G.P., Sooranna S.R., Sargent I.L., Redman C.W. Systemic inflammatory priming in normal pregnancy and preeclampsia: the role of circulating syncytiotrophoblast microparticles. *J. Immunol.*, 2007, Vol. 178, no. 9, pp. 5949-5956.
23. Gong F., Wang J., Lu N., Wang J., Wang J., Shi X., Cui M., Cui L. The imbalance of circulating monocyte subgroups with a higher proportion of the CD14⁺CD16⁺CD163⁺ phenotype in patients with preeclampsia. *Immunol. Lett.*, 2023, Vol. 253, pp. 1-7.
24. Hou J., Zhang M., Ding Y., Wang X., Li T., Gao P., Jiang Y. Circulating CD14⁺CD163⁺CD206⁺ M2 monocytes are increased in patients with early stage of idiopathic membranous nephropathy. *Mediators Inflamm.*, 2018, Vol. 2018, 5270657. doi: 10.1155/2018/5270657.
25. Italiani P., Boraschi D. From monocytes to M1/M2 macrophages: phenotypical vs functional differentiation. *Front. Immunol.*, 2014, Vol. 5, 514. doi: 10.3389/fimmu.2014.00514.
26. Jarmund A.H., Giskeodegard G.F., Ryssdal M., Steinkjer B., Stokkeland L.M.T., Madssen T.S., Stafne S.N., Stridsklev S., Moholdt T., Heimstad R., Vanky E., Iversen A.-C. Cytokine patterns in maternal serum from first trimester to term and beyond. *Front. Immunol.*, 2021, Vol. 12, 752660. doi: 10.3389/fimmu.2021.752660.
27. Kapellos T.S., Bonaguro L., Gemünd I., Reusch N., Saglam A., Hinkley E.R., Schultze J.L. Human monocyte subsets and phenotypes in major chronic inflammatory diseases. *Front. Immunol.*, 2019, Vol. 10, 2035. doi: 10.3389/fimmu.2019.02035.
28. Kiss M., Caro A.A., Raes G., Laoui D. Systemic reprogramming of monocytes in cancer. *Front. Oncol.*, 2020, Vol. 10, 1399. doi: 10.3389/fonc.2020.01399.

29. Koldehoff M., Cierna B., Steckel N.K., Beelen D.W., Elmaagacli A.H. Maternal molecular features and gene profiling of monocytes during first trimester pregnancy. *J. Reprod. Immunol.*, 2013, Vol. 99, pp. 62-68.
30. Lampe R., Kover Á., Szucs S., Pal L., Arnyas E., Adany R., Poka R. Phagocytic index of neutrophils granulocytes and monocytes in healthy and preeclamptic pregnancy. *J. Reprod. Immunol.*, 2015, Vol. 107, pp. 26-30.
31. Lehman N., Kowalska W., Zarobkiewicz M., Mazurek M., Mrozowska K., Bojarska-Junak A., Rola R. Pro- vs anti-inflammatory features of monocyte subsets in glioma patients. *Int. J. Mol. Sci.*, 2023, Vol. 24, no. 3, 1879. doi: 10.3390/ijms24031879.
32. Liu X., Zhu L., Huang Z., Li Z., Duan R., Li H., Xie L., Chen X., Ding W., Chen B., Gao Y., Su J., Wang X., Su W. A dynamic peripheral immune landscape during human pregnancy. *Fundamental Res.*, 2022, Vol. 15, 44. doi: 10.1016/j.fmre.2022.06.011.
33. Li X., Du N., Xu G., Zhang P., Dang R., Jiang Y., Zhang K. Expression of CD206 and CD163 on intermediate CD14⁺CD16⁺ monocytes are increased in hemorrhagic fever with renal syndrome and are correlated with disease severity. *Virus Res.*, 2018, Vol. 253, pp. 92-102.
34. Matic S., Popovic S., Djurdjevic P., Todorovic D., Djordjevic N., Mijailovic Z., Sazdanovic P., Milovanovic D., Zecevic D.R., Petrovic M., Sazdanovic M., Zornic N., Vukicevic V., Petrovic I., Matic S., Vukicevic M.K., Baskic D. SARS-CoV-2 infection induces mixed M1/M2 phenotype in circulating monocytes and alterations in both dendritic cell and monocytes subsets. *PLoS One*, 2020, Vol. 15, no. 12, e0241097. doi: 10.1371/journal.pone.0241097.
35. Min D., Brooks B., Wong J., Aamidor S., Seehoo R., Sutanto S., Harrisberg B., Yue D.K., Twigg S.M., McLennan S.V. Monocyte CD163 is altered in association with diabetic complications: possible protective role. *J. Leukoc. Biol.*, 2016, Vol. 100, no. 6, pp. 1375-1383.
36. Mohamed M.E., Gamal R.M., El-Mokhtar M.A., Hassan A.T., Abozaid H.S.M., Ghandour A.M., Ismail S.A.A., Yousef H.A., El-Hakeim E.H., Makarem Y.S., Awad A.A. Peripheral cells from patients with systemic sclerosis disease co-expressing M1 and M2 monocyte/macrophage surface markers: relation to the degree of skin involvement. *Hum. Immunol.*, 2021, Vol. 82, no. 9, pp. 634-639.
37. Munder M. Arginase: an emerging key player in the mammalian immune system. *Brit. J. Pharmacol.*, 2009, Vol. 158, pp. 638-651.
38. Murray P.J. Immune regulation by monocytes. *Semin. Immunol.*, 2018, Vol. 35, pp. 12-18.
39. Nielsen M.C., Hvidbjerg Gantzel R., Claria J., Trebicka J., Moller H.J., Gronbak H. Macrophage activation markers, CD163 and CD206, in acute-on-chronic liver failure. *Cells*, 2020, Vol. 9, 1175. doi: 10.3390/cells9051175.
40. Pflichtsch C., Feldmann C.N., Richert L., Hagen S., Diemert A., Goletzke J., Hecher K., Jazbutyte V., Renné T., Arck P.C., Altfeld M., Ziegler S. In-depth characterization of monocytes subsets during the course of healthy pregnancy. *J. Reprod. Immunol.*, 2020, Vol. 141, 103151. doi: 10.1016/j.jri.2020.103151.
41. Rees A., Jenkins B.J., Angelini R., Davies L.C., Cronin J.G., Jones N., Thornton C.A. Immunometabolic adaptation in monocytes underpins functional changes during pregnancy. *Lancet*, 2023. doi: 10.2139/ssrn.4570469.
42. Sacks G.P., Redman C.W., Sargent I.L. Monocytes are primed to produce the Th1 type cytokine IL-12 in normal human pregnancy: an intracellular flow cytometric analysis of peripheral blood mononuclear cells. *Clin. Exp. Immunol.*, 2003, Vol. 131, no. 3, pp. 490-497.
43. Sharma S., Rodrigues P.R.S., Zaher S., Davies L.C., Ghazal P. Immune-metabolic adaptations in pregnancy: A potential stepping-stone to sepsis. *EBioMedicine*, 2022, Vol. 86, 104337. doi: 10.1016/j.ebiom.2022.104337.
44. Spaans F., Vos P.D., Bakker W.W., van Goor H., Faas M.M. Danger signals from ATP and adenosine in pregnancy and preeclampsia. *Hypertension*, 2014, Vol. 63, no. 6, pp. 1154-1160.
45. Sureshchandra S., Marshall N.E., Mendoza N., Jankeel A., Zulu M.Z., Messaoudi I. Functional and genomic adaptations of blood monocytes to pregravid obesity during pregnancy. *iScience*, 2021, Vol. 24, no. 6, 102690. doi: 10.1016/j.isci.2021.102690.
46. Trombetta A.C., Soldano S., Contini P., Tomatis V., Ruaro B., Paolino S., Brizzolara R., Montagna P., Sulli A., Pizzorni C., Smith V., Cutolo M. A circulating cell population showing both M1 and M2 monocyte/macrophage surface markers characterizes systemic sclerosis patients with lung involvement. *Respir. Res.*, 2018, Vol. 19, 186. doi:10.1186/s12931-018-0891-z.
47. Vago J.P., Amaral F.A., van de Loo F.A.J. Resolving inflammation by TAM receptor activation. *Pharmacol. Ther.*, 2021, Vol. 227, 107893. doi: 10.1016/j.pharmthera.2021.107893.
48. van Nieuwenhoven A.L.V., Bouman A., Moes H., Heineman M.J., de Leij L.F.M.H., Santema J., Faas M.M. Endotoxin-induced cytokine production of monocytes of third-trimester pregnant women compared with women in the follicular phase of the menstrual cycle. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 2003, Vol. 188, no. 4, pp. 1073-1077.
49. Weber M.S., Prod'homme T., Youssef S., Dunn S.E., Rundle C.D., Lee L., Patarroyo J.C., Stüve O., Sobel R.A., Steinman L., Zamvil S.S. Type II monocytes modulate Tcell-mediated central nervous system autoimmune disease. *Nat. Med.*, 2007, Vol. 13, no. 8, pp. 935-943.
50. Zhang B., Cao M., He Y., Liu Y., Zhang G., Yang C., Du Y., Xu J., Hu J., Gao F. Increased circulating M2-like monocytes in patients with breast cancer. *Tumour Biol.*, 2017, Vol. 39, no. 6, 1010428317711571. doi: 10.1177/1010428317711571.

51. Zhang J., Shynlova O., Sabra S., Bang A., Briollais L., Lye S.J. Immunophenotyping and activation status of maternal peripheral blood leukocytes during pregnancy and labour, both term and preterm. *J. Cell. Mol. Med.*, 2017, Vol. 21, no. 10, pp. 2386-2402.
52. Zhang Y., Liu Z., Sun H. Fetal-maternal interactions during pregnancy: a 'three-in-one' perspective. *Front. Immunol.*, 2023, Vol. 14, 1198430. doi: 10.3389/fimmu.2023.1198430.
53. Ziegler S.M., Feldmann C.N., Hagen S.H., Richert L., Barkhausen T., Goletzke J., Jazbutyte V., Martrus G., Salzberger W., Renné T., Hecher K., Diemert A., Arck P.C., Altfeld M. Innate immune responses to toll-like receptor stimulation are altered during the course of pregnancy. *J. Reprod. Immunol.*, 2018, Vol. 128, pp. 30-37.
54. Ziegler-Heitbrock L., Ancuta P., Crowe S., Dalod M., Grau V., Hart D.N., Leenen P.J.M., Liu Y.-J., MacPherson G., Randolph G.J., Scherberich J., Schmitz J., Shortman K., Sozzani S., Strobl H., Zembala M., Austyn J.M., Lutz M.B. Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. *Blood*, 2010, Vol. 116, pp. e74-e80.

Авторы:

Бухтеева Н.Г. — врач — акушер-гинеколог акушерского
наблюдательного отделения № 1 ГБУЗ НСО «Городская
больница № 1», г. Новосибирск, Россия

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

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

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

Authors:

Bukhtueva N.G., Obstetrician-Gynecologist, Obstetric
Observational Department No. 1, City Hospital No. 1,
Novosibirsk, Russian Federation

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

Shevela E. Ya., PhD, MD (Medicine), Leading Research
Associate, Laboratory of Cellular Immunotherapy, Research
Institute of Fundamental and Clinical Immunology,
Novosibirsk, Russian Federation

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

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

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

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

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

Ostanin A.A., PhD, MD (Medicine), Professor, Chief Research Associate, Laboratory of Cellular Immunotherapy, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

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

Поступила 12.04.2024
Отправлена на доработку 23.05.2024
Принята к печати 14.09.2024

Received 12.04.2024
Revision received 23.05.2024
Accepted 14.09.2024

УРОВЕНЬ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ *ENTPD1*, *NT5E*, *ADORA2A*, *FOXP3* И *RORγ* В ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ БОЛЬНЫХ ЯЗВЕННЫМ КОЛИТОМ

Аторин Д.А.¹, Жулай Г.А.¹, Топчиева Л.В.¹, Курбатова И.В.¹,
Дуданова О.П.²

¹ Институт биологии — обособленное подразделение ФГБУН «Федеральный исследовательский центр «Карельский научный центр Российской академии наук», г. Петрозаводск, Республика Карелия, Россия

² ФГБОУ ВО «Петрозаводский государственный университет», г. Петрозаводск, Республика Карелия, Россия

Резюме. Развитие язвенного колита (ЯК) сопровождается активацией пуринаргического сигнального пути и повышением уровня внеклеточного аденозина. Аденозин участвует в регуляции баланса провоспалительных Т-хелперов типа 17 (Th17) и иммуносупрессорных регуляторных Т-клеток (Treg), нарушение которого, как считается, является одним из основных иммунных факторов данного заболевания. Тем не менее вопрос о том, как изменяется экспрессия генов, кодирующих транскрипционные факторы Treg-клеток и Th17 (*FOXP3* и *RORγ* соответственно), и генов, кодирующих участников CD39/CD73/A2AR сигнального пути (*ENTPD1*, *NT5E*, *ADORA2A*), в периферической крови больных ЯК малоизучен. Цель исследования — изучить уровень экспрессии генов *ENTPD1*, *NT5E*, *ADORA2A*, *FOXP3* и *RORγ* при язвенном колите. Обследован 41 человек, из которых 23 пациента с диагнозом «ЯК» (18 пациентов, находящихся на базисной терапии производными 5-АСК (группа ЯК1) и 5 пациентов, принимающих преднизолон (группа (ЯК2)), 18 условно здоровых людей. Тотальную РНК выделяли из лейкоцитов периферической крови (ЛПК). Уровень транскриптов генов изучали методом ПЦР в режиме реального времени. Содержание мРНК гена *ENTPD1* у больных ЯК, находящихся на базисной терапии производными 5-АСК, было выше, чем у здоровых людей ($p = 0,0045$). Уровень транскриптов гена *NT5E* и *ADORA2A* в ЛПК пациентов группы ЯК1 оказался выше, чем у пациентов из группы ЯК2 ($p = 0,0486$ и $p = 0,0289$ соответственно) и здоровых индивидов ($p = 0,0007$ и $p < 0,001$ соответственно). У группы пациентов ЯК1 содержание мРНК гена *FOXP3* в ЛПК было выше, чем у условно здоровых людей ($p = 0,0093$). Уровень экспрессии гена *RORγ* в ЛПК пациентов из групп ЯК1 и ЯК2 был выше, чем у здоровых индивидов ($p = 0,0005$). В ЛПК больных ЯК, находящихся на базисной терапии, наблюдалось повышение уровня экспрессии генов *FOXP3* и *RORγ*, представляющих собой транскрипционные факторы Treg- и Th17-клеток соответственно, тогда как уровень экспрессии

Адрес для переписки:

Аторин Даниил Алексеевич
Институт биологии
185003, Россия, Республика Карелия,
г. Петрозаводск, пр. А. Невского, 50.
Тел.: 8 (8142) 57-18-79.
Факс: 8 (8142) 76-98-10.
E-mail: atorin98@mail.ru

Address for correspondence:

Dannil A. Atorin
Institute of Biology
50 A. Nevsky Ave
Petrozavodsk, Republic of Karelia
185003 Russian Federation
Phone: +7 (8142) 57-18-79.
Fax: +7 (8142) 76-98-10.
E-mail: atorin98@mail.ru

Образец цитирования:

Д.А. Аторин, Г.А. Жулай, Л.В. Топчиева, И.В. Курбатова, О.П. Дуданова «Уровень экспрессии генов *ENTPD1*, *NT5E*, *ADORA2A*, *FOXP3* и *RORγ* в периферической крови больных язвенным колитом» // Медицинская иммунология, 2025. Т. 27, № 1. С. 197-206. doi: 10.15789/1563-0625-ENA-2976

© Аторин Д.А. и соавт., 2025

Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

D.A. Atorin, G.A. Zhulai, L.V. Topchieva, I.V. Kurbatova, O.P. Dudanova «*ENTPD1*, *NT5E*, *ADORA2A*, *FOXP3* and *RORγ* gene expression in peripheral blood of patients with ulcerative colitis», *Medical Immunology (Russia)/ Meditsinskaya Immunologiya*, 2025, Vol. 27, no. 1, pp. 197-206.

doi: 10.15789/1563-0625-ENA-2976

© Atorin D.A. et al., 2025

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

DOI: 10.15789/1563-0625-ENA-2976

этих генов у больных ЯК на преднизолоне не отличался от контроля. В контрольной группе и группе ЯК1 выявлены корреляционные связи между уровнем экспрессии некоторых из исследуемых генов.

Ключевые слова: язвенный колит, воспаление, пуринаргический сигнальный путь, аденозин, *FoxP3*, *ROR γ*

ENTPD1, NT5E, ADORA2A, FOXP3 AND ROR γ GENE EXPRESSION IN PERIPHERAL BLOOD OF PATIENTS WITH ULCERATIVE COLITIS

**Atorin D.A.^a, Zhulai G.A.^a, Topchieva L.V.^a, Kurbatova I.V.^a,
Dudanov O.P.^b**

^a Institute of Biology, Karelian Research Centre, Russian Academy of Sciences, Petrozavodsk, Republic of Karelia, Russian Federation

^b Petrozavodsk State University, Petrozavodsk, Republic of Karelia, Russian Federation

Abstract. Development of ulcerative colitis (UC) is accompanied by activation of the purinergic signaling pathway and an increased level of extracellular adenosine. Adenosine is involved in regulating the balance of pro-inflammatory T-helper type 17 (Th17) cells and immunosuppressive regulatory T-cells (Treg). Their disturbance is believed to be one of the main immune factors causing this disease. However, expression of genes encoding Treg cell and Th17 transcription factors (*FOXP3* and *ROR γ* , respectively) and genes encoding members of the CD39/CD73/A2AR signaling pathway (*ENTPD1*, *NT5E*, *ADORA2A*) in peripheral blood has not been studied enough. The purpose of our study was to evaluate the expression levels of *ENTPD1*, *NT5E*, *ADORA2A*, *FOXP3* and *ROR γ* genes in ulcerative colitis (UC). Thirty-eight patients were examined including 20 patients diagnosed with UC (15 patients on a basic therapy with 5-ASA derivatives, UC1 group); 5 patients treated with Prednisone (group UC2), and 18 apparently healthy people. Total RNA was isolated from peripheral blood leukocytes (PBLs). The levels of gene transcripts were studied by real-time PCR technique. The *ENTPD1* gene mRNA content in UC patients on a basic therapy with 5-ASA derivatives was higher than in healthy people ($p = 0.0045$). The levels of *NT5E* and *ADORA2A* transcripts in the PBLs of patients in the UC1 group were higher than those of patients in the UC2 group ($p = 0.0486$ and $p = 0.0289$, respectively) and healthy individuals ($p = 0.0007$ and $p < 0.001$, respectively). The mRNA content of *FOXP3* gene in PBLs of the UC1 group of patients was higher than in conditionally healthy individuals ($p = 0.0093$). The level of *ROR γ* gene expression in PBLs of the patients from UC1 and UC2 groups was higher than in healthy individuals ($p = 0.0005$). Increased levels of *FOXP3* and *ROR γ* gene expression (the transcription factors of Treg and Th17 cells, respectively), were observed in PBLs of UC patients on baseline therapy, whereas expression levels of these genes in prednisolone-treated UC patients did not differ from controls. Correlations between the expression levels of some genes under study were revealed in control persons and in the UC1 group.

Keywords: ulcerative colitis, inflammation, purinergic signaling pathway, adenosine, *FoxP3*, *ROR γ*

Исследования проводились в рамках выполнения НИР (FMEN-2022-0009) ИБ КарНЦ РАН на научном оборудовании Центра коллективного пользования Федерального исследовательского центра «Карельский научный центр Российской академии наук».

Введение

Язвенный колит (ЯК) — хроническое воспалительное аутоиммунное заболевание кишечника [22]. В последнее время большое внимание при изучении патогенеза данного заболевания уделяется внеклеточному аденозину как основному

компоненту пуринаргического сигнального пути в иммунных клетках, регулирующего процессы воспаления. Повышенное содержание аденозина характерно для многих иммунновоспалительных заболеваний, в том числе и при ЯК [10]. Однако его роль в патогенезе данного заболевания изучена недостаточно [21]. Внеклеточный аденозин модулирует функции клеток адаптивного и врожденного иммунитета, его уровень имеет решающее значение для поддержания иммунного гомеостаза [3]. Известно, что уровень аденозина связан с иммуносупрессорной функцией Т-клеток, поляризацией макрофагов M1 и M2, дифференциров-

кой CD8⁺T-лимфоцитов [3, 26]. Таким образом, пуринергический сигнальный путь регулирует уровень системного и местного воспаления, а нарушение баланса АТФ/аденозин может быть ключевым фактором дисрегуляции иммунного ответа при воспалительных заболеваниях кишечника (ВЗК), и в частности ЯК [24]. Образование аденозина происходит внутри и внеклеточно за счет активности ряда ферментов, участвующих в метаболизме нуклеотидфосфатов (АТФ, АДФ, АМФ). Также аденозин может образовываться из S-аденозилгомоцистеина под действием фермента гидролазы S-аденозилгомоцистеина. Уровень аденозина в периферической крови и тканях в условиях воспаления повышается, как правило, либо вследствие его выхода во внеклеточное пространство в результате гибели клеток, либо в результате усиления активности ферментов, расположенных на поверхности ряда иммунных клеток (таких, как моноциты, нейтрофилы и лимфоциты): эктонуклеозидтрифосфатдифосфогидролаза-1 (NTPD1, CD39), кодируемый геном *ENTPD1*, и экто-5'-нуклеотидаза (5'-NT, CD73), кодируемый геном *NT5E* [8].

Внеклеточный аденозин является лигандом для четырех рецепторов, связанных с G-белком (A1R, A2AR, A2BR, A3R), которые экспрессируются на поверхности многих клеток [11]. В частности, для T-лимфоцитов характерна экспрессия A2AR и A2BR [16]. Считается, что A2AR опосредует противовоспалительные эффекты аденозина, например, путем снижения передачи сигналов T-клеточных рецепторов [4]. Передача сигналов от A2AR ингибирует пролиферацию и экспансию T-клеток, цитотоксическую активность и высвобождение провоспалительных медиаторов [7, 20]. Этот рецептор кодируется геном *ADORA2A*. Передача сигналов через A2AR может регулировать баланс провоспалительных T-хелперов типа 17 (Th17) и иммуносупрессорных регуляторных T-клеток (Treg) в сторону повышения пула Treg-клеток [17]. Вследствие этого, влияние аденозина на баланс Treg/Th17 можно рассматривать как важное звено патогенеза таких аутоиммунных заболеваний, как системная красная волчанка, ревматоидный артрит, диабет первого типа и ВЗК [24].

Ключевым транскрипционным фактором для Treg-клеток является forkhead box P3 (FoxP3), кодируемый геном *FOXP3*. *FOXP3* играет важную роль в развитии и функционировании Treg-клеток. Транскрипционный фактор RAR-related orphan receptor gamma (*RORγ*), кодируемый геном *RORγ*, играет ключевую роль в дифференцировке и поддержании эффекторных субпопуляций Th17 [16].

В настоящее время вопрос о количественном и качественном соотношении экспрессии генов *FOXP3* и *RORγ* в периферической крови больных ЯК малоизучен, и данные, полученные другими авторами так же, как и по отношению к генам *ENTPD1*, *NT5E* и *ADORA2A*, весьма малочисленны и противоречивы. Так, в одних работах отмечено повышение количества циркулирующих и кишечных Treg-клеток у пациентов с ЯК при сравнении с условно здоровыми людьми [23]. Тогда как другими авторами отмечено снижение пула Treg-клеток в периферической крови при ЯК [14].

Пациентам с ЯК назначают терапию производными на основе 5-АСК (5-аминосалициловой кислоты) и/или стероидными препаратами (такими как преднизолон). Кроме того, лечение больных ЯК предполагает использование и других терапевтических стратегий для снижения воспалительного процесса в кишечнике, например назначение особой диеты, хирургическое лечение, иммунотерапию и др. [1]. Однако вопрос о том, как влияют эти препараты на экспрессию генов *ENTPD1*, *NT5E*, *ADORA2A*, *FOXP3* и *RORγ*, изучен еще слабо.

Цель исследования — изучить уровень экспрессии генов *ENTPD1*, *NT5E*, *ADORA2A*, *FOXP3* и *RORγ* в лейкоцитах периферической крови больных ЯК, находящихся на терапии производными на основе 5-АСК, на терапии стероидным препаратом (преднизолоном), и условно здоровых людей.

Материалы и методы

В исследование включены условно здоровые люди и пациенты с диагнозом «ЯК». Всего было исследовано 41 человек, из которых 23 человека были больны ЯК (табл. 1). Больные ЯК были разделены на две группы, в зависимости от терапии. Группа ЯК1 (n = 18), медиана возраста которых составила 42 (34–52) года, находились на базисной терапии производными 5-АСК: салофальк, сульфасалазин (длительностью не менее 3 месяцев). Дозировка составляла 3–4 грамма в сутки в зависимости от распространенности и степени активности воспалительного процесса в слизистой оболочке толстой кишки. Больные группы ЯК2 (n = 5) принимали в качестве терапии стероидные гормоны, в частности преднизолон, медиана их возраста составила 35 (30–39) лет. Дозировка препарата составляла 1 мг на кг в сутки и зависела от распространенности воспаления (или формы ЯК) и клинико-эндоскопических показателей больных. Диагноз «ЯК» устанавливали общепринятыми методами диагностики с учетом комплекса клинических данных и резуль-

татов лабораторных, эндоскопических и гистологических исследований. Активность иммуновоспалительного процесса в слизистой толстой кишки оценивалась по данным клинической картины по традиционной шкале Truelove and Witts с учетом частоты стула, примеси крови, температуры и частоты пульса, уровня гемоглобина и скорости оседания эритроцитов. Учитывались эндоскопические признаки согласно индексу Шредера — наличие эритемы, контактной кровоточивости, эрозий, язв, спонтанной кровоточивости. При гистологическом исследовании оценивалась степень воспалительной инфильтрации собственной пластинки, наличие нейтрофилов, эозинофилов, крипт-абсцессов, повреждение

крипт, уменьшение числа бокаловидных клеток, наличие эрозий и язв.

В группу контроля были отобраны 18 условно здоровых людей, возраст которых составлял 39 (35–47) лет. Возраст индивидов из групп исследования значимо не различался ($p < 0,05$). Критерии исключения из исследования для группы здоровых людей: наличие хронических иммуновоспалительных заболеваний, в том числе сахарного диабета второго типа, злоупотребление алкоголем, курение табака, перенесенные в последние два месяца инфекционные заболевания.

Использовали периферическую кровь, взятую натощак. Тотальную РНК (тотРНК) из лейкоцитов периферической крови выделяли с помощью набора ExtractRNA (ЗАО «Евроген», Россия). Фракцию лейкоцитов периферической крови получали после лизиса клеток крови раствором, содержащим хлорид аммония. ТотРНК обрабатывали ДНКазой (1 е. а.). кДНК синтезировали, используя набор для обратной транскрипции с обратной транскриптазой Magnus (ЗАО «Евроген», Россия). Качество тотРНК оценивали после электрофореза в 1%-ном агарозном геле. Количество тотРНК определяли на спектрофотометре SmartSpecPlus (Bio-Rad, США).

Уровень транскриптов генов изучали методом ПЦР в режиме реального времени на приборе LightCycler (Roche, Германия), используя набор PCRMix-HS SYBR (ЗАО «Евроген», Россия). Каждую ПЦР повторяли не менее 2 раз. Смесь для ПЦР объемом 20 мкл содержала 1нг кДНК, по 50 пкМ прямого и обратного праймеров, 4 мкл реакционной смеси и 13,4 мкл деионизированной воды, свободной от нуклеаз. Протокол ПЦР: денатурация кДНК 5 мин при 95 °С; 45 циклов: денатурация при 95 °С 30 с; отжиг при 58 °С (для генов *FOXP3* и *RORγ*) и при 64 °С (для генов *ENTPD1*, *NT5E* и *ADORA2A*) 30 с; элонгация при 72 °С 30 с. Гены *GAPDH* и *18S rRNA* использовали в качестве референсных. Последовательность праймеров дана в таблице 2. Специфичность продуктов амплификации проверяли плавлением ПЦР фрагментов. Эффективность ПЦР оценивали по стандартной кривой.

Статистическая обработка данных выполнена в пакете программ Statgraphics Centurion XVI (version 16.1.11) и GraphPad Prism (version 7.0). Значимость различий медиан оценивали с помощью U-критерия Вилкоксона–Манна–Уитни. Данные представлены в виде медианы (Me) и квартилей ($Q_{0,25}$ – $Q_{0,75}$). Проводили корреляционный анализ по Спирмену.

Исследования выполнены на оборудовании Центра коллективного пользования ФИЦ КарНЦ РАН.

ТАБЛИЦА 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ОБСЛЕДОВАННЫХ ЛЮДЕЙ

TABLE 1. CHARACTERISTICS OF SURVEYED PEOPLE

Характеристика Characteristic	Контроль Control	ЯК UC
Обследовано человек, n Examination of person, n	18	23
Мужчины, n (%) Men, n (%)	7 (38,9)	13 (56,5)
Женщины, n (%) Women, n (%)	11 (61,1)	10 (43,5)
Возраст, Me Age, Me	39 (35–47)	38 (33–44)
Терапия, n (%) Therapy, n (%) производными 5-АСК 5-ASA derivatives преднизолоном prednisolone	– –	18 (78,3) 5 (21,7)
Активность, n (%) Activity, n (%) высокая high умеренная moderate слабая weak	– – –	7 (30,4) 4 (17,4) 12 (52,2)
Форма ЯК, n (%) Forms UC, n (%) левосторонний left-side панколит pancolitis	– –	16 (69,6) 7 (30,4)

ТАБЛИЦА 2. ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ ПРАЙМЕРОВ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ОТНОСИТЕЛЬНОЙ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ

TABLE 2. PRIMER SEQUENCES FOR DETERMINING RELATIVE GENE EXPRESSION

Ген Gene	Последовательность праймеров 5' – 3' Primer sequence 5' – 3'		Размер ПЦР продукта, п. о. PCR product size, b. p	Источник Source
	Прямой Forward	Обратный Reverse		
18SrRNA	AGAAACGGCTACCACATCCA	CACCAGACTTGCCCTCCA	119	Собственный дизайн Own design
GAPDH	GAAGGTGAAGGTCGGAGTC	GAAGATGGTGATGGGATTTC	226	Собственный дизайн Own design
ENTPD1	AGCAGCTGAAATATGCTGGC	GAGACAGTATCTGCCGAAGTCC	200	Собственный дизайн Own design
NT5E	ATTGCAAAGTGGTTCAAAGTCA	ACACTTGGCCAGTAAATAGGG	123	Собственный дизайн Own design
ADORA2A	CTTGGGTTCTGAGGAAGCAG	CAGCAGCTCCTGAACCCTAG	253	Собственный дизайн Own design
FOXP3	GCCACAACCTGAGTCTGC	GTTCGTCCATCCTCCTTTCC	172	Собственный дизайн Own design
RORγt	CCAAGGCAGGGCTCAATG	GAAGTCCACATCGGTCAGG	123	Собственный дизайн Own design

Результаты

Проанализирован уровень мРНК генов *ENTPD1*, *NT5E*, *ADORA2A*, *FOXP3* и *ROR γ* в ЛПК больных ЯК, находящихся на базисной терапии производными 5-АСК и на терапии преднизолоном, в сравнении с условно здоровыми людьми.

Обнаружены значимые различия в содержании мРНК гена *ENTPD1* у больных груп-

пы ЯК1 при сравнении с контрольной группой ($p = 0,0045$) (рис. 1). Уровень транскриптов гена *NT5E* в ЛПК пациентов группы ЯК1 оказался выше, чем у пациентов группы ЯК2 ($p = 0,0486$) и контрольной группы ($p = 0,0007$) (рис. 1). Установлены значимые различия в содержании мРНК гена *ADORA2A* между контролем и ЯК1 и контролем и ЯК2. Уровень транскриптов этого гена в ЛПК больных группы ЯК1 был выше, чем

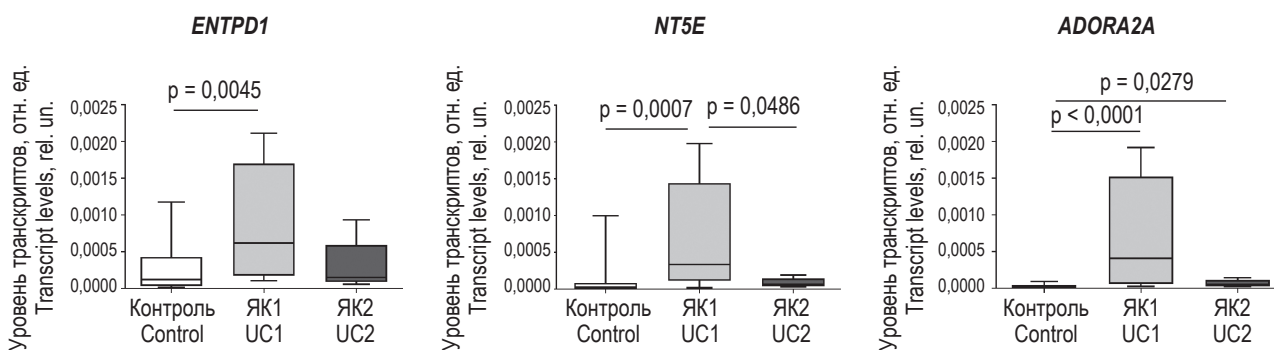


Рисунок 1. Уровень мРНК генов *ENTPD1*, *NT5E*, *ADORA2A* в ЛПК условно здоровых людей и больных ЯК

Figure 1. mRNA levels of the genes *ENTPD1*, *NT5E*, *ADORA2A* in PBL of healthy people and patients with UC

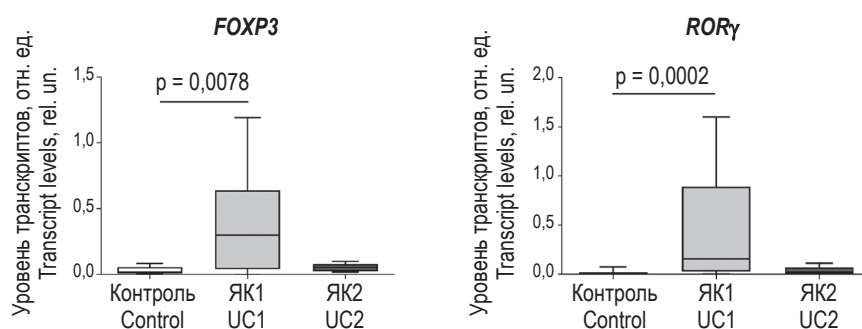


Рисунок 2. Уровень мРНК генов *FOXP3* и *RORγ* в ЛПК условно здоровых людей и больных ЯК

Figure 2. mRNA levels of the *FOXP3* and *RORγ* genes in PBL of healthy people and patients with UC

в ЛПК пациентов из группы ЯК2 ($p = 0,0289$) и контрольной группой условно здоровых людей ($p < 0,001$) (рис. 1).

В ЛПК индивидов группы ЯК1 содержание мРНК гена *FOXP3* было выше, чем у контрольной группы ($p = 0,0093$) (рис. 2). Выявлены различия уровня экспрессии гена *RORγ* в ЛПК пациентов в группе ЯК1 и пациентов из группы ЯК2 ($p = 0,0005$). Как оказалось, содержание мРНК этого гена было выше у пациентов с ЯК при сравнении со здоровыми людьми. Соотношение уровня мРНК генов *RORγ* и *FOXP3* ($RORγ/FOXP3$) между группами исследования не различалось: при сравнении групп ЯК1 и ЯК2 с контрольной группой ($p = 0,4000$); при сравнении групп ЯК1 и ЯК2 ($p = 0,8000$).

Проведен ранговый корреляционный анализ по Спирмену. В контрольной группе выявлена корреляция уровня экспрессии генов *FOXP3* и *RORγ* ($r = 0,5973$, $p = 0,0254$), *RORγ* и *NT5E* ($r = 0,5987$, $p = 0,0251$), *RORγ* и *ADORA2A* ($r = 0,6005$, $p = 0,0264$), *ENTPD1* и *NT5E* ($r = 0,7036$, $p = 0,0085$), *ENTPD1* и *ADORA2A* ($r = 0,7321$, $p = 0,062$). В группе пациентов ЯК1, выявлена тесная связь по шкале Чеддока уровня мРНК гена *RORγ* с уровнем мРНК гена *NT5E* ($r = 0,7590$, $p = 0,0446$).

Обсуждение

Патология ЯК связана с хроническим воспалением и чрезмерным иммунным ответом на резидентную микробиоту и/или пищевые антигены. Клетки врожденного и адаптивного иммунного ответа играют важную роль в развитии заболевания. В последнее время особое внимание уделяется балансу провоспалительных $RORγ^+Th17$ и противовоспалительных $FoxP3^+Treg$ -клеток в регуляции воспаления.

Как показано в нашем исследовании, в ЛПК больных ЯК, находящихся на базисной терапии производными 5-АСК, наблюдалось повышение

уровня экспрессии генов *FOXP3* и *RORγ*, представляющих собой транскрипционные факторы Treg- и Th17-клеток соответственно. Однако в нашем исследовании различий в соотношении уровня транскриптов этих генов в ЛПК больных и здоровых людей не выявлено, хотя, согласно данным литературы, у больных ВЗК происходит изменение баланса Th17/Treg-клеток [17].

Представленные данные свидетельствуют об активации Т-клеточного звена адаптивного иммунитета у больных ЯК и коррелируют с результатами других исследований. Так, повышение уровня экспрессии гена *RORγ*, а также увеличение количества Th17-клеток и продукции IL-17 наблюдается в периферической крови и в собственной пластинке слизистой толстой кишки у пациентов с ЯК, а также у мышей с экспериментально вызванным ЯК [9, 16]. Отмечается повышение количества Treg-клеток в слизистой толстой кишки пациентов с ЯК и у мышей с экспериментально вызванным заболеванием [13, 27]. Причем этот показатель у больных людей положительно коррелировал с активностью заболевания и уровнем С-реактивного белка в сыворотке [13]. Однако сведения об экспрессии *FOXP3* и количестве Treg-клеток в периферической крови при ЯК противоречивые. Показано, что в периферической крови, брыжеечных лимфатических узлах, собственной пластинке слизистой толстой кишки мышей с экспериментально вызванным ЯК количество Treg-клеток было увеличено, тогда как уровни мРНК *FoxP3* и *IL10* уменьшались [19, 27]. У молодых пациентов с ЯК количество циркулирующих и кишечных Treg-клеток было значительно выше, чем у индивидов из контрольной группы [23]. Более того, у больных людей уровень Treg-клеток в кишечнике был значительно выше, чем циркулирующих Treg [23]. Другие авторы отмечают снижение пула Treg-клеток в периферической крови при ЯК [14]. Эти противоречия, а также парадоксальный эффект повышения количества Treg-клеток в слизистой

толстой кишки при ЯК отчасти можно объяснить значительной гетерогенностью популяции FoxP3⁺T-клеток, которые могут включать в себя покоящиеся или не супрессорные Т-клетки [16, 19]. Возможно, обнаруженный нами более высокий уровень экспрессии *FOXP3* в ЛПК больных ЯК обусловлен повышением количества активированных эффекторных Т-клеток, которые могут временно экспрессировать FoxP3 и не обладать супрессорной способностью.

В литературе имеются данные о том, что противовоспалительная терапия, в частности анти-TNF α , быстро увеличивает содержание функциональных FoxP3⁺Treg в крови и усиливает их супрессорную функцию [5, 12]. Как обнаружено в нашем исследовании, у пациентов с ЯК, принимающих преднизолон (ЯК2), уровень транскриптов генов *FOXP3* и *ROR γ* не отличается от этих показателей у контрольной группы, что, вероятно, свидетельствует о большей эффективности данной терапии в отношении активности Т-клеток по сравнению с группой пациентов с ЯК, находящихся на базисной терапии производными 5-АСК (ЯК1).

Чрезмерная иммунная активация при ВЗК приводит к тканевому повреждению, что способствует высвобождению АТФ в межклеточное пространство и накоплению внеклеточного аденозина [2, 25], который обладает иммуносупрессорным эффектом. В связи с этим в работе было исследовано содержание транскриптов генов эктонуклеотидаз *ENTPD1*, *NT5E* и аденозинового рецептора *ADORA2A* в ЛПК пациентов с ЯК. Показано, что у лиц, находящихся на базисной терапии производными 5-АСК, содержание транскриптов генов *ENTPD1*, *NT5E*, *ADORA2A* было выше, чем в ЛПК здоровых людей и больных, принимающих преднизолон. Повышение уровня мРНК генов CD39/CD73/A2AR сигнального пути свидетельствует об активации метаболизма аденозина, что согласуется с данными литературы о высоком по сравнению с нормой содержании аденозина в плазме больных ЯК [2, 10]. Обнаруженная нами тесная корреляция экспрессии генов *ENTPD1* и *NT5E*, *ENTPD1* и *ADORA2A* в ЛПК здоровых людей свидетельствует об их взаимной связи в нормальных физиологических условиях.

Эктонуклеотидазы CD39 и CD73 экспрессируются многими типами клеток. Экспрессия CD39 характеризует иммуносупрессорные Treg-клетки, к которым также относят и FoxP3⁺ROR γ ⁺supTh17 клетки, которые обнаруживают в большом количестве в слизистой кишечника [17]. Разнообразие супрессорных Т-клеток в барьерных тканях необходимо для поддержания иммунологической толерантности, в частности к пищевым антигенам и антигенам микрофлоры.

Экспериментальные исследования на мышиных моделях демонстрируют защитную роль сверхэкспрессии *ENTPD1* [6, 24]. У больных ВЗК отмечается сниженное количество supTh17-клеток во фракции моноклеаров периферической крови и в собственной пластинке слизистой кишечника, а также CD39-экспрессирующих CD4⁺CD25⁺CD127^{lo}FoxP3⁺Treg-клеток на периферии [12, 17]. Кроме того, исследование Libera и соавт. [15] показало снижение количества еще одной защитной популяции клеток — CD39⁺ γ δ T-клеток у больных с ВЗК. С другой стороны, при ВЗК отмечено увеличение других CD39⁺ клеток. Так, в собственной пластинке кишечника пациентов с ВЗК количество CD39⁺ клеток в популяции FoxP3⁺T-лимфоцитов оказалось выше, чем у здоровых людей [18]. Число активированных CD4⁺Th и цитотоксических CD8⁺T-клеток положительно коррелировало у больных ВЗК [15]. Наши данные не выявили связи уровня мРНК генов *ENTPD1* с *FOXP3* и *ROR γ* , что свидетельствует о большем вкладе в экспрессию *ENTPD1* других клеточных популяций ЛПК.

Согласно данным литературы, повышенная экспрессия гена *NT5E* и увеличение количества CD73⁺ клеток при ЯК наблюдается как в периферической крови, так и в тканях кишечника [8]. Однако усиление экспрессии CD73 часто связывают с негативным эффектом при ВЗК. Блокада CD73 ингибирует экспрессию провоспалительных цитокинов, но способствует выработке противовоспалительных цитокинов в макрофагах [26]. *In vivo* блокада CD73 заметно облегчала колит, вызванный DSS, у мышей, что характеризовалось снижением потери веса, снижением частоты диареи и уменьшением количества кровавого стула [26]. Периферические CD73⁺CD4⁺T-клетки при ВЗК были обогащены IL-17A-продуцирующими клетками [8]. Вероятно, повышенный уровень CD73 при ЯК характерен для провоспалительных Т-клеток, о чем также свидетельствует выявленная в нашем исследовании тесная связь между уровнем транскриптов гена *NT5E* и гена *ROR γ* .

Заключение

Таким образом, повышение транскрипционной активности генов *FOXP3* и *ROR γ* , кодирующих маркеры Т-регуляторных лимфоцитов и эффекторных Th17-клеток у больных ЯК, свидетельствует о том, что патологический процесс при ЯК сопровождается изменением экспрессии этих генов. Кроме этого, показано, что при ЯК происходит активация CD39/CD73/A2AR сигнального пути, что согласуется с наблюдаемой нами повышенной экспрессией генов эктонуклеотидаз *ENTPD1*, *NT5E* и рецептора аденозина *ADORA2A* у больных, находящихся на базисной терапии производными 5-АСК.

Список литературы / References

1. Язвенный колит: клинические рекомендации. Утверждены Минздравом РФ. 2020. 56 с. Режим доступа: http://disuria.ru/_ld/9/988_kr20K51mz.pdf. [Clinical guidelines. Ulcerative colitis. Approved by the Ministry of Health of the Russian Federation]. 2020. 56 p. Available at: http://disuria.ru/_ld/9/988_kr20K51mz.pdf.
2. Beyazit Y., Koklu S., Tas A., Purnak T., Sayilir A., Kurt M., Turhan T., Celik T., Suvak B., Torun S., Akbal E. Serum adenosine deaminase activity as a predictor of disease severity in ulcerative colitis. *J. Crohns Colitis*, 2012, Vol. 6, no. 1, pp. 102-107.
3. Bono M.R., Fernández D., Flores-Santibáñez F., Roseblatt M., Sauma D. CD73 and CD39 ectonucleotidases in T cell differentiation: Beyond immunosuppression. *FEBS Lett.*, 2015, Vol. 589, no. 22, pp. 3454-3460.
4. Borg N., Alter C., Gördt N., Jacoby C., Ding Z., Steckel B., Quast C., Bönner F., Friebe D., Temme S., Flögel U., Schrader J. CD73 on T cells orchestrates cardiac wound healing after myocardial infarction by purinergic metabolic reprogramming. *Circulation*, 2017, Vol. 136, no. 3, pp. 297-313.
5. Boschetti G., Nancey S., Sardi F., Roblin X., Flourie B., Kaiserlian D. Therapy with anti-TNF α antibody enhances number and function of Foxp3⁺ regulatory T cells in inflammatory bowel diseases. *Inflamm. Bowel Dis.*, 2011, Vol. 17, no. 1, pp. 160-170.
6. Crittenden S., Cheyne A., Adams A., Forster T., Robb C.T., Felton J., Ho G., Ruckerl D., Rossi A.G., Anderton S.M., Ghazal P., Satsangi J., Howie S.E., Yao C. Purine metabolism controls innate lymphoid cell function and protects against intestinal injury. *Immunol. Cell Biol.*, 2018, Vol. 96, no. 10, pp. 1049-1059.
7. Csoka B., Himer L., Selmezy Z., Vizi E.S., Pacher P., Ledent C., Deitch E.A., Spolarics Z., Németh Z.H. Adenosine A2A receptor activation inhibits T helper 1 and T helper 2 cell development and effector function. *FASEB J.*, Vol. 22, no. 10, pp. 3491-3499.
8. Doherty G.A., Bai A., Hanidziar D., Longhi M.S., Lawlor G.O., Putheti P., Csizmadia E., Nowak M., Cheifetz A.S., Moss A.C., Robson S.C. CD73 is a phenotypic marker of effector memory Th17 cells in inflammatory bowel disease. *Eur. J. Immunol.*, 2012, Vol. 42, no. 11, pp. 3062-3072.
9. Dong Z., Du L., Xu X., Yang Y., Wang H., Qu A., Qu X., Wang C. Aberrant expression of circulating Th17, Th1 and Tc1 cells in patients with active and inactive ulcerative colitis. *Int. J. Mol. Med.*, 2013, Vol. 31, no. 4, pp. 989-997.
10. Ercan G., Yigitturk G., Erbas O. Therapeutic effect of adenosine on experimentally induced acute ulcerative colitis model in rats. *Acta Cir. Bras.*, 2019, Vol. 34, no. 12, e2019012043. doi: 10.1590/s0102-865020190120000004.
11. Fredholm B.B., IJzerman A.P., Jacobson K.A., Linden J., Müller C.E. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXXI. Nomenclature and Classification of Adenosine Receptors – An Update. *Pharmacol. Rev.*, 2011, Vol. 63, no. 1, pp. 1-34.
12. Gibson D.J., Elliott L., McDermott E., Tosetto M., Keegan D., Byrne K., Martin S.T., Rispens T., Cullen G., Mulcahy H.E., Cheifetz A.S., Moss A.C., Robson S.C., Doherty G.A., Ryan E.J. Heightened expression of CD39 by regulatory T lymphocytes is associated with therapeutic remission in inflammatory bowel disease. *Inflamm. Bowel Dis.*, 2015, Vol. 21, no. 12, pp. 2806-2814.
13. Holmén N., Lundgren A., Lundin S., Bergin A.M., Rudin A., Sjövall H., Ohman L. Functional CD4⁺CD25^{high} regulatory T cells are enriched in the colonic mucosa of patients with active ulcerative colitis and increase with disease activity. *Inflamm. Bowel Dis.*, 2006, Vol. 12, no. 6, pp. 447-456.
14. Kulkarni N., Meitei H.T., Sonar S.A., Sharma P.K., Mujeib V.R., Srivastava S., Boppana R., Lal G. CCR6 signaling inhibits suppressor function of induced-Treg during gut inflammation. *J. Autoimm.*, 2018, Vol. 88, pp. 121-130.
15. Libera J., Wittner M., Kantowski M., Woost R., Eberhard J.M., de Heer J., Reher D., Huber S., Haag F., zur Wiesch J.S. Decreased Frequency of Intestinal CD39⁺ $\gamma\delta$ ⁺ T Cells With Tissue-Resident Memory Phenotype in Inflammatory Bowel Disease. *Front. Immunol.*, 2020, Vol. 11, 567472. doi:10.3389/fimmu.2020.567472.
16. Long Y., Zhao X., Xia C., Li X., Fan C., Liu C., Wang C. Upregulated IL-17A secretion and CCR6 co-expression in Treg subsets are related to the imbalance of Treg/Th17 cells in active UC patients. *Scand. J. Immunol.*, 2020, Vol. 9, no. 2, e87956. doi:10.1111/sji.12842.
17. Longhi M.S., Moss A., Bai A., Wu Y., Huang H., Cheifetz A., Quintana F.J., Robson S.C. Characterization of Human CD39⁺ Th17 cells with suppressor activity and modulation in inflammatory bowel disease. *PLoS One*, 2014, Vol. 9, no. 2, e87956. doi: 10.1371/journal.pone.0087956.
18. Lord J.D., Shows D.M., Chen J., Thirlby R.C. Human blood and mucosal regulatory T cells express activation markers and inhibitory receptors in inflammatory bowel disease. *PLoS One*, 2015, Vol. 10, no. 8, e0136485. doi: 10.1371/journal.pone.0136485.
19. Ma H., Gao W., Sun X., Wang W. STAT5 and TET2 cooperate to regulate FOXP3-TSDR demethylation in CD4⁺ T cells of patients with colorectal cancer. *J. Immunol. Res.*, 2018, Vol. 2018, 6985031. doi: 10.1155/2018/6985031.
20. Ohta A., Ohta A., Madasu M., Kini R., Subramanian M., Goel N., Sitkovsky M. A2A adenosine receptor may allow expansion of T cells lacking effector functions in extracellular adenosine-rich microenvironments. *J. Immunol.*, 2009, Vol. 183, no. 9, pp. 5487-5493.
21. Pacini E.S.A., Satori N.A., Jackson E.K., Godinho R.O. Extracellular cAMP-adenosine pathway signaling: a potential therapeutic target in chronic inflammatory airway diseases. *Front. Immunol.*, 2022, Vol. 13, 866097. doi: 10.3389/fimmu.2022.866097.

22. Padoan A., Musso G., Contran N., Basso D. Inflammation, autoinflammation and autoimmunity in inflammatory bowel diseases. *Curr. Issues Mol. Biol.*, 2023, Vol. 45, no. 7, pp. 5534-5557.
23. Sznurkowska K., Luty J., Bryl E., Witkowski J.M., Hermann-Okoniewska B., Landowski P., Kosek M., Szlagatys-Sidorkiewicz A. Enhancement of circulating and intestinal T regulatory Cells and their expression of helios and neuropilin-1 in children with inflammatory bowel disease. *J. Inflamm. Res.*, 2020, Vol. 13, pp. 995-1005.
24. Vuerich M., Mukherjee S., Robson S.C., Longhi M.S. Control of Gut Inflammation by Modulation of Purinergic Signaling. *Front. Immunol.*, 2019, Vol. 11, 1882. doi: 10.3389/fimmu.2020.01882.
25. Wan P., Liu X., Xiong Y., Ren Y., Chen J., Lu N., Guo Y., Bai A. Extracellular ATP mediates inflammatory responses in colitis via P2 × 7 receptor signaling. *Sci. Rep.*, 2016, Vol. 6, 19108. doi: 10.1038/srep19108.
26. Wang R., Wang Y., Wu C., Jin G., Zhu F., Yang Y., Wang Y., Zhou G. CD73 blockade alleviates intestinal inflammatory responses by regulating macrophage differentiation in ulcerative colitis. *Exp. Ther. Med.*, 2023, Vol. 25, no. 6, 272. doi: 10.3892/etm.2023.11972.
27. Yu Q.T., Saruta M., Avanesyan A., Fleshner P.R., Banham A.H., Papadakis K.A. Expression and functional characterization of FOXP3+CD4+ regulatory T cells in ulcerative colitis. *Inflamm. Bowel Dis.*, 2007, Vol. 13, no. 2, pp. 191-199.

Авторы:

Аторин Д.А. — аспирант, стажер-исследователь лаборатории генетики, ИБ КарНЦ РАН; Институт биологии — обособленное подразделение ФГБУН «Федеральный исследовательский центр «Карельский научный центр Российской академии наук», г. Петрозаводск, Республика Карелия, Россия

Жулай Г.А. — к.б.н., научный сотрудник лаборатории генетики, Институт биологии — обособленное подразделение ФГБУН «Федеральный исследовательский центр «Карельский научный центр Российской академии наук», г. Петрозаводск, Республика Карелия, Россия

Топчиева Л.В. — к.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории генетики, Институт биологии — обособленное подразделение ФГБУН «Федеральный исследовательский центр «Карельский научный центр Российской академии наук», г. Петрозаводск, Республика Карелия, Россия

Authors:

Atorin D.A., Postgraduate Student, Research Assistant, Laboratory of Genetics, Institute of Biology, Karelian Research Centre, Russian Academy of Sciences, Petrozavodsk, Republic of Karelia, Russian Federation

Zhulai G.A., PhD (Biology), Research Associate, Laboratory of Genetics, Institute of Biology, Karelian Research Centre, Russian Academy of Sciences, Petrozavodsk, Republic of Karelia, Russian Federation

Topchieva L.V., PhD (Biology), Leading Research Associate, Laboratory of Genetics, Institute of Biology, Karelian Research Centre, Russian Academy of Sciences, Petrozavodsk, Republic of Karelia, Russian Federation

Курбатова И.В. — к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории генетики, Институт биологии — обособленное подразделение ФГБУН «Федеральный исследовательский центр “Карельский научный центр Российской академии наук”», г. Петрозаводск, Республика Карелия, Россия

Дуданова О.П. — д.м.н., профессор, заведующая кафедрой пропедевтики внутренних болезней и гигиены Медицинского института ФГБОУ ВО «Петрозаводский государственный университет», г. Петрозаводск, Республика Карелия, Россия

Kurbatova I.V., PhD (Biology), Senior Research Associate, Laboratory of Genetics, Institute of Biology, Karelian Research Centre, Russian Academy of Sciences, Petrozavodsk, Republic of Karelia, Russian Federation

Dudanova O.P., PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Department of Propaedeutics of Internal Diseases and Hygiene, Institute of Medicine, Petrozavodsk State University, Petrozavodsk, Republic of Karelia, Russian Federation

Поступила 25.03.2024

Отправлена на доработку 22.05.2024

Принята к печати 14.09.2024

Received 25.03.2024

Revision received 22.05.2024

Accepted 14.09.2024

ВЛИЯНИЕ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНОВ *DEFB1-20G>A* И *DEFB1-52G>A* НА УРОВЕНЬ ДЕФЕНЗИНА БЕТА 1 (*DEFB1*) У ПАЦИЕНТОВ ПРИЗЫВНОГО ВОЗРАСТА С ВНЕБОЛЬНИЧНЫМИ ПНЕВМОНИЯМИ

Загалаев Б.Т., Мироманова Н.А., Мироманов А.М.

ФГБОУ ВО «Читинская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения РФ,
г. Чита, Забайкальский край, Россия

Резюме. Цель исследования — установить влияние полиморфизма гена *DEFB1-20G>A* и гена *DEFB1-52G>A* на экспрессию *DEFB1* у пациентов призывного возраста с развитием внебольничных пневмоний. Проведено обследование 160 неродственных пациентов призывного возраста (18-20 лет) европеоидной расы. Первая группа (n = 80) — пациенты с COVID-19-инфекцией, осложненной нетяжелой пневмонией (n = 40) и тяжелой пневмонией (n = 40). Вторая группа — клинического сравнения (n = 80) — пациенты с острой респираторной инфекцией (ОРИ) негриппозной этиологии, осложненной нетяжелой пневмонией (n = 40) и тяжелой пневмонией (n = 40). Контрольная группа — 86 практически здоровых мужчин аналогичного возраста. Критерии исключения: наличие родственных связей; пациенты с острой и/или хронической сопутствующей патологией. Методы исследования: клинические; лабораторные (иммунологический — определение *DEFB1* с помощью набора реактивов ELISA Cloud-Clone Corp. (США); генетический (полиморфизм гена *DEFB1-20G>A*, гена *DEFB1-52G>A*) — в работе использовались стандартные наборы праймеров НПФ «Литех»-«SNP» (Москва); инструментальные (компьютерная томография). Исследования осуществляли при поступлении в стационар. Статистическая обработка результатов исследования проводилась с помощью пакета программ IBM SPSS Statistics Version 25.0 (IBM, США). Установлено преобладание -20A- аллелей и генотипов -20A/A и -52A/A генов *DEFB1* у пациентов с развитием тяжелой пневмонии на фоне COVID-19-инфекции. Отмечено увеличение содержания *DEFB1* в группе с COVID-19-инфекцией в 1,1 раза по сопоставлению с группой ОРИ и в 1,5 раза — с группой контроля. Изменение уровня *DEFB1* в зависимости от тяжести течения внебольничной пневмонии также характеризуется его повышением в 1,7 раза в группе с тяжелым течением на фоне COVID-19-инфекции и в 1,2 раза у больных с ОРИ.

Адрес для переписки:

Мироманов Александр Михайлович
ФГБОУ ВО «Читинская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения РФ
672000, Россия, Забайкальский край, г. Чита,
ул. Горького, 39а.
Тел.: 8 (924) 386-18-16.
Факс: 8 (3022) 32-30-58.
E-mail: miromanov_a@mail.ru

Address for correspondence:

Alexander M. Miromanov
Chita State Medical Academy
39a Gorky St
Chita, Transbaikial region
672000 Russian Federation
Phone: +7 (924) 386-18-16.
Fax: +7 (3022) 32-30-58.
E-mail: miromanov_a@mail.ru

Образец цитирования:

Б.Т. Загалаев, Н.А. Мироманова, А.М. Мироманов
«Влияние полиморфизма генов *DEFB1-20G>A*
и *DEFB1-52G>A* на уровень дефензина бета 1 (*DEFB1*)
у пациентов призывного возраста с внебольничными
пневмониями» // Медицинская иммунология, 2025.
Т. 27, № 1. С. 207-214.
doi: 10.15789/1563-0625-EOT-2961

© Загалаев Б.Т. и соавт., 2025
Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

B.T. Zagalaev, N.A. Miromanova, A.M. Miromanov “Effects
of the *DEFB1-20G>A* and *DEFB1-52G>A* gene polymorphism
on the level of beta 1 defensin (*DEFB1*) in young adults with
community-acquired pneumonias”, Medical Immunology
(Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2025, Vol. 27, no. 1,
pp. 207-214.
doi: 10.15789/1563-0625-EOT-2961

© Zagalaev B.T. et al., 2025
The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License
DOI: 10.15789/1563-0625-EOT-2961

Концентрация DEFB1 значительно повышается при носительстве генотипа -20A/A и генотипа -52A/A гена *DEFB1*. У пациентов призывного возраста с внебольничными пневмониями регистрируется повышение концентрации DEFB1 с наибольшими значениями в группе с тяжелыми пневмониями при COVID-19. Носительство генотипа -20A/A и генотипа -52A/A гена *DEFB1* способствует увеличению содержания DEFB1. Наличие -20A- аллелей и генотипов -20A/A и -52A/A генов *DEFB1* ассоциировано с тяжелым течением внебольничных пневмоний у пациентов призывного возраста на фоне COVID-19-инфекции.

Ключевые слова: внебольничные пневмонии, COVID-19, призывной возраст, полиморфизм, гены, дефензины

EFFECTS OF THE *DEFB1*-20G>A AND *DEFB1*-52G>A GENE POLYMORPHISM ON THE LEVEL OF BETA 1 DEFENSIN (*DEFB1*) IN YOUNG ADULTS WITH COMMUNITY-ACQUIRED PNEUMONIAS

Zagalaev B.T., Miromanova N.A., Miromanov A.M.

Chita State Medical Academy, Chita, Transbaikalian region, Russian Federation

Abstract. The purpose of the present study was to evaluate the effect of *DEFB1*-20G>A and the *DEFB1*-52G>A gene polymorphisms on the expression of DEFB1 in military-age patients with a history of community-acquired pneumonia. A survey of 160 unrelated patients of military age (18-20 years), Caucasian origin was carried out. The first group (n = 80) included the patients with COVID-19 infection complicated by mild pneumonia (n = 40) and severe pneumonia (n = 40). The second group was taken for clinical comparison (n = 80) included the patients with acute respiratory infection (ARI) of non-influenza etiology, complicated by mild pneumonia (n = 40) and severe pneumonia (n = 40). The control group consisted of 86 practically healthy men of the same age. Exclusion criteria were as follows: presence of family relations; patients with acute and/or chronic concomitant pathology. Research methods included clinical laboratory techniques (immunological testing of DEFB1 using a set of ELISA reagents Cloud-Clone Corp. (USA); genetic (polymorphism of the *DEFB1*-20G>A gene, *DEFB1*-52G>A gene) with standard primer sets of Litech-SNP (Russia); instrumental examination (computed tomography). The studies were carried out upon admission to the hospital. Statistical evaluation was carried out using the IBM SPSS Statistics Version 25.0 software package (IBM, USA). Predominance of -20A- alleles and genotypes was established -20A/A and -52A/A of the *DEFB1* gene variants in the patients with development of severe pneumonia associated with COVID-19 infection. There was an increase in the DEFB1 content in the group with COVID-19 infection by 1.1 times compared with the ARI group, and a 1.5-fold increase against the control group. The changed levels of DEFB1 associated with severity of community-acquired pneumonia were also characterized by its 1.7-fold increase in the group with a severe clinical course in presence of COVID-19 infection, and by 1.2 times in patients with ARI. The DEFB1 concentration increases significantly in the carriers of *DEFB1* -20A/A and -52A/A genotypes. In patients of military age with community-acquired pneumonia, an increased concentration of DEFB1 is registered, with highest values observed in the group with severe pneumonia due to COVID-19. Carriage of -20A/A and -52A/A genotypes of *DEFB1* gene is associated with increased contents of DEFB1. Presence of -20A alleles, -20A/A, and -52A/A genotypes of the *DEFB1* genes is associated with severe community-acquired pneumonia associated with COVID-19 infection in patients of military age.

Keywords: community-acquired pneumonia, COVID-19, conscription age, polymorphism, genes, defensins

Введение

Актуальность внебольничных пневмоний на современном этапе гражданской и военной медицины определяется высоким уровнем заболеваемости среди пациентов призывного возраста, тяжестью клинического течения, длительной утратой трудоспособности, склонностью к эпидемическому распространению и увеличивающимися летальными исходами на фоне эпидемий [2, 6].

Военный призыв является мощным стрессорным фактором, который может приводить к развитию синдрома хронического адаптационного перенапряжения и, как следствие, к дисбалансу различных систем организма, в том числе и иммунной системы [5].

Врожденный иммунитет служит первой линией защиты, обеспечивая начальный барьер для микроорганизмов и запуская антигенспецифические реакции. Считается, что антимикробные пептиды являются эффекторами врожденного иммунитета благодаря их антибиотической активности и прямому уничтожению микроорганизмов [15].

Антимикробные пептиды являются древним средством защиты организма. Несмотря на эволюцию адаптивного иммунитета, люди и другие млекопитающие экспрессируют различные классы антимикробных пептидов как важнейший компонент врожденного иммунитета. Одним из наиболее широко экспрессируемых классов антимикробных пептидов человека являются дефензины. Дефензины представляют собой небольшие (18–45 остатков), катионные (от +2 до +11 суммарного заряда) и амфипатические пептиды, которые образуют консервативную трехмерную структуру, состоящую преимущественно из β -слоев, стабилизированных тремя дисульфидными связями. Дефензины позвоночных могут быть дополнительно подразделены на основе структуры и дисульфидной связности на α -, β - и θ -дефензины. β -дефензины секретируются почти исключительно эпителием легких и являются предками α -дефензинов, которые, в свою очередь, являются предками θ -дефензинов. Эта эволюционная взаимосвязь частично объясняет широкое распространение генов β -дефензина среди видов при все более ограниченном распределении генов α - и θ -дефензина [8].

В связи с пандемией COVID-19 большое количество научных работ уделяется изучению роли генетического полиморфизма различных белков, в том числе и участвующих в патогенетических

механизмах осложненного течения вирусных заболеваний, однако влияние полиморфизма гена *DEFB1* при течении внебольничных пневмоний у пациентов призывного возраста не достаточно отображено в отечественной и зарубежной литературе, что и явилось целью нашего исследования.

Цель исследования — изучить влияние полиморфизма гена *DEFB1-20G>A* и гена *DEFB1-52G>A* на экспрессию *DEFB1* у пациентов призывного возраста с развитием внебольничных пневмоний.

Материалы и методы

В работе с обследуемыми лицами соблюдались этические принципы, предъявляемые Хельсинкской декларацией Всемирной медицинской ассоциации (World Medical Association Declaration of Helsinki 1964, 2013 — поправки) и «Правилами клинической практики в Российской Федерации», утвержденными Приказом Минздрава РФ от 19.06.2003 г. № 266.

Проведено клиническое обследование 160 неродственных пациентов русской национальности в возрасте 18–20 лет с внебольничными пневмониями. Исследования проводились в период с 2020 по 2023 г. в НИИ «Молекулярная медицина» при ФГБОУ ВО «Читинская государственная медицинская академия» Минздрава России, клинико-диагностической лаборатории и инфекционном отделении ВГУЗ «321 Окружной военный клинический госпиталь» (г. Чита).

Первая группа представлена 80 пациентами призывного возраста с COVID-19-инфекцией, осложненной нетяжелой пневмонией ($n = 40$) и тяжелой пневмонией ($n = 40$). Вторая группа — клинического сравнения ($n = 80$) — пациенты призывного возраста с острой респираторной инфекцией (ОРИ) негриппозной этиологии, осложненной нетяжелой пневмонией ($n = 40$) и тяжелой пневмонией ($n = 40$). Контрольную группу составили 86 практически здоровых мужчин призывного возраста, сопоставимые по месту проживания и национальности.

Критерии исключения: наличие родственных связей; пациенты с острыми и/или хроническими сопутствующими заболеваниями, другими патологическими состояниями/травмами. Кроме того, из исследования исключались пациенты и резиденты, получающие противовирусную, антибактериальную, дезагрегационную и антикоагуляционную терапию перед госпитализацией.

Формирование групп пациентов проводилось согласно клиническим рекомендациям Минздрава России. Клинические группы больных с внебольничными пневмониями были сопоставимы по полу, возрасту, классификационным, диагностическим характеристикам и проводимому лечению [1].

Этиологическую расшифровку возбудителей внебольничных пневмоний осуществляли с помощью ПЦР назофарингиальных мазков и мокроты для обнаружения РНК/ДНК вирусов, бактерий, атипичных патогенов [5]. Генетические исследования для определения мутации гена *DEFB1-20G>A* и гена *DEFB1-52G>A* осуществляли, используя набор праймеров «Литех»-«SNP» (Россия). Концентрацию *DEFB1* в сыворотке крови устанавливали с помощью набора реактивов ELISA Cloud-Clone Corp. (США).

Клинические, лабораторные и инструментальные (КТ) исследования выполняли при поступлении пациентов в стационар. КТ органов грудной клетки производилась всем пациентам при поступлении в стационар. В последующем, с целью динамического наблюдения за течением инфекционного процесса, исследование выполнялось с интервалом в 10 дней. Протокол КТ формировался по стандартным правилам, принятым при описании данных, а также с применением стандартизованных экспресс-форм протоколов [4]. В условиях большого потока пациентов для быстрой оценки изменений в легких после проведения КТ использовалась «эмпирическая» визуальная шкала, основанная на визуальной оценке примерного объема уплотненной легочной ткани в легком с наибольшим поражением [9]: 1) отсутствие характерных проявлений (КТ-0); 2) минимальный объем/распространенность < 25% объема легких (КТ-1); 3) средний объем/распространенность 25-50% объема легких (КТ-2); 4) значительный объем/распространенность 50-75% объема легких (КТ-3); 5) субтотальный объем/распространенность > 75% объема легких (КТ-4).

Статистическая обработка результатов исследования осуществлялась с помощью пакета программ IBM SPSS Statistics Version 25.0 (лицензия № Z125-3301-14, IBM, США). При проведении статистического анализа авторы руководствовались принципами Международного комитета редакторов медицинских журналов (ICMJE) и рекомендациями «Статистический анализ и методы в публикуемой литературе» (SAMPL). Оценка нормальности распределения признаков проводилась с помощью W-критерия Шапиро–Уилка.

Учитывая распределение признаков, отличное от нормального, интервальные данные представлены в виде медианы, первого и третьего квартилей ($Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})$). Статистическая значимость различий показателей между группами оценивалась путем определения U-критерия Манна–Уитни и уровня значимости p . Во всех случаях $p < 0,05$ считали статистически значимым. Оценка статистической значимости различий номинальных показателей исследования проводилась с использованием критерия χ^2 Пирсона. Зависимость относительных показателей оценивалась путем сравнения полученного значения критерия χ^2 с критическим (определяло уровень значимости p) [3].

Результаты и обсуждение

Выявляя содержание *DEFB1* в сыворотке крови, отмечено его увеличение в группе с COVID-19-инфекцией в 1,1 раза по сопоставлению с группой ОРИ и в 1,5 раза – с группой контроля. Изменение уровня *DEFB1* в зависимости от тяжести течения внебольничной пневмонии также характеризуется его повышением в 1,7 раза в группе с тяжелым течением на фоне COVID-19-инфекции и в 1,2 раза – у больных с ОРИ.

Площадь поверхности легкого более 50 м² состоит из эпителиальных монослоев, которые покрывают верхние и нижние дыхательные пути, а также легочные альвеолы. Крупные поверхности эпителия постоянно подвергаются воздействию частиц, загрязняющих веществ, микробов, вирусов. Различные подмножества легочного эпителия обладают своими уникальными противомикробными и противовирусными механизмами [11, 15]. Однако патогены разработали множество приспособлений, позволяющих избежать различных механизмов резистентности эпителия. Уничтожение вторгшегося патогена является наиболее эффективной стратегией, однако основная цель эпителия – пережить инфекцию. Чтобы избежать ненужного воспалительного повреждения, которое может быть неизбежным следствием уничтожения патогена, эпителий хозяина переносит симбионтные микробы или колонизирующие патогены, которые присутствуют в более высокой плотности, особенно в верхних дыхательных путях [10]. Для поддержания статуса колонизации этими патогенами требуется соответствующий уровень активного эпителиального иммунитета. Любое нарушение эпителиального иммунитета может привести к инфекции, вызванной колонизирующими патогенными микроор-

ганизмами, как это наблюдается, например, при гриппозной инфекции. Повышенная восприимчивость к гриппу обусловлена множеством механизмов, включая повреждение эпителиального барьера, повышенное микронутриентное питание из-за гибели клеток и снижение содержания сурфактантных белков. Другие колонизирующие патогены демонстрируют сходные механизмы заражения после гриппа, когда колонизирующие патогены часто связаны с заболеванием [15]. Например, *K. pneumoniae* в легких часто вызывают очень ограниченную раннюю воспалительную реакцию, и она успешно распространяется по органам, прежде чем вызвать устойчивую воспалительную реакцию. Таким образом, при контакте макроорганизма с патогеном происходит значительное повышение уровня антимикробных пептидов, в том числе и *DEFB1* [15].

Исследуя встречаемость аллелей и генотипов генов *DEFB1-20G>A*, *DEFB1-52G>A* у больных с

развитием внебольничных пневмоний, установлено преобладание -20A- аллелей и генотипов -20A/A и -52A/A генов *DEFB1* у пациентов с развитием тяжелой пневмонии на фоне COVID-19-инфекции, что может свидетельствовать об их влиянии на неблагоприятное течение воспалительного процесса и высокий риск развития тяжелой пневмонии у пациентов призывного возраста (OR = 1,69 (0,99-2,89); 4,06 (2,32-7,11); 3,53 (1,58-7,87) и 6,56 (2,85-15,11) соответственно, $p < 0,001$).

Установлено, что ген *DEFB1* расположен в хромосоме 8p22 и состоит из двух экзонов. Первый экзон кодирует богатую лейцином последовательность – Про и сигнал. Второй экзон кодирует зрелый пептид. Полиморфизмы этого гена могут встречаться в разных участках 50 не-кодирующих областей первого экзона, включая -52G>A (rs1799946), -44C>G (rs1800972) и -20G>A (rs11362) [7, 13]. При исследованиях ча-

ТАБЛИЦА 1. СОДЕРЖАНИЕ *DEFB1* В СЫВОРОТКЕ КРОВИ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ГЕНОТИПА SNP, Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$), нг/мл

TABLE 1. CONTENT OF *DEFB1* IN THE BLOOD SERUM DEPENDING ON THE SNP GENOTYPE, Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$), ng/mL

	Контроль Control (n = 86)	COVID-19 (n = 80)	ОРИ Acute respiratory infection (n = 80)
<i>DEFB1-20G>A</i>			
Генотип Genotype G/G	1,86 (1,43-2,45) (n = 37)	2,73 (2,31-3,84) (n = 36)	2,31 (2,13-2,90) (n = 38)
Генотип Genotype G/A	2,12 (1,62-2,47) (n = 30) $p = 0,465$	2,41 (2,16-2,52) (n = 16) $p = 0,042$	2,46 (2,34-2,65) (n = 24) $p = 0,443$
Генотип Genotype A/A	1,67 (1,12-2,45) (n = 19) $p = 0,417$ $p_1 = 0,139$	3,96 (2,71-4,91) (n = 28) $p = 0,001$ $p_1 = 0,0001$	3,32 (2,86-3,41) (n = 18) $p = 0,002$ $p_1 = 0,0001$
<i>DEFB1-52G>A</i>			
Генотип Genotype G/G	1,63 (1,23-2,13) (n = 48)	2,62 (2,24-3,81) (n = 38)	2,37 (2,09-2,92) (n = 42)
Генотип Genotype G/A	1,86 (1,57-2,13) (n = 22) $p = 0,136$	2,52 (2,42-4,90) (n = 12) $p = 0,356$	2,35 (2,30-2,75) (n = 16) $p = 0,638$
Генотип Genotype A/A	2,61 (2,48-2,66) (n = 16) $p = 0,0001$ $p_1 = 0,0001$	3,84 (2,83-4,71) (n = 30) $p = 0,0001$ $p_1 = 0,0001$	2,93 (2,48-3,21) (n = 22) $p = 0,01$ $p_1 = 0,003$

Примечание. p – статистическая значимость различий с генотипом G/G при $p \leq 0,05$; p_1 – статистическая значимость различий с генотипом G/A при $p \leq 0,05$.

Note. p, statistical significance of differences with normal homozygous at $p \leq 0.05$; p_1 , statistical significance of differences with heterozygosity at $p \leq 0.05$.

стоты носительства SNP гена *DEFB1* у пациентов выявлено значительное преобладание генотипа GG *DEFB1* (-20G/A по сравнению с контрольной группой, а также аллеля G, который увеличивал вероятность возникновения патологии примерно в 60 раз. Однако в контрольной группе авторы продемонстрировали, что генотип *DEFB1* (-20G/A) AA и аллель A были значительно частыми и считались защищающими [13, 14]. В нашем исследовании не отмечено ни одного летального случая течения тяжелых пневмоний, кроме того, оценивая изменения в легких после проведения КТ по визуальной шкале, площадь поражения не превышала значений КТ-2, что также может говорить о протекторном эффекте -20A- аллелей и генотипов -20A/A и -52A/A генов *DEFB1*.

Определяя влияние генотипов исследуемых полиморфизмов генов на уровень *DEFB1*, отмечено статистически значимое его увеличение при носительстве генотипа -20A/A и -52A/A (табл. 1).

Установленные нами закономерности экспрессии согласуются с данными Ochoa-Ramírez L.A. и соавт., которые исследовали 171 мексиканского пациента с витилиго. Они обнаружили, что концентрации *DEFB1* у пациентов с носительством генотипа GG были ниже [12].

Вирусная инфекция также может индуцировать экспрессию дефензина. Например, риновирус человека индуцирует *DEFB2* в первичных культурах эпителиальных клеток человека. Хотя *DEFB2* не оказывает прямого противовирусного действия на вирус, у людей, инфицированных риновирусом человека, наблюдались повышенные уровни *DEFB2* при промывании носа, что позволяет предположить релевантность результатов *in vitro* физиологическим. При внутривенном инфицировании культивируемых мононуклеарных клеток периферической крови экспрессия *DEFB1* увеличивается в моноцитах и дендритных клетках. Многие вирусные патогены индуцируют экспрессию DEF в слизистой оболочке верхних и нижних дыхательных путей, что может играть важную роль в иницировании противовирусного ответа [8].

Иммуномодулирующая активность дефензинов также наблюдалась в исследованиях вирусного патогенеза *in vivo*. Снижение выживаемости мышей с нокаутом *DEFB1*, инфицированных вирусом, коррелировало с повышенной инфильтрацией иммунных клеток и периваскулярным отеком по сравнению с контрольными мышами. Эквивалентные вирусные нагрузки в легких мышей обоих генотипов позволяют предположить, что основным эффектом в этой модели

является иммуномодулирующий, а не непосредственно противовирусный. Мыши, инфицированные коронавирусом с тяжелым острым респираторным синдромом и получавшие лечение, продемонстрировали снижение патологии легких и увеличение выживаемости по сравнению с контрольной группой, не получавшей лечения. Зафиксировано, что лечение приводило не к снижению титров вируса, а скорее к более раннему увеличению цитокинов. Также терапия не оказывала прямого влияния на коронавирусную инфекцию с тяжелым острым респираторным синдромом *in vitro*. Оба исследования являются примерами косвенного воздействия дефензинов на вирусный патогенез, однако необходимы дальнейшие исследования, чтобы понять, какая из иммуномодулирующих или других активностей дефензинов преобладает *in vivo* [8].

Большая часть нашего понимания противовирусной активности дефензина основана на анализах *in vitro*, в которых очищенный дефензин смешивают с вирусами, бактериями или клетками млекопитающих. Однако это не дает точного представления о том, что происходит *in vivo*. Необходимо уделять больше внимания элементам естественно секретируемых дефензинов, их комбинациям, которые встречаются в определенных анатомических локализациях, и взаимодействию между дефензинами и окружающей средой, которые могут изменять их активность [8].

Таким образом, дефензины играют решающую роль в реакции хозяина на инфекцию, непосредственно взаимодействуя с вирусом и путем модуляции врожденных и адаптивных иммунных реакций. Хотя дефензины были широко изучены, многие открытые вопросы все еще остаются.

Выводы

1. У пациентов призывного возраста с внебольничными пневмониями регистрируется повышение концентрации *DEFB1* с наибольшими значениями в группе с тяжелыми пневмониями при COVID-19.

2. Носительство генотипа -20A/A и генотипа -52A/A гена *DEFB1* способствует увеличению содержания *DEFB1*.

3. Наличие -20A- аллелей и генотипов -20A/A и -52A/A генов *DEFB1* ассоциировано с тяжелым течением внебольничных пневмоний у пациентов призывного возраста на фоне COVID-19-инфекции.

Список литературы / References

1. Внебольничная пневмония у взрослых: клинические рекомендации. М., 2021. 117 с. Режим доступа: cr.minzdrav.gov.ru/recomend/654_1. (Дата обращения: 10.02.2024). [Community-acquired pneumonia in adults: Clinical recommendations. Moscow, 2021. 117 p. Available at: https://cr.minzdrav.gov.ru/recomend/654_1. (Access date: February 10, 2024).
2. Куликов П.В., Жоголев С.Д., Аминев Р.М., Жоголев К.Д., Кузин А.А., Рубова С.Р., Горенчук А.Н., Михеева Е.А. Эпидемиологическая и этиологическая характеристика внебольничной пневмонии у военнослужащих по призыву в современный период. Сравнительная оценка эффективности пневмококковых вакцин // Журнал инфектологии, 2019. Т. 11, № 2. С. 116-123. [Kulikov P.V., Zhogolev S.D., Aminev R.M., Zhogolev K.D., Kuzin A.A., Rubova S.R., Gorenchuk A.N., Mikheeva E.A. Epidemiological and etiological characteristics of community-acquired pneumonia in conscripts in the modern period. Comparative evaluation of the effectiveness of pneumococcal vaccines. *Zhurnal infektologii = Journal of Infectology*, 2019, Vol. 11, no. 2, pp. 116-123. (In Russ.)]
3. Мудров В.А. Алгоритмы статистического анализа качественных признаков в биомедицинских исследованиях с помощью пакета программ SPSS // Забайкальский медицинский вестник, 2020. № 1. С. 151-163. [Mudrov V.A. Statistical analysis algorithms of qualitative features in biomedical research using the SPSS software package. *Zabaykalskiy meditsinskiy vestnik = Transbaikalian Medical Bulletin*, 2020, no. 1, pp. 151-163. (In Russ.)]
4. Профилактика, диагностика и лечение новой коронавирусной инфекции (COVID-19): временные методические рекомендации. Версия 18 (26.10.2023). М., 2023. 250 с. Режим доступа: https://static0.minzdrav.gov.ru/system/attachments/attaches/000/064/610/original/BMP_COVID-19_V18.pdf. (Дата обращения: 10.02.2024). [Prevention, diagnosis and treatment of new coronavirus infection (COVID-19): Temporary methodological recommendations. Version 18 (10/26/2023). Moscow, 2023, 250 p. Available at: https://static0.minzdrav.gov.ru/system/attachments/attaches/000/064/610/original/BMP_COVID-19_V18.pdf (Access date: February 10, 2024).
5. Салухов В.В., Харитонов М.А., Иванов В.В., Журкин М.А., Чумак Б.А., Николаев А.В., Рудаков Ю.В., Асямов К.В., Богомолов А.Б., Чугунов А.А., Мальцева О.А. Современные аспекты этиологической диагностики, клиники и лечения тяжелой внебольничной пневмонии у военнослужащих // Вестник Российской военно-медицинской академии, 2020. Т. 69, № 1. С. 45-52. [Salukhov V.V., Haritonov M.A., Ivanov V.V., Zhurkin M.A., Chumak B.A., Nikolaev A.V., Chugunov A.A., Maltseva O.A. Modern Aspects of Etiological Diagnostics, Clinical Picture and Treatment of Severe Community-Acquired Pneumonia in Soldiers. *Vestnik Rossiyskoy voenno-meditsinskoy akademii = Bulletin of the Russian Military Medical Academy*, 2020, Vol. 22, no. 1, pp. 45-52. (In Russ.)]
6. Харитонов М.А., Салухов В.В., Крюков Е.В., Паценко М.Б., Рудаков Ю.В., Богомолов А.Б., Иванов В.В., Минаков А.А. Вирусные пневмонии: новый взгляд на старую проблему (обзор литературы) // Медицинский совет, 2021. № 16. С. 60-77. [Kharitonov M.A., Salukhov V.V., Kryukov E.V., Patsenko M.B., Rudakov Yu.V., Bogomolov A.B., Ivanov V.V., Minakov A.A. Viral pneumonia: a new look at an old problem (review). *Meditsinskiy Sovet = Medical Council*, 2021, no. 16, pp. 60-77. (In Russ.)]
7. Farag A.G.A., Shoeib M.A.A., Labeeb A.Z., Sleem A.S., Khallaf H.M.A., Khalifa A.S., Elshaib M.E., Elnaidany N.F., Hanout H.M.A. Human beta-defensin 1 circulating level and gene polymorphism in non-segmental vitiligo Egyptian patients. *An. Bras. Dermatol.*, 2023, Vol. 98, no. 2, pp. 181-188.
8. Holly M.K., Diaz K., Smith J.G. Defensins in viral infection and pathogenesis. *Annu. Rev. Virol.*, 2017, Vol. 4, no. 1, pp. 369-391.
9. Inui S., Fujikawa A., Jitsu M., Kunishima N., Watanabe S., Suzuki Y., Umeda S., Uwabe Y. Chest CT findings in cases from the cruise ship diamond princess with coronavirus disease (COVID-19). *Radiol. Cardiothorac. Imaging*, 2020, Vol. 2, no. 2, e200110. doi: 10.1148/ryct.2020200110.
10. Kirst M.E., Baker D., Li E., Abu-Hasan M., Wang G.P. Upper versus lower airway microbiome and metagenome in children with cystic fibrosis and their correlation with lung inflammation. *PLoS One*, 2019, Vol. 14, no. 9, e0222323. doi: 10.1371/journal.pone.0222323.
11. Leiva-Juárez M.M., Kolls J.K., Evans S.E. Lung epithelial cells: therapeutically inducible effectors of antimicrobial defense. *Mucosal Immunol.*, 2018, Vol. 11, no. 1, pp. 21-34.
12. Ochoa-Ramírez L.A., Becerra-Loaiza D.S., Díaz-Camacho S.P., Muñoz-Estrada V.F., Ríos-Burgueño E.R., Prado-Montes de Oca E., Rangel-Villalobos H., Velarde-Félix J.S. Association of human beta-defensin 1 gene polymorphisms with nonsegmental vitiligo. *Clin. Exp. Dermatol.*, 2019, Vol. 44, no. 3, pp. 277-282.
13. Polesello V., Zupin L., Di Lenarda R., Biasotto M., Pozzato G., Ottaviani G., Gobbo M., Crovella S., Segat L. DEFB1 polymorphisms and salivary hBD-1 concentration in oral lichen planus patients and healthy subjects. *Arch. Oral. Biol.*, 2017, Vol. 73, pp. 161-165.

14. Salem R.M., Abdelrahman A.M.N., Abd El-Kareem H.M., Seif M. DEFB1 gene polymorphisms modify vitiligo extent and response to NB-UVB phototherapy. *Dermatol. Ther.*, 2021, Vol. 34, no. 3, e14921. doi: 10.1111/dth.14921.
15. Sharma L., Feng J., Britto C.J., Dela C.C.S. Mechanisms of epithelial immunity evasion by respiratory bacterial pathogens. *Front. Immunol.*, 2020. Vol. 11, 91. doi: 10.3389/fimmu.2020.00091.

Авторы:

Загалаев Б.Т. — аспирант кафедры детских инфекций ФГБОУ ВО «Читинская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения РФ, г. Чита, Забайкальский край, Россия

Миromanова Н.А. — д.м.н., доцент, заведующая кафедрой детских инфекций ФГБОУ ВО «Читинская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения РФ, г. Чита, Забайкальский край, Россия

Миromanов А.М. — д.м.н., профессор, заведующий кафедрой травматологии и ортопедии ФГБОУ ВО «Читинская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения РФ, г. Чита, Забайкальский край, Россия

Authors:

Zagalaev B.T., Postgraduate Student, Department of Pediatric Infections, Chita State Medical Academy, Chita, Transbaikal region, Russian Federation

Miromanova N.A., PhD, MD (Medicine), Associate Professor, Head, Department of Pediatric Infections, Chita State Medical Academy, Chita, Transbaikal region, Russian Federation

Miromanov A.M., PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Department of Traumatology and Orthopedy, Chita State Medical Academy, Chita, Transbaikal region, Russian Federation

Поступила 12.02.2024
Отправлена на доработку 13.01.2024
Принята к печати 09.03.2024

Received 12.02.2024
Revision received 13.01.2024
Accepted 09.03.2024

АНАЛИЗ СОДЕРЖАНИЯ РАСТВОРИМОГО ТРОМБОМОДУЛИНА В СЫВОРОТКЕ КРОВИ У ПАЦИЕНТОВ С ФИБРИЛЛЯЦИЕЙ ПРЕДСЕРДИЙ НЕКЛАПАННОГО ГЕНЕЗА В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ПОЛА

**Огуркова О.Н., Суслова Т.Е., Лугачева Ю.Г., Драгунова М.А.,
Ситкова Е.С., Баталов Р.Е.**

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

Резюме. Исследования последних лет демонстрируют повышенный интерес к разработке новых лабораторных методов оценки риска возникновения ТЭО при фибрилляции предсердий. Одним из биомаркеров, проявляющим важные противовоспалительные, антикоагулянтные и антифибринолитические свойства и участвующим в поддержании сосудистого гомеостаза, является растворимый тромбомодулин (sTM).

Цель — исследование содержания растворимого тромбомодулина в сыворотке крови у больных с фибрилляцией предсердий неклапанного генеза, получающих антикоагулянтную терапию и имеющих в анамнезе тромботические осложнения и пациентов с фибрилляцией предсердий без тромботических осложнений.

В исследование были включены 60 пациентов, старше 18 лет с диагнозом «фибрилляция предсердий», верифицированным на основании клинических рекомендаций, получающих антикоагулянтную терапию. Из них у 21 пациента произошло развитие тромботических осложнений (ТО) на фоне адекватной антикоагулянтной терапии, а также в исследование было включено 22 здоровых добровольца. Исследование растворимого тромбомодулина (нг/мл) проводилось методом иммуноферментного анализа с использованием оборудования ЦКП «Медицинская геномика» Томского НИМЦ.

Все обследованные пациенты были разделены на 2 группы: группа пациентов с фибрилляцией предсердий без тромботических осложнений и группа пациентов с фибрилляцией предсердий с возникшими тромботическими осложнениями. Содержание растворимого тромбомодулина в сыворотке крови у пациентов с возникшими тромботическими осложнениями было снижено по сравнению как с группой пациентов без ТО, так и с группой практически здоровых добровольцев. Анализ уровня sTM у мужчин и женщин в группах пациентов и у здоровых добровольцев показал, что наиболее низ-

Адрес для переписки:

Огуркова Оксана Николаевна
Научно-исследовательский институт кардиологии
634012, Россия, г. Томск, ул. Киевская, 111а.
Тел.: 8 (960) 975-45-44.
E-mail: ogurkovaon@mail.ru

Address for correspondence:

Oksana N. Ogurkova
Cardiology Research Institute
111a Kievskaya St
Tomsk
634012 Russian Federation
Phone: +7 (960) 975-45-44.
E-mail: ogurkovaon@mail.ru

Образец цитирования:

О.Н. Огуркова, Т.Е. Суслова, Ю.Г. Лугачева,
М.А. Драгунова, Е.С. Ситкова, Р.Е. Баталов
«Анализ содержания растворимого тромбомодулина
в сыворотке крови у пациентов с фибрилляцией
предсердий неклапанного генеза в зависимости от
пола» // Медицинская иммунология, 2025. Т. 27, № 1.
С. 215-224. doi: 10.15789/1563-0625-AOS-2981

© Огуркова О.Н. и соавт., 2025

Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

O.N. Ogurkova, T.E. Suslova, Yu.G. Lugacheva,
M.A. Dragunova, E.S. Sitkova, R.E. Batalov "Analysis
of soluble thrombomodulin contents in blood serum of patients
with non-valvular atrial fibrillation: Gender dependence",
Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya,
2025, Vol. 27, no. 1, pp. 215-224.
doi: 10.15789/1563-0625-AOS-2981

© Ogurkova O.N. et al., 2025

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

DOI: 10.15789/1563-0625-AOS-2981

кие значения данного биомаркера в сыворотке крови отмечены у женщин из группы пациентов с фибрилляцией предсердий с ТО по сравнению с женщинами из группы пациентов без тромбозов и со здоровыми женщинами. Также отмечается сниженное содержание растворимого тромбомодулина у мужчин с тромбозами по сравнению со здоровыми мужчинами. Сравнительный анализ уровней sTM у женщин и мужчин во всех группах не выявил статистически значимых различий.

В изученной группе больных с фибрилляцией предсердий неклапанного генеза, получающих антикоагулянтную терапию, было отмечено снижение растворимого тромбомодулина в подгруппе пациентов с возникшими тромботическими осложнениями.

Ключевые слова: фибрилляция предсердий, растворимый тромбомодулин, тромботические осложнения, воспаление, биомаркеры

ANALYSIS OF SOLUBLE THROMBOMODULIN CONTENTS IN BLOOD SERUM OF PATIENTS WITH NON-VALVULAR ATRIAL FIBRILLATION: GENDER DEPENDENCE

Ogurkova O.N., Suslova T.E., Lugacheva Yu.G., Dragunova M.A., Sitkova E.S., Batalov R.E.

Cardiology Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences Tomsk, Russian Federation

Abstract. Recent studies have demonstrated increased interest in development of new laboratory methods for assessing the risk of thromboembolic complications in atrial fibrillation. Soluble thrombomodulin (sTM) is one of the biomarkers that exhibit important anti-inflammatory, anticoagulant and antifibrinolytic properties and are involved in maintenance of vascular homeostasis. Our objective was to study the contents of soluble thrombomodulin (sTM) in blood serum of the patients with non-valvular atrial fibrillation receiving anticoagulant therapy with a history of thrombotic complications *versus* a group of patients with atrial fibrillation without thrombotic complications. The study included 60 patients over 18 years of age diagnosed with atrial fibrillation, which was verified according to clinical recommendations, who received anticoagulant therapy. Of this group, 21 patients developed thrombotic complications during adequate anticoagulant therapy. 22 healthy volunteers were also included into the study. Evaluation of soluble thrombomodulin in blood serum was carried out by ELISA technique using the facilities at the Center for Collective Use "Medical Genomics" of the Tomsk National Research Medical Center. All the examined patients were divided into 2 groups: a group of patients with atrial fibrillation without thrombotic complications (TC), and a group of patients with atrial fibrillation who developed TC. The sTM content in blood serum of patients with thrombotic complications was reduced, when compared with results obtained in patients without thrombotic complications, and among healthy volunteers. Analysis of the sTM level in men and women in groups of patients and in healthy volunteers showed that the values of this serum biomarker were lower in female patients with atrial fibrillation and TC, when compared with women from the group of patients without TC and with healthy females. Moreover, the content of soluble thrombomodulin prove to be reduced in men with thrombosis compared to healthy males. A comparative analysis of sTM levels in women and men in all groups did not reveal statistically significant differences. In the studied group of patients with non-valvular atrial fibrillation receiving anticoagulant therapy, a decrease in sTM levels was noted in the subgroup of patients with TC.

Keywords: atrial fibrillation, thrombosis risk, thrombomodulin levels, blood serum

Введение

Фибрилляция предсердий (ФП) является одним из наиболее распространенных нарушений сердечного ритма [7]. В последние годы достигнут значительный прогресс в выявлении ФП и ее

лечении. Известно, что фибрилляция предсердий может приводить к протромботическому или гиперкоагуляционному состоянию с аномальным гемостазом, фибринолизом и эндотелиальной дисфункцией [2]. Повышение летальности,

ассоциирующееся с наличием ФП, наблюдается практически во всех группах больных: с ишемической болезнью сердца, артериальной гипертензией, а также у лиц с изолированной формой ФП [10]. Риск развития тромбоэмболических осложнений (ТЭО), в том числе ишемического инсульта у пациентов с ФП в 5 раз превышает таковой у пациентов с синусовым ритмом, поэтому одним из основных направлений лечения пациентов с данным нарушением ритма является профилактика ТЭО [1]. Причины значительного эмбологенного потенциала фибрилляции предсердий разнообразны и сложны. Пероральные антикоагулянты позволяют уменьшить риск инсульта при ФП, однако частота инсультов и периферических тромбоэмболий на фоне использования антикоагулянтов остается достаточно высокой. Антитромботическая профилактика при фибрилляции предсердий является важной задачей для изучения, поскольку проблема ТЭО остается не решенной. В последние годы активно изучаются взаимосвязи между тромбозом и воспалением, так как известно, что не только воспаление сопровождается повышением активности системы свертывания крови, но и тромбообразование в свою очередь приводит к активации воспаления [3]. Одним из биомаркеров, проявляющим важные противовоспалительные, антикоагулянтные и антифибринолитические свойства и участвующим в поддержании сосудистого гомеостаза, является тромбомодулин (ТМ). Тромбомодулин представляет собой интегральный мембранный белок, рецептор тромбина, находящийся на клетках эндотелия кровеносных сосудов и участвующий в системе антикоагуляции, который способствует опосредованной тромбином активации протеина С. Помимо антитромботического и противовоспалительного эффекта, тромбомодулин известен своим влиянием на клеточную пролиферацию и адгезию. Экспрессия ТМ жестко регулируется для обеспечения быстрой и локализованной гемостатической и воспалительной реакции на повреждение [14, 15]. Понимание патофизиологической роли противовоспалительной и протромботической активации у пациентов с фибрилляцией предсердий способствует изучению биомаркеров в качестве метода индивидуальной оценки риска возникновения тромбоэмболических осложнений. Биомаркеры являются надежным, безопасным и объективным средством лабораторной диагностики, контроля коррекции лечения, прогнозирования и стратификации риска развития ТЭО. Исследования последних лет демонстрируют повышенный интерес к разработке новых лабораторных

методов оценки риска возникновения ТЭО. Однако среди достаточно большого количества биомаркеров пока ни один не удовлетворяет условиям чувствительного специфичного маркера в оценке вероятности развития ТЭО у пациентов с фибрилляцией предсердий неклапанного генеза, получающих антикоагулянтную терапию.

Цель исследования — исследование содержания растворимого тромбомодулина в сыворотке крови у больных с фибрилляцией предсердий неклапанного генеза, получающих антикоагулянтную терапию и имеющих в анамнезе тромботические осложнения и пациентов с фибрилляцией предсердий без тромботических осложнений.

Материалы и методы

Проводимое клиническое исследование является одноцентровым проспективным нерандомизированным наблюдательным и реализовано на базе Научно-исследовательского института кардиологии г. Томска. В исследование были включены 60 пациентов старше 18 лет с диагнозом «фибрилляция предсердий», верифицированным на основании клинических рекомендаций (рекомендации ESC 2020 по диагностике и лечению фибрилляции предсердий), подтвержденным по ЭКГ, суточном мониторинге ЭКГ, получающих антикоагулянтную терапию. Из них у 21 пациента (35%) произошло развитие тромботических осложнений на фоне адекватной антикоагулянтной терапии. Не включались пациенты с противопоказаниями к приему антикоагулянтов / нерегулярной терапией, с хронической сердечной недостаточностью со снижением фракции выброса левого желудочка менее 40% и значительной дилатацией полостей сердца; клапанной патологией сердца; беременные или женщины детородного возраста, планирующие беременность на время проведения исследования, а также недееспособные пациенты по психоневрологическим состояниям. Все пациенты находились на постоянной терапии антикоагулянтами в рекомендованной дозе. Приверженность пациентов к лечению оценивалась путем интервьюирования и анализа МНО. Группой сравнения были здоровые добровольцы (n = 22) без указаний на тромбозы в анамнезе и терапию антикоагулянтами, сердечно-сосудистую патологию и коморбидные состояния, сопряженные с синдромом гиперкоагуляции. При наличии показаний и при отсутствии противопоказаний — проводилось эндокардиальное ЭФИ и РЧА с использованием нефлюороскопической навигационной системы CARTO 3 EP (Biosense Webster, США). Все пациенты и здоровые добро-

вольцы дали свое письменное информированное согласие на включение в исследование. Исследование растворимого тромбомодулина (sTM) (нг/мл) проводилось методом иммуоферментного анализа с помощью диагностических наборов фирмы Biomedica GmbH (Австрия), с использованием оборудования Центра коллективного пользования «Медицинская геномика» Томского НИМЦ. Статистическую обработку полученных результатов проводили с помощью пакета программ Statistica 10.0 (StatSoft Inc., США). Количественные данные представлены в виде медианы (Me) и процентилей ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$), качественные признаки — в виде n, % (число больных с данным признаком, доля от их количества в группе). Статистическую значимость различий между двумя независимыми количественными переменными оценивали, используя U-критерий Манна-Уитни (Mann-Whitney). Статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$. Для проведения корреляционного анализа был использован коэффициент ранговой корреляции Спирмена (Spearman R).

Результаты и обсуждение

Все обследованные пациенты были разделены на группы: группа I — пациенты с фибрилляцией предсердий без тромботических осложнений, группа II — пациенты с фибрилляцией предсердий с возникшими тромботическими осложнениями. Далее группы были разделены по половому признаку — группа А — женщины и группа В — мужчины. Пациенты исследуемых групп были сопоставимы по возрасту, полу, функциональному классу ХСН, наличию ИБС, артериальной гипертензии. Основные клинико-анамнестические параметры пациентов исследуемых групп представлены в таблице 1. Среди всех включенных в исследование пациентов тромботические осложнения при ФП без поражения клапанного аппарата сердца были следующие: тромбоз ушка левого предсердия отмечен у 10 пациентов (17%), спонтанное эхоконтрастирование II и более степени у 5 больных (8,3%), кардиоэмболический инсульт — у 3 пациентов (5%), тромбоз периферических артерий (1 (2%), тромбоз на электродах ЭКС (2 (4%)). Пациенты исследуемых групп также были сопоставимы по частоте применения основных групп лекарственных препаратов. Принимаемая терапия на момент включения в исследование соответствовала современным рекомендациям и включала в себя стандартную общепринятую антиаритмическую и антикоагулянтную терапию, а также терапию основного сердечно-сосудистого

заболевания (бета-адреноблокаторы, статины, ингибиторы ангиотензинпревращающего фермента, диуретики), подробная характеристика представлена в таблице 2.

Исследование содержания растворимого тромбомодулина в сыворотке крови продемонстрировало, что медиана содержания sTM у пациентов с возникшими тромботическими осложнениями Me — 2,09 (1,75-2,4) была снижена по сравнению как с группой пациентов без ТО Me — 2,54 (2,01-2,89), так и с группой практически здоровых добровольцев Me — 2,84 (2,3-3,31) $p \leq 0,005$, данные представлены на рисунке 1. С каждым годом появляется все больше данных о половых особенностях сердечно-сосудистых заболеваний и предрасполагающих к их развитию факторах. На сегодняшний день хорошо известно, что мужчины и женщины с фибрилляцией предсердий отличаются по большинству клинико-демографических характеристик. Такие факторы, как дифференциально экспрессируемые биомаркеры крови у женщин и мужчин могут играть определенную роль в возникновении тромбозомболических осложнений при фибрилляции предсердий. Исследование содержания sTM у мужчин и женщин в группах пациентов и у здоровых добровольцев показало, что наиболее низкие значения данного биомаркера в сыворотке крови отмечены у женщин из группы пациентов с фибрилляцией предсердий с ТО Me — 1,91 (1,80-2,53) по сравнению с женщинами из группы пациентов без тромботических осложнений Me — 2,65 (1,99-2,92) и со здоровыми женщинами Me — 2,60 (1,83-3,07), $p \leq 0,05$. Также отмечается сниженное содержание растворимого тромбомодулина у мужчин с тромбозами по сравнению со здоровыми мужчинами Me — 2,15 (1,94-2,50) и 3,03 (2,55-3,31) соответственно, $p \leq 0,05$. Однако сравнительный анализ уровней растворимого тромбомодулина у женщин и мужчин во всех группах больных с фибрилляцией предсердий и у здоровых добровольцев не выявил статистически значимых различий, данные представлены на рисунке 2.

Свертывание крови в организме контролируется несколькими естественными антикоагулянтными системами, которые в норме доминируют над прокоагулянтными. Одним из самых важных путей в антикоагулянтной системе является путь протеина С. Его основными компонентами являются протеин С, тромбомодулин, рецептор эндотелиальных клеток для протеина С (EPCR) и протеин S [15, 16]. Тромбин в каскаде коагуляции активирует тромбоциты и превращает кофакторы свертывания V и VIII в их активные формы — Va

ТАБЛИЦА 1. КЛИНИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ПАЦИЕНТОВ С ФИБРИЛЛЯЦИЕЙ ПРЕДСЕРДИЙ

TABLE 1. CLINICAL CHARACTERISTICS OF PATIENTS WITH ATRIAL FIBRILLATION

Параметры Parameters	Женщины без тромботических осложнений Woman without thrombotic complications (n = 18)	Мужчины без тромботических осложнений Man without thrombotic complications (n = 21)	Женщины с тромботическими осложнениями Woman with thrombotic complications (n = 10)	Мужчины с тромботическими осложнениями Man with thrombotic complications (n = 11)
Возраст, годы Me (Q_{0,25}-Q_{0,75}) Age, years Me (Q _{0,25} -Q _{0,75})	66,5 (61,0-71,0)	56,5 (48,0-64,0)	66,0 (63,0-74,0)	68,0 (60,0-73,0)
Размер левого предсердия, мм Me (Q_{0,25}-Q_{0,75}) Left atrium size, mm Me (Q _{0,25} -Q _{0,75})	39,0* (37,0-45,0)	41,0* (40,0-44,5)	45,5 (40,0-48,0)	47,0 (45,0-50,0)
Форма фибрилляции предсердий Form of atrial fibrillation, n(%): пароксизмальная форма paroxysmal form персистирующая форма persistent form	8 (44,4) 10 (55,6)	10 (47,6) 11 (52,4)	4 (40) 6 (60)	3 (27,3) 8 (72,7)
Артериальная гипертензия, n (%) Arterial hypertension, n (%)	13 (72,2)	14 (66,7)	2 (20)	1 (9,1)
Ишемическая болезнь сердца, n (%) Coronary heart disease, n (%)	11 (61,1)	10 (47,6)	5 (50)	9 (81,8)
Функциональный класс СН, n (%) Functional class of heart failure (NYHA), n (%) I II III	5 (27,8) 9 (50) —	4 (19,0) 8 (38,1) 2 (9,5)	1 (10) — —	1 (9,0) 4 (36,4) —
Тромботические осложнения Thrombotic complications				
Тромбоз ушка ЛП, n (%) Left atrial auricular thrombosis, n (%)	—	—	2 (20)	8 (72,7)
Спонтанное эхоконтрастирование, n (%) Spontaneous echocontrasting, n (%)	—	—	5 (50)	—
Тромбоз правого предсердия, n (%) Right atrial thrombosis, n (%)	—	—	1 (10)	—
Инсульт кардиоэмболический, n (%) Cardioembolic stroke, n (%)	—	—	—	3 (27,3)
Тромб на электроде ЭКС, n (%) Right ventricular electrode thrombus, n (%)	—	—	—	2 (18,2)
Тромбоз периферических артерий, n (%) Peripheral artery thrombosis, n (%)	—	—	—	2 (18,2)

Примечание. Данные представлены в виде абсолютного значения (%) и медианы (Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})) для непрерывных ненормально распределенных переменных. * – статистическая значимость различий между группами пациентов с фибрилляцией предсердий без и с тромботическими осложнениями (p < 0,05).

Note. Data are presented as the % and median (Me (Q_{0,25}-Q_{0,75})) for continuous non-normally distributed variables. *, statistical significance of differences between groups of patients with atrial fibrillation without vs with thrombotic complications (p < 0.05).

ТАБЛИЦА 2. МЕДИКАМЕНТОЗНАЯ ТЕРАПИЯ ВО ВРЕМЯ ИССЛЕДОВАНИЯ

TABLE 2. MEDICATION THERAPY AT THE TIME OF THE STUDY

Параметры Parameters	Пациенты без тромботических осложнений Группа I Patients without thrombotic complications Group 1 (n = 39)	Пациенты с тромботическими осложнениями Группа II Patients with thrombotic complications Group 2 (n = 21)
Антикоагулянтная терапия: Anticoagulant therapy:		
Варфарин, n (%) Warfarin, n (%)	8 (20)	8 (38)
Ксарелто, n (%) Xarelto, n (%)	19 (48)	5 (24)
Прадакса, n (%) Pradaxa, n (%)	1 (2)	1 (5)
Эликвис, n (%) Eliquis, n (%)	11 (28)	8 (38)
Антиагрегантная терапия: Antiaggregant therapy:		
Аспирин, n (%) Aspirin, n (%)	—	2 (9)
Клопидогрель, n (%) Clopidogrel, n (%)	—	2 (9)
Нет, n (%) None, n (%)	39 (100)	15 (71)
Статины, n (%) Statins, n (%)	33 (85)	13 (85)
Бета-блокаторы, n (%) Beta-blockers, n (%)	12 (31)	13 (62)
Ингибиторы АПФ ACE inhibitors	25 (64)	17 (81)
Диуретики Diuretics	5 (13)	3 (14)
Антиаритмическая терапия: Antiarrhythmic therapy:		
Пропанорм, n (%) Propanorm, n (%)	3 (8)	1 (5)
Кордарон, n (%) Cordarone, n (%)	6 (15)	7 (33)
Соталекс, n (%) Sotalex, n (%)	5 (13)	4 (19)

Примечание. Данные представлены в абсолютном значении, (%).

Note. Data are presented as the absolute value, (%).

и VIIa. При связывании с тромбомодулином, тромбин-тромбомодулиновый комплекс активирует белок C, который циркулирует в плазме в виде профермента и который связывается с протеином S и расщепляет факторы коагуляции Va и VIIa. Комплекс тромбин-тромбомодулин также способен активировать активируемый тромбином ингибитор фибринолиза (TAFI), который затем противодействует фибринолизу (рис. 3) [15]. Тромбомодулин широко экспрессируется на по-

верхности эндотелиальных клеток, и в присутствии цитокинов, активированных нейтрофилов и макрофагов, эндотелиальный тромбомодулин расщепляется ферментативно, высвобождая растворимые фрагменты, которые циркулируют в крови. Растворимый тромбомодулин также оказывает ингибирующее действие на активацию тромбоцитов тромбином. Растворимая форма тромбомодулина считается маркером повреждения эндотелия и сохраняет свои антикоагулянт-

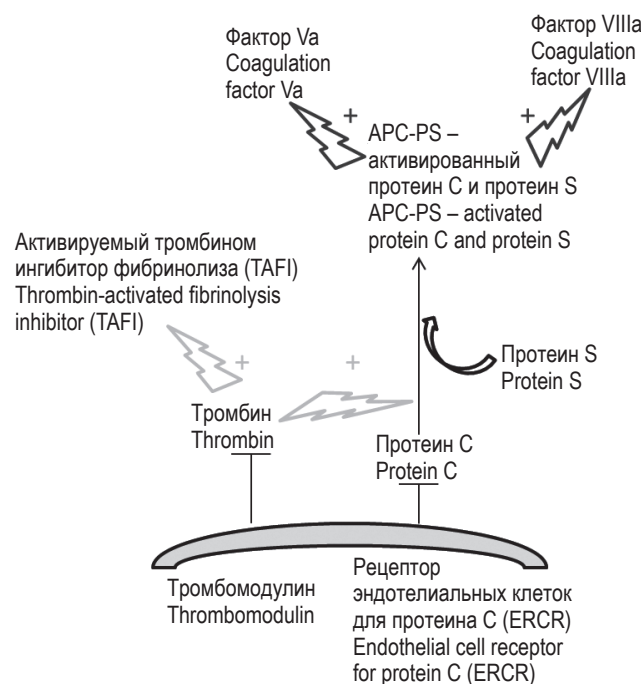


Рисунок 1. Антикоагулянтная роль тромбомодулина

Примечание. APC-PS – активированный протеин С и протеин S; рецептор эндотелиальных клеток для протеина С (EPCR); тромбин в каскаде коагуляции превращает кофакторы свертывания V и VIII в их активные формы – Va и VIIIa. При связывании с тромбомодулином тромбин-тромбомодулиновый комплекс активирует белок С, который связывается с протеином S и расщепляет факторы коагуляции Va и VIIIa. Комплекс тромбин-тромбомодулин также способен активировать активируемый тромбином ингибитор фибринолиза (TAFI), который затем противодействует фибринолизу.

Figure 1. Anticoagulant role of thrombomodulin

Note. APC-PS, activated protein C and protein S; endothelial cell receptor for protein C (EPCR); thrombin in the coagulation cascade converts coagulation cofactors V and VIII into their active forms, Va and VIIIa. When bound to thrombomodulin, the thrombin-thrombomodulin complex activates the protein C, which binds to protein S and cleaves coagulation factors Va and VIIIa. The thrombin-thrombomodulin complex is also capable of activating a thrombin-activated fibrinolysis inhibitor (TAFI), which then counteracts fibrinolysis.

ные свойства [5, 11, 17]. В норме уровень растворимого тромбомодулина колеблется от 3 нг/мл до 50 нг/мл, при заболеваниях, связанных с повреждением сосудов, уровни растворимого тромбомодулина повышаются. Однако данные о содержании sTM в сыворотке крови при различных сердечно-сосудистых заболеваниях разнятся, отмечено как повышение, так и снижение значения его уровня. Экспрессия и активность ТМ подавляются при таких заболеваниях, как острое повреждение легких, усугубляющийся тромбоз, воспаление и повреждение тканей [4, 6]. В нашем исследовании мы получили данные о том, что значительно снижен уровень растворимого тромбомодулина у пациентов с фибрилляцией предсердий и возникшими тромбозами не только по сравнению со здоровыми добровольцами, но и по сравнению с пациентами с фибрилляцией предсердий без тромботических осложнений. Клеточные рецепторы тромбомодулина и EPCR являются неотъемлемой частью пути про-

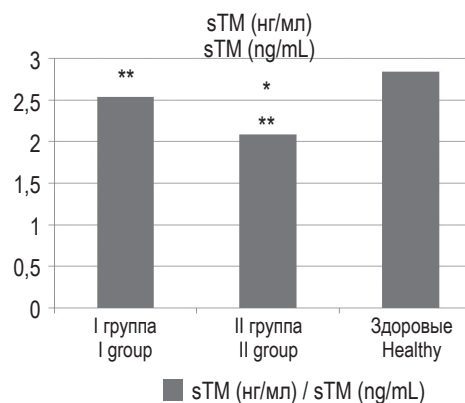


Рисунок 2. Содержание растворимого тромбомодулина в сыворотке крови у пациентов с фибрилляцией предсердий и здоровых добровольцев

Примечание. * $p < 0,05$ при сравнении групп пациентов с ФП с группой здоровых добровольцев; ** $p < 0,05$ при сравнении групп I и II.

Figure 2. Content of soluble thrombomodulin in serum in patients with atrial fibrillation and healthy volunteers

Note. * $p < 0.05$ when comparing groups of patients with AF with a group of healthy volunteers; ** $p < 0.05$ when comparing groups I and II.

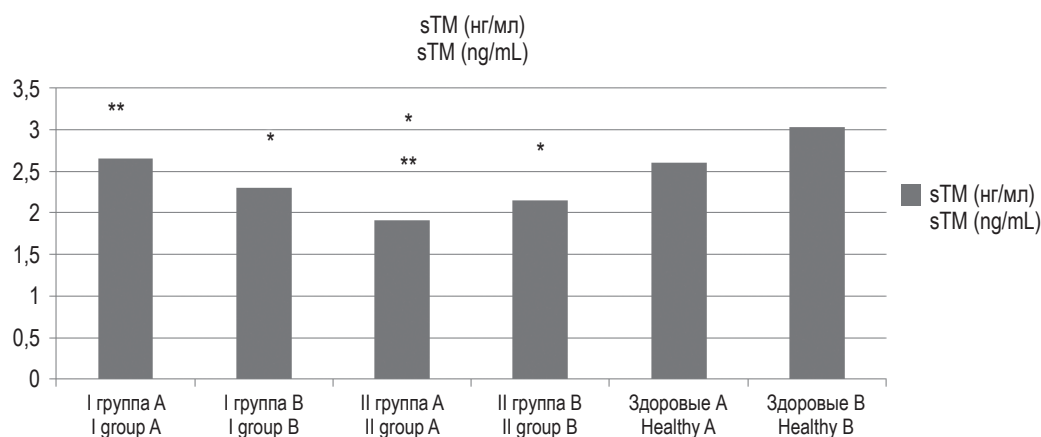


Рисунок 3. Сравнительный анализ растворимого тромбомодулина у женщин и мужчин с фибрилляцией предсердий и здоровых добровольцев

Примечание. Группа I – пациенты с фибрилляцией предсердий без тромботических осложнений, группа II – пациенты с фибрилляцией предсердий с возникшими тромботическими осложнениями; группа A – женщины, группа B – мужчины. * $p < 0,05$ при сравнении групп пациентов с ФП с группой здоровых добровольцев; ** $p < 0,05$ при сравнении групп I и II.

Figure 3. Comparative analysis of soluble thrombomodulin in women and men with atrial fibrillation and healthy volunteers

Note. Group I, patients with atrial fibrillation without thrombotic complications; group II, patients with atrial fibrillation with thrombotic complications; group A, women; group B, men. * $p < 0.05$ when comparing groups of patients with AF with a group of healthy volunteers; ** $p < 0.05$ when comparing groups I and II.

теина С, способствуя активации ПС. Их растворимые формы sTM и sEPCR, соответственно, также влияют на антикоагулянтный потенциал. На сегодняшний день исследований активности антикоагулянтного пути протеина С при фибрилляции предсердий и при ее различных формах немного и полученные данные разнятся. Так, F. Marin и соавт. установили значительно повышенные уровни sTM в плазме при остром начале ФП [12], F. Namino и соавт. не зарегистрировали существенных изменений в значениях показателя [14]. Неоднозначны также данные о состоянии системы протеина С при персистирующей и постоянной ФП [5]. Можно предположить, что дефицит sTM является возможным объяснением изменений активности протеина С. Снижение активности пути протеина С является предпосылкой для нарушения тонкого баланса между прокоагулянтными и антикоагулянтными силами и создания протромботического состояния, что приводит к возникновению тромботических

осложнений у пациентов с фибрилляцией предсердий [9, 13].

Заключение

Фибрилляция предсердий может приводить к протромботическому и гиперкоагуляционному состоянию с аномальным гемостазом, фибринолизом, гиперактивацией тромбоцитов и эндотелиальной дисфункцией. В изученной группе больных с фибрилляцией предсердий неклапанного генеза, получающих антикоагулянтную терапию и имеющих в анамнезе тромботические осложнения и пациентов с фибрилляцией предсердий без тромботических осложнений, было обнаружено снижение растворимого тромбомодулина, оказывающего противовоспалительный и антикоагулянтный эффект у пациентов с возникшими тромбозами. Повышение уровня физиологических антикоагулянтов не приводит к кровотечениям, в то время как снижение их содержания существенно повышает риск тромбозов.

Список литературы / References

1. Акилджонов Ф.Р., Бузиашвили Ю.И., Асымбекова Э.У. Биомаркеры при фибрилляции предсердий // Клиническая физиология кровообращения, 2020. Т. 17, № 3. С. 195-202. [Akildzhonov F.R., Buziashvili Yu.I., Asymbekova E.U. Biomarkers in atrial fibrillation. *Klinicheskaya fiziologiya krovoobrashcheniya = Clinical Physiology of Circulation*, 2020, Vol. 17, no. 3, pp. 195-202. (In Russ.)]

2. Ревишвили А.Ш., Шляхто Е.В., Попов С.В., Покушалов Е.А., Школьников М.А., Сулимов В.А., Голицын С.П., Егоров Д.Ф., Бойцов С.А., Давтян К.В., Зенин С.А., Кузнецов В.А., Лебедев Д.С., Ломидзе Н.Н., Медведев М.М., Недоступ А.В., Неминуший Н.М., Певзнер А.В., Рзаев Ф.Г., Татарский Б.А., Термосесов С.А., Тюрина Т.В., Яшин С.М. Клинические рекомендации по проведению электрофизиологических исследований, катетерной абляции и применению имплантируемых антиаритмических устройств. М.: Новая редакция, 2017. С. 466-595. [Revishvili A.Sh., Shlyakhto E.V., Popov S.V., Pokushalov E.A., Shkolnikova M.A., Sulimov V.A., Golitsyn S.P., Egorov D.F., Boytsov S.A., Davtyan K.V., Zenin S.A., Kuznetsov V.A., Lebedev D.S., Lomidze N.N., Medvedev M.M., Nezavisimy A.V., Neminushchy N.M., Pevsner A.V., Rzaev F.G., Tatarsky B.A., Thermosesov S.A., Tyurina T.V., Yashin S.M. Clinical guidelines for electrophysiological studies, catheter ablation, and the use of implantable antiarrhythmic devices. Moscow: Novaya redaktsiya, 2017, pp. 466-595.]
3. Alegret J.M., Aragonès G.I. The relevance of the association between inflammation and atrial fibrillation. *Eur. J. Clin. Invest.*, 2013, Vol. 43, Iss. 4, pp. 324-331.
4. Conway Edward M. Thrombomodulin and its role in inflammation. *Semin. Immunopathol.*, 2012, Vol. 34, pp. 107-125.
5. Dharmasaroja P., Dharmasaroja P.A., Sobhon P. Increased plasma soluble thrombomodulin levels in cardioembolic stroke. *Clin. Appl. Thromb. Hemost.*, 2012, Vol. 18, Iss. 3, pp. 289-293.
6. Ding B.S., Hong N., Christofidou-Solomidou M., Gottstein C., Albelda S.M., Cines D.B., Fisher A.B., Muzykantov V.R. Anchoring fusion thrombomodulin to the endothelial lumen protects against injury-induced lung thrombosis and inflammation. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 2009, Vol. 180, pp. 247-256.
7. Hemant G., Xiaofeng C., Panicker S.R., Biswas I., Rezaie A.R. Thrombomodulin regulation of mitogen-activated protein kinases. *Int. J. Mol. Sci.*, 2019, Vol. 20, 1851. doi: 10.3390/ijms20081851.
8. Hindricks G., Potpara T., Dagres N., Arbelo E., Bax J.J., Blomström-Lundqvist C., Boriani G., Castella M., Dan G.-A., Dilaveris P.E., Fauchier L., Filippatos G., Kalman J.M., La Meir M., Lane D.A., Lebeau J.-P., Lettino M., Lip G.Y.H., Pinto F.J., Thomas G.N., Valgimigli M., Van Gelder I.C., Van Putte B.P., Watkins C.L.; ESC Scientific Document Group 2020 ESC Guidelines for the diagnosis and management of atrial fibrillation developed in collaboration with the European Association of Cardio-Thoracic Surgery (EACTS): The Task Force for the diagnosis and management of atrial fibrillation of the European Society of Cardiology (ESC) Developed with the special contribution of the European Heart Rhythm Association (EHRA) of the ESC. *Eur. Heart J.*, 2021, Vol. 42, Iss. 5, pp. 373-498.
9. Ito T., Maruyama I. Thrombomodulin: protectorate God of the vasculature in thrombosis and inflammation. *J. Thromb. Haemost.*, 2011, Vol. 9 (Suppl. 1), pp. 168-173.
10. Kirchhof P., Benussi S., Kotecha D., Ahlsson A., Atar D., Casadei B., Castella M., Diener H.-C., Heidbuchel H., Hendriks J., Hindricks G., Manolis A.S., Oldgren J., Popescu B.A., Schotten U., Van Putte B., Vardas P., Agewall S., Camm J., Esquivias G.B., Budts W., Carerj S., Casselman F., Coca A., De Caterina R., Deftereos S., Dobrev D., Ferro J.M., Filippatos G., Fitzsimons D., Gorenek B., Guenoun M., Hohnloser S.H., Kolh P., Lip G.Y.H., Manolis A., McMurray J., Ponikowski P., Rosenhek R., Ruschitzka F., Savelieva I., Sharma S., Suwalski P., Tamargo J.L., Taylor C.J., van Gelder I.C., Voors A.A., Windecker S., Zamorano J.L., Zeppenfeld K. 2016 ESC Guidelines for the management of atrial fibrillation developed in collaboration with EACTS. Left atrial volume predicts cardiovascular events in patients originally diagnosed with lone atrial fibrillation: three-decade follow-up. *Eur. Heart J.*, 2016, Vol. 37, Iss. 38, pp. 2893-2962.
11. Li Y.H., Shi G.Y., Wu H.L. Thrombomodulin in the treatment of atherothrombotic diseases. *Front. Biosci. (Schol. Ed.)*, 2009, Vol. 1, Iss. 1, pp. 33-38.
12. Marin F., Roldan V., Climent V.E., Ibanez A., Garcia A., Marco P., Sogorb F., Lip G.Y.H. Plasma von Willebrand factor, soluble thrombomodulin and fibrin D-dimer concentrations in acute onset nonrheumatic atrial fibrillation. *Heart*, 2004, Vol. 90, pp. 1162-1166.
13. Martin F.A., Murphy R.P., Cummins P.M. Thrombomodulin and the vascular endothelium: insights into functional, regulatory, and therapeutic aspects. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 2013, Vol. 304, pp. 1585-1597.
14. Namino F., Yamakuchi M., Iriki Y., Okui H., Ichiki H., Maenosono R., Oketani N., Masamoto I., Miyata M., Horiuchi M., Hashiguchi T., Ohishi M., Maruyama I. Dynamics of soluble thrombomodulin and circulating miRNAs in patients with atrial fibrillation undergoing radiofrequency catheter ablation. *Clin. Appl. Thromb. Hemost.*, 2019, Vol. 25, 1076029619851570. doi: 10.1177/1076029619851570.
15. Negreva M., Georgiev S., Vitlianova K. Decreased activity of the protein C anticoagulant pathway in the early hours of paroxysmal atrial fibrillation. *Clin. Appl. Thromb. Hemost.*, 2017, Vol. 23, Iss. 7, pp. 793-799.

16. Ohlin A.K., Larsson K., Hansson M. Soluble thrombomodulin activity and soluble thrombomodulin antigen in plasma. *J. Thromb. Haemost.*, 2005, Vol. 3, pp. 976-982.
17. Okuda A., Ogura T., Imanishi M., Miyano A., Nishioka N., Higuchi K. Clinical impact of recombinant soluble thrombomodulin for disseminated intravascular coagulation associated with severe acute cholangitis. *Gut Liver*, 2018, Vol. 12, no. 4, pp. 471-477.

Авторы:

Огуркова О.Н. — к.м.н., научный сотрудник отделения клинической лабораторной диагностики, Научно-исследовательский институт кардиологии — филиал ФГБНУ «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук», г. Томск, Россия

Суслова Т.Е. — к.м.н., руководитель отделения клинической лабораторной диагностики, Научно-исследовательский институт кардиологии — филиал ФГБНУ «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук», г. Томск, Россия

Лугачева Ю.Г. — к.м.н., врач клинической лабораторной диагностики клинко-диагностической лаборатории, Научно-исследовательский институт кардиологии — филиал ФГБНУ «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук», г. Томск, Россия

Драгунова М.А. — к.м.н., научный сотрудник лаборатории высоких технологий диагностики и лечения нарушений ритма сердца, Научно-исследовательский институт кардиологии — филиал ФГБНУ «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук», г. Томск, Россия

Ситкова Е.С. — к.м.н., старший научный сотрудник лаборатории высоких технологий диагностики и лечения нарушений ритма сердца, Научно-исследовательский институт кардиологии — филиал ФГБНУ «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук», г. Томск, Россия

Баталов Р.Е. — д.м.н., руководитель лаборатории высоких технологий диагностики и лечения нарушений ритма сердца, Научно-исследовательский институт кардиологии — филиал ФГБНУ «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук», г. Томск, Россия

Authors:

Ogurkova O.N., PhD (Medicine), Research Associate, Department of Clinical Laboratory Diagnostics, Cardiology Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences Tomsk, Russian Federation

Suslova T.E., PhD (Medicine), Head, Department of Clinical Laboratory Diagnostics, Cardiology Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences Tomsk, Russian Federation

Lugacheva Yu.G., PhD (Medicine), Doctor of Clinical Laboratory Diagnostics, Clinical Diagnostic Laboratory, Cardiology Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences Tomsk, Russian Federation

Dragunova M.A., PhD (Medicine), Research Associate, Laboratory of High Technologies for Diagnostics and Treatment of Cardiac Arrhythmias, Cardiology Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences Tomsk, Russian Federation

Sitkova E.S., PhD (Medicine), Senior Research Associate, Laboratory of High Technologies for Diagnostics and Treatment of Cardiac Arrhythmias, Cardiology Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences Tomsk, Russian Federation

Batalov R.E., PhD, MD (Medicine), Head, Laboratory of High Technologies for Diagnostics and Treatment of Cardiac Arrhythmias, Cardiology Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences Tomsk, Russian Federation

Поступила 29.03.2024
Отправлена на доработку 23.05.2024
Принята к печати 13.08.2024

Received 29.03.2024
Revision received 23.05.2024
Accepted 13.08.2024

РОЛЬ СЕНСИБИЛИЗАЦИИ К АЛЛЕРГЕНАМ ПЫЛЬЦЫ БЕРЕЗЫ В РАЗВИТИИ ОБОСТРЕНИЙ АТОПИЧЕСКОГО ДЕРМАТИТА У ПАЦИЕНТОВ, ПРОЖИВАЮЩИХ В МОСКВЕ И МОСКОВСКОЙ ОБЛАСТИ

Елисютина О.Г.^{1,2}, Смольников Е.В.^{1,2}, Литовкина А.О.^{1,2},
Чернушевич Д.Д.^{1,2}, Феденко Е.С.¹

¹ ФГБУ «Государственный научный центр «Институт иммунологии»» Федерального медико-биологического агентства, Москва, Россия

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

Резюме. Атопический дерматит (АтД) является хроническим воспалительным заболеванием кожи, патогенез которого связан с иммунологическими нарушениями и генетически обусловленными дефектами эпидермального барьера. Воздействие аэроаллергенов, в том числе пыльцы растений, играет важную роль в обострениях и прогрессировании АтД. При контакте с пыльцевыми аллергенами у сенсibilизированных индивидуумов активируется Т2-иммунный ответ, который характеризуется высвобождением цитокинов IL-4, IL-13 и IL-31, стимулирующих продукцию IgE. Это приводит к усилению воспаления, улучшению проникновения аллергенов через нарушенный эпидермальный барьер, активации кератиноцитов и дендритных клеток, дальнейшему нарушению функции барьера кожи и обострению симптомов АтД. В ранее проведенных исследованиях показано, что аллергены пыльцы могут прямо воздействовать на эпидермальный барьер, активируя протеолитические ферменты, которые разрушают межклеточные соединения в эпидермисе, увеличивая его проницаемость для аллергенов и патогенов. В данном исследовании анализируется влияние сенсibilизации к аллергенам пыльцы березы на обострение атопического дерматита (АтД) у взрослых пациентов, проживающих в Москве и Московской области. Пыльца березы является значимым аллергеном, способным вызывать обострения аллергических заболеваний, особенно в странах Северного полушария, где береза широко распространена. В исследование включено 30 взрослых пациентов с АтД, сенсibilизированных к пыльце березы. Для оценки тяжести заболевания использовали индекс SCORAD, который позволяет объединять как объективные показатели состояния кожи, так и субъективные жалобы пациентов (зуд, нарушение сна). Аллергологическое обследование проводилось с использованием аллергочипа ISAC ImmunoCAP, позволяющего определить уровень специфических IgE-антител к более чем 100 аллергенам, включая главный аллерген пыльцы березы — Bet v 1. Анализ результатов по-

Адрес для переписки:

Елисютина Ольга Гурьевна
ФГБУ «Государственный научный центр «Институт
иммунологии»» Федерального медико-биологического
агентства
115522, Россия, Москва, Каширское шоссе, 24.
Тел.: 8 (910) 469-59-67.
E-mail: el-olga@yandex.ru

Address for correspondence:

Olga G. Elisyutina
National Research Center "Institute of Immunology",
Federal Medical Biological Agency
24 Kashirskoe Highway
Moscow
115522 Russian Federation
Phone: +7 (910) 469-59-67.
E-mail: el-olga@yandex.ru

Образец цитирования:

О.Г. Елисютина, Е.В. Смольников, А.О. Литовкина,
Д.Д. Чернушевич, Е.С. Феденко «Роль сенсibilизации
к аллергенам пыльцы березы в развитии обострений
атопического дерматита у пациентов, проживающих
в Москве и Московской области» // Медицинская
иммунология, 2025. Т. 27, № 1. С. 225-232.
doi: 10.15789/1563-0625-TRO-16801

© Елисютина О.Г. и соавт., 2025
Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

O.G. Elisyutina, E.V. Smolnikov, A.O. Litovkina,
D.D. Chernuchevich, E.S. Fedenko "The role of sensitization
to birch pollen allergens in the development of acute atopic
dermatitis in patients living in Moscow and the Moscow
Region", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya
Immunologiya, 2025, Vol. 27, no. 1, pp. 225-232.
doi: 10.15789/1563-0625-TRO-16801

© Elisyutina O.G. et al., 2025
The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License
DOI: 10.15789/1563-0625-TRO-16801

казал, что у большинства пациентов в период цветения березы наблюдалось значительное усиление симптомов АтД, что коррелировало с уровнем специфических IgE к Bet v 1. Исследование подчеркивает клиническую значимость сенсibilизации к пыльце березы как фактора-триггера обострения АтД, подтверждая необходимость анализа сенсibilизации к пыльцевым аллергенам для разработки персонализированных подходов к диагностике и терапии пациентов с АтД.

Ключевые слова: атопический дерматит, Bet v 1, аллергия на пыльцу березы, иммуноглобулин E, молекулярная аллергическая диагностика, аппликационный тест

THE ROLE OF SENSITIZATION TO BIRCH POLEN ALLERGENS IN THE DEVELOPMENT OF ACUTE ATOPIC DERMATITIS IN PATIENTS LIVING IN MOSCOW AND THE MOSCOW REGION

Elisyutina O.G.^{a, b}, Smolnikov E.V.^{a, b}, Litovkina A.O.^{a, b},
Chernuchevich D.D.^{a, b}, Fedenko E.S.^a

^a National Research Center "Institute of Immunology", Federal Medical Biological Agency, Moscow, Russian Federation

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

Abstract. Atopic dermatitis (AD) is a chronic inflammatory skin disease, its pathogenesis is associated with immunological disorders and genetically determined defects of the epidermal barrier. Exposure to aeroallergens, including pollen, plays a crucial role in the exacerbations and progression of AD. When individuals sensitized to pollen allergens come into contact with these allergens, a T2 immune response is activated, characterized by the release of cytokines IL-4, IL-13, and IL-31, which stimulate the production of IgE. This leads to enhanced inflammation, improved penetration of allergens through the compromised epidermal barrier, and activation of keratinocytes and dendritic cells, further impairing the skin barrier function and exacerbating AD symptoms. Previous studies have shown that pollen allergens can directly affect the epidermal barrier by activating proteolytic enzymes that break down intercellular connections in the epidermis, increasing its permeability to allergens and pathogens. This study analyzes the impact of sensitization to birch pollen allergens on the AD exacerbation in adult patients living in Moscow and the Moscow region. Birch pollen is a significant allergen capable of triggering exacerbations of allergic diseases, especially in the Northern Hemisphere countries where birch is widely spread. The study included 30 adult AD patients sensitized to birch pollen, and the SCORAD index was used to assess the severity of the disease, combining both objective skin condition indicators and subjective patient complaints (itching, sleep disturbance). Allergological examination was conducted using the ISAC ImmunoCAP allergochip, allowing for the determination of specific IgE levels to more than 100 allergens, including the main birch pollen allergen — Bet v 1. The analysis showed that most patients experienced a significant increase in AD symptoms during the birch flowering period, correlating with the levels of specific IgE to Bet v 1. The study highlights the clinical significance of sensitization to birch pollen as a trigger factor for AD exacerbation, confirming the need to analyze sensitization to pollen allergens to develop personalized approaches to the diagnosis and treatment of AD patients.

Keywords: atopic dermatitis, Bet v 1, allergy to birch pollen, immunoglobulin E, molecular allergy diagnostics, patch test

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 23-15-00432).

Введение

Атопический дерматит (АтД) — мультифакторное генетически детерминированное хроническое воспалительное заболевание кожи [1, 15].

Ключевыми патогенетическими механизмами АтД являются генетически обусловленные нарушения функции эпидермального барьера, нарушение активация T2-иммунного вос-

паления различными антигенами, а также развитие IgE-специфической сенсibilизация к различным аллергенам [1, 6, 15]. АтД часто протекает в сочетании с другими аллергическими IgE-опосредованными заболеваниями: аллергическим ринитом, бронхиальной астмой, IgE — опосредованной пищевой аллергией. Каждое из этих заболеваний имеет сложные иммунологические и патофизиологические механизмы развития, а сочетание АтД с бронхиальной астмой, аллергическим ринитом и пищевой аллергией обусловлено общими генетическими фактора-

ми, которые нарушают экспрессию определенных генов, отвечающих за иммунный ответ [13, 15]. Нарушения регуляции иммунного ответа, особенности взаимодействия иммунных клеток, тканевая гиперреактивность и ремоделирование тканей при хроническом течении АтД определяют сложности в изучении патогенетической связи АтД и IgE-обусловленной сенсибилизации к различным аллергенам. В большинстве случаев АтД характеризуется поливалентной сенсибилизацией, и в клинической практике нередко бывает затруднительно выявить причинно-значимые аллергены. Наиболее важную роль в патогенезе АтД играет IgE-зависимая сенсибилизация к аэроаллергенам клещей домашней пыли, пыльцы растений и пищевым аллергенам [13]. Спектр причинно-значимых аллергенов может сильно различаться в зависимости от географического региона, окружающей среды и предрасположенности индивидуума к аллергии. Наиболее частыми причинно-значимыми аллергенами являются аэроаллергены пыльцы растений: распространенность сенсибилизации к аллергенам пыльцы в европейских странах достигает 40%; у пациентов с аллергическими заболеваниями сенсибилизация к пыльцевым аллергенам отмечается в 30-70% случаев [5, 7]. Одним из важнейших аэроаллергенов является пыльца березы: аллергическими заболеваниями, ассоциированными с этим аллергеном, страдают более 100 миллионов человек во всем мире, преимущественно в странах Северного полушария, Центральной Европы, Северной Америки, центральных частей Азии и Австралии [2, 5, 9]. Береза произрастает на всей территории Российской Федерации и представляет собой один из наиболее распространенных источников высокоаллергенной пыльцы, являющейся причиной развития аллергических заболеваний [4]. Контакт с пыльцевыми аллергенами может ухудшать течение АтД и является важным фактором обострений заболевания [3, 5, 6, 9]. В исследовании Fölster-Holst R. и соавт. [5] было показана положительная корреляция между концентрацией пыльцы в окружающей среде и тяжестью обострения АтД у пациентов с сенсибилизацией к аллергенам пыльцы березы, при этом воспалительное поражение открытых участков кожи, контактирующих с пылью, более выражено. Аллергены пыльцы могут оказывать прямое повреждающее действие на эпидермальный барьер за счет активации протеолитических ферментов [10], а также стимулировать иммунный ответ Т2-типа ассоциированными с пылью липидными медиаторами из-за их структурного и химического сходства с лейкотриенами и простагландинами [8].

Цель исследования — оценить клиническую значимость сенсибилизации к пыльце березы у

пациентов с atopическим дерматитом, проживающих в Москве и Московской области.

Материалы и методы

В исследование было включено 30 взрослых пациентов с АтД в возрасте от 18 до 56 лет (средний возраст 27,9), 20 женщин и 10 мужчин, имеющих сенсибилизацию к аллергенам пыльцы березы, которые проживают в Москве и Московской области и наблюдались в отделении аллергии и иммунопатологии кожи ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России в период 2022-2023 гг. Диагноз «АтД» был установлен согласно международным и российским согласительным документам [1, 15]. Для оценки тяжести течения заболевания использовали индекс оценки тяжести АтД — полуколичественную шкалу SCORAD (severity scoring of atopic dermatitis), которая объединяет объективные (интенсивность и распространенность кожного поражения) и субъективные (интенсивность ночного кожного зуда и нарушение сна) критерии. Легкая степень тяжести atopического дерматита соответствует значению SCORAD < 25; средняя степень тяжести соответствует значению SCORAD от 25 до 50; тяжелая степень тяжести соответствует значению SCORAD > 50 [12].

Оценку степени тяжести АтД пациентам проводили трижды: до начала сезона цветения березы (в марте 2023 г.), в период цветения березы (в мае 2023 г.) и после окончания сезона цветения березы (в июне 2023 г.).

Аллергологическое обследование включало сбор аллергологического анамнеза и комплексное молекулярное аллергологическое обследование с применением технологии микрочипов с иммобилизованными на твердой фазе очищенными природными или рекомбинантными компонентами аллергенов (Immuno-Solid phase Allergen Chip, ISAC), для количественного определения sIgE против 112 аллергенных молекул из 51 источника аллергенов в одном исследовании. Уровень аллерген-специфического IgE $\geq 0,3$ ISU расценивали как положительный результат. При этом уровень 0,3-1,0 ISU расценивали как низкий уровень сенсибилизации, от 1 до 15 ISU как средний, более 15 ISU — как высокий.

Все пациенты получали стандартную терапию АтД, топические кортикостероиды или топические ингибиторы кальциневрина в периоды обострения, антигистаминные препараты при интенсивном кожном зуде, а также ежедневно использовали эмоленты. Мы не включали в исследование пациентов, которые получали какую-либо системную терапию заболевания в период наблюдения, в том числе системные кортикостероиды, циклоспорин, дупилумаб.

Вне сезона цветения и в стадии ремиссии АтД всем пациентам проведено кожное аппликационное тестирование с главным аллергеном пыльцы березы — rBet v 1 с целью изучения возможности участия Т-клеточно-опосредованных иммунных механизмов в развитии кожных симптомов аллергии.

Аллерген Bet v 1 помещался в патч-камеру диаметром 12 мм (Finn Chambers on Scanpor, Large, Epitest Ltd Oy), в качестве вещества-носителя применялся вазелин (Unilever). Аппликации аллергена производились на неповрежденную кожу спины. В качестве отрицательного контроля применялся вазелин (Unilever). Через 48 часов оценивалась реакция кожи. Оценка положительных реакций кожного аппликационного тестирования проводилась в соответствии с Европейской целевой группой по атопическому дерматиту (ETFAD) [11, 15]: -, отрицательный результат; +/-, только эритема, сомнительная; +, эритема, инфильтрация; ++, эритема, несколько папул (< 3); +++, эритема, количество папул от 4, но меньше, чем много; +++++, эритема, много папул; ++++++, эритема, везикулы.

Исследование было одобрено этическим комитетом ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России (протокол № 5 от 18 марта 2021 г.).

Результаты и обсуждение

В исследование было включено 30 взрослых пациентов с АтД различной степени тяжести: тяжелое течение заболевания выявлено у 13

(43,3%) пациентов; среднетяжелое — у 8 (26,7%) пациентов, легкое — у 9 (30%) пациентов. У 25 пациентов выявлено наличие сопутствующего аллергического ринита, у 15 — бронхиальной астмы. Сенсибилизация к другим группам аллергенов выявлена у всех исследуемых пациентов с АтД. Наиболее часто выявлялась сопутствующая сенсибилизация к аллергенам пыльцы злаковых трав — у 16 (53,3%) пациентов, аллергенам кошки — у 22 (73,3%) пациентов, аллергенам клещей домашней пыли — у 8 (26,7%), перекрестная пищевая аллергия к одному или более PR-10 белкам гомологам Bet v 1 (яблока, лесного ореха, сои, арахиса, сельдерея) — у 22 (73,3%) пациентов.

Клинико-демографическая характеристика пациентов представлена в таблице 1.

Несмотря на хроническое течение АтД, у всех пациентов в течение года периоды обострения чередуются с периодами относительной ремиссии. Учитывая выявленное повышение уровня специфических IgE-антител к главному аллергену пыльцы березы Bet v 1, мы провели объективную оценку тяжести течения АтД на основании индекса SCORAD до, во время и после окончания сезона цветения березы. У большинства обследованных пациентов отмечалось усиление симптомов АтД в сезон цветения березы, что отразилось в изменении индекса SCORAD: выявлено достоверное повышение данного индекса в период цветения и уменьшение после окончания сезона, однако после сезона значения данного индекса превышали значения до сезона (рис. 1А). Также

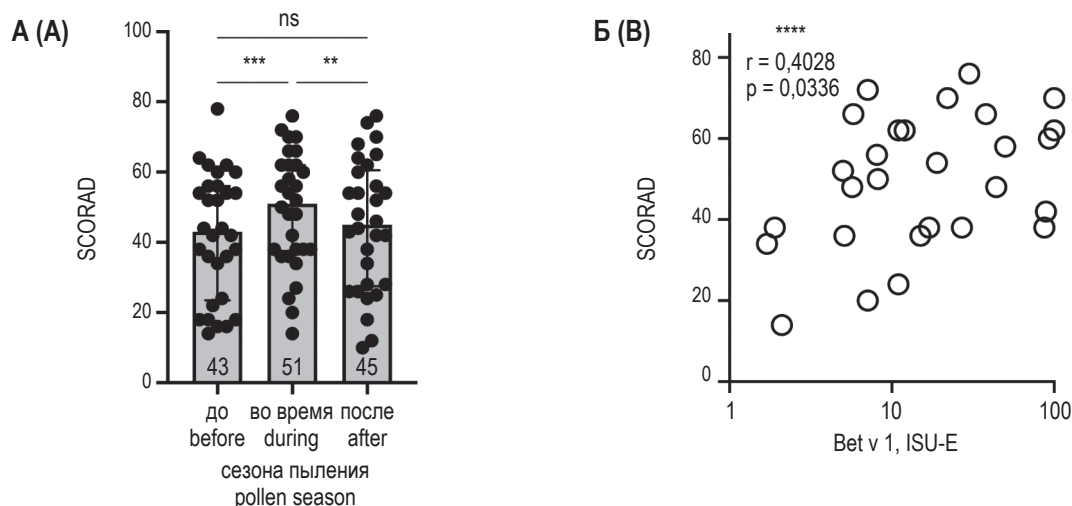


Рисунок 1. Динамика индекса SCORAD у пациентов с АтД до начала, во время и после окончания сезона цветения березы

Примечание. А – медиана индекса у пациентов с АтД до начала, во время и после окончания сезона цветения березы SCORAD. Б – корреляция степени тяжести АтД в сезон цветения березы (SCORAD) с уровнем специфических IgE к Bet v 1. ** – $p < 0,01$, *** – $p < 0,001$, **** – $p < 0,0001$.

Figure 1. Dynamics of the SCORAD index in patients with AD before, during and after the end of the birch pollen season

Note. A, median index in patients with AD before, during and after the end of the SCORAD birch flowering season. B, correlation of the severity of AD during the birch flowering season (SCORAD) with the level of specific IgE to Bet v 1. ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$; **** – $p < 0,0001$.

ТАБЛИЦА 1. КЛИНИКО-ДЕМОГРАФИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ГРУППЫ ПАЦИЕНТОВ С АТД РАЗЛИЧНОЙ СТЕПЕНИ ТЯЖЕСТИ И СЕНСИБИЛИЗАЦИЕЙ К АЛЛЕРГЕНАМ ПЫЛЬЦЫ БЕРЕЗЫ

TABLE 1. CLINICAL AND DEMOGRAPHIC CHARACTERISTICS OF A GROUP OF ATOPIC DERMATITIS PATIENTS WITH SENSITIZATION TO BIRCH POLLEN ALLERGENS

Показатель Indicators	Пациенты с АтД и сенсibilизацией к аллергенам пыльцы березы AD patients with sensitization to birch pollen allergens n = 30
Возраст, Ме ($Q_{0,25}$-$Q_{0,75}$) Age, Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)	24 (18-31)
Пол, n (%) Gender, n (%)	
Мужской Male	10 (33,3)
Женский Female	20 (66,7)
Тяжесть течения АтД, n (%) AD severity, n (%)	
Легкая Mild	8 (26,7)
Средняя Moderate	9 (30)
Тяжелая Severe	13 (43,3)
Индекс SCORAD, Ме ($Q_{0,25}$-$Q_{0,75}$) SCORAD index, Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)	
До сезона цветения березы Before the birch pollen season	43 (23,5-56,0)
Во время сезона цветения березы During the birch pollen season	51 (37,5-62,0)
После окончания сезона цветения березы After the birch pollen season	45 (27,5-65,0)
Уровень Bet v 1, ISU-E, Ме ($Q_{0,25}$-$Q_{0,75}$) Bet v 1 level, ISU-E, Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)	13,5 (5,775-39,500)
Сопутствующие аллергические заболевания, n (%) Allergic comorbidities	
Аллергический ринит Allergic rhinitis	25 (83,3)
Бронхиальная астма Asthma	15 (50)
Аллергический ринит и бронхиальная астма Allergic rhinitis and asthma	11 (36,7)
Сенсибилизация к другим группам аллергенов, n (%) Sensitization to other allergens	
Перекрестные пищевые аллергены (PR-10 белки яблок и/или орехов, и/или семян и/или косточковых фруктов) Cross-reactivity food allergens (PR-10 proteins of apples and/or nuts and/or seeds and/or fruits)	22 (73,3)
Пыльца злаковых трав Grass pollen	16 (53,3)
Пыльца сорных трав Weed pollen	12 (40)
Эпидермальные аллергены кошки и/или собаки Cats and/or dogs	22 (73,3)
Клещи домашней пыли House dust mites	8 (26,7)
Плесневые грибы Moulds	9 (30)

выявлена прямая положительная корреляция степени тяжести АтД с уровнем специфического IgE к главному аллергену пыльцы березы Bet v 1 в исследуемой группе пациентов (рис. 1Б).

С целью изучения патогенетических механизмов влияния аэроаллергенов на обострение АтД, всем пациентам с АтД и сенсибилизацией к Bet v 1 было проведено кожное аппликационное тестирование с главным аллергеном пыльцы березы — rBet v 1 вне сезона цветения, на фоне ремиссии АтД. Методика аппликационного тестирования с ингаляционными аллергенами у пациентов с АтД была разработана в 1989 г. [11], когда впервые было показано, что аллергены клещей домашней пыли (*D. pteronyssinus*) способны вызывать экзематозные поражения кожи у больных АтД. Позднее методика постановки аппликационного теста была стандартизована в ряде многоцентровых исследований, были определены оптимальные концентрации аллергенов, вспомогательные вещества, временные интервалы, способы подготовки кожи и критерии оценки результатов [11, 15]. В исследуемой группе из 30 пациентов с АтД выявлены положительные результаты аппликационного теста с главным аллергеном пыльцы

березы Bet v 1 у 6 пациентов со среднетяжелым и тяжелым течением заболевания. У 5 из этих пациентов ранее отмечалось ухудшение течения АтД в сезон цветения березы при отсутствии симптомов аллергического ринита.

Заключение

Полученные результаты свидетельствуют о том, что IgE-зависимая сенсибилизация к аллергенам пыльце березы может вызывать обострение АтД в период цветения березы. Исследование подчеркивает важность анализа профиля аллерген-специфической сенсибилизации в тактике ведения пациентов с АтД, особенно в географических регионах с высокой распространенностью аллергии на пыльцу березы. Результаты подтверждают необходимость разработки индивидуализированных методов диагностики и лечения, направленных на минимизацию воздействия аллергенов, в том числе рациональное использование эмоленов, коррекцию противовоспалительной наружной терапии и определение показаний к аллерген-специфической иммунотерапии причинно-значимыми аллергенами и биологической терапии генно-инженерными препаратами.

Список литературы / References

Кубанов А.А., Намазова-Баранова Л.С., Хаитов Р.М., Ильина Н.И., Алексеева Е.А., Амбарчян Э.Т., Артемьева С.И., Аршинский М.И., Астафьева Н.Г., Вишнева Е.А., Волнухин В.А., Данилычева И.В., Елисюткина О.Г., Епишев Р.В., Жестков А.В., Жилова М.Б., Жукова О.В., Заславский Д.В., Знаменская Л.Ф., Карамова А.Э., Короткий Н.Г., Кохан М.М., Круглова Л.С., Кунгуров Н.В., Левина Ю.Г., Львов А.Н., Материкин А.И., Мишина О.С., Монахов К.Н., Мурашкин Н.Н., Ненасева Н.М., Пампура А.Н., Плахова К.И., Потеекаев Н.Н., Притуло О.А., Разнатовский К.И., Сапунцова С.Г., Селимзянова Л.Р., Скороходкина О.В., Феденко Е.С., Фомина Д.С., Фриго Н.В., Фролова З.В., Хаитов М.Р., Чикин В.В. Атопический дерматит. Клинические рекомендации // Российский аллергологический журнал. 2021. Т. 18. № 3. С. 44-92. [Kubanov A.A., Namazova-Baranova L.S., Khaitov R.M., Ilina N.I., Alekseeva E.A., Ambarchian E.T., Artemieva S.I., Arshinskiy M.I., Astafieva N.G., Vishneva E.A., Volnukhin V.A., Danilicheva I.V., Elisutina O.G., Epishev R.V., Zhestkov A.V., Zhilova M.B., Zhukova O.V., Zaslavsky D.V., Znamenskaya L.F., Karamova A.E., Korotky N.G., Kokchan M.M., Kruglova L.S., Kungurov N.V., Levina J.G., Lvov A.N., Materikin A.I., Mishina O.S., Monakhov K.N., Murashkin N.N., Nenasheva N.M., Pampura A.N., Plakhova X.I., Potekaev N.N., Prytulo O.A., Raznatovskiy K.I., Sapuntsova S.G., Selimzianova L.R., Skorokhodkina O.V., Fedenko E.S., Fomina D.S., Frigo N.V., Frolova Z.V., Khaitov M.R., Chikin V.V. Atopic dermatitis. *Rossiyskiy allergologicheskiy zhurnal = Russian Journal of Allergy*, 2021, Vol. 18, no. 3, pp. 44-92. (In Russ.)]

1. D'Amato G, Cecchi L, Bonini S, Nunes C., Annesi-Maesano I., Behrendt H., Liccardi G., Popov T., van Cauwenberge P. Allergenic pollen and pollen allergy in Europe. *Allergy*, 2007, Vol. 62, pp. 976-990.

2. Darsow U., Vieluf D., Ring J. Evaluating the relevance of aeroallergen sensitization in atopic eczema with the atopy patch test: a randomized, double-blind multicenter study. *J. Am. Acad. Dermatol.*, 1999, Vol. 40, no. 2, Pt. 1, pp. 187-193.

3. Elisyutina O., Lupinek C., Fedenko E., Litovkina A., Smolnikov E., Ilina N., Kudlay D., Shilovskiy I., Valenta R., Khaitov M. IgE-reactivity profiles to allergen molecules in Russian children with and without symptoms of allergy revealed by micro-array analysis. *Pediatr. Allergy Immunol.*, 2021, Vol. 32, Iss. 2, pp. 251-263.

4. Fölster-Holst R., Galecka J., Weißmantel S., Dickschat U., Rippke F., Bohnsack K., Werfel T., Wichmann K., Buchner M., Schwarz T., Vogt A., Lademann J., Meinke M.C. Birch pollen influence the severity of atopic eczema-prospective clinical cohort pilot study and ex vivo penetration study. *Clin. Cosmet. Investig. Dermatol.*, 2015, Vol. 8, pp. 539-548.

5. Gilles S., Mariani V., Bryce M., Mueller M.J., Ring J., Behrendt H., Jakob T., Traidl-Hoffmann C. Pollen allergens do not come alone: Pollen associated lipid mediators (PALMS) shift the human immune systems towards a T(H)2-dominated response. *Allergy Asthma Clin. Immunol.*, 2009, Vol. 5, no. 1, 3. doi: 10.1186/1710-1492-5-3.
6. Lake I.R., Jones N.R., Agnew M., Goodess C.M., Giorgi F., Hamaoui-Laguel L., Semenov M.A., Solmon F., Storkey J., Vautard R., Epstein M.M. Climate change and future pollen allergy in Europe. *Environ. Health Perspect.*, 2017, Vol. 125, Iss. 3, pp. 385-391.
7. Meyer-Hoffert U. Reddish, scaly, and itchy: how proteases and their inhibitors contribute to inflammatory skin diseases. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz.)*, 2009, Vol. 57, no. 5, pp. 345-354.
8. Mothes N., Horak F., Valenta R. Transition from a botanical to a molecular classification in tree pollen allergy: implications for diagnosis and therapy. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, 2004, Vol. 135, Iss. 4, pp. 357-373.
9. Panzner P., Vachová M., Vítovcová P., Brodská P., Vlas T. A comprehensive analysis of middle-European molecular sensitization profiles to pollen allergens. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, 2014, Vol. 164, Iss. 1, pp. 74-82.
10. Ring J., Kunz B., Bieber T., Przybilla B. The "atopy patch test" with aeroallergens in atopic eczema (Abstr.). *J. Allergy Clin. Immunol.*, 1989, Vol. 82, p. 195.
11. Severity scoring of atopic dermatitis: The SCORAD index. Consensus Report of the European Task Force on Atopic Dermatitis. *Dermatology*, 1993, Vol. 186, no. 1, pp. 23-31.
12. Stefanovic N., Irvine A.D., Flohr C. The role of the environment and exposome in atopic dermatitis. *Curr. Treat. Options Allergy*, 2021, Vol. 8, no. 3, pp. 222-241.
13. Werfel T., Heratizadeh A., Niebuhr M., Kapp A., Roesner L.M., Karch A., Erpenbeck V.J., Lösche C., Jung T., Krug N., Badorrek P., Hohlfeld J.M. Exacerbation of atopic dermatitis on grass pollen exposure in an environmental challenge chamber. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2015, Vol. 136, Iss. 1, pp. 96-103.e9.
14. 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., Gieler 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.

Авторы:

Елисюткина О.Г. — д.м.н., ведущий научный сотрудник ФГБУ «Государственный научный центр «Институт иммунологии»» Федерального медико-биологического агентства; заведующая кафедрой ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы», Москва, Россия

Смольников Е.В. — научный сотрудник ФГБУ «Государственный научный центр «Институт иммунологии»» Федерального медико-биологического агентства; старший преподаватель кафедры иммунологии Медицинского института ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы», Москва, Россия

Authors:

Elisyutina O.G., PhD, MD (Medicine), Leading Research Associate, National Research Center "Institute of Immunology", Federal Medical Biological Agency; Head of the Department, P. Lumumba Russian University of Peoples' Friendship, Moscow, Russian Federation

Smolnikov E.V., Research Associate, National Research Center "Institute of Immunology", Federal Medical Biological Agency; Senior Lecturer, Department of Immunology, Medical Institute of P. Lumumba Russian University of Peoples' Friendship, Moscow, Russian Federation

Литовкина А.О. — научный сотрудник ФГБУ «Государственный научный центр «Институт иммунологии»» Федерального медико-биологического агентства; ассистент кафедры иммунологии Медицинского института ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы», Москва, Россия

Чернушевич Д.Д. — аспирант ФГБУ «Государственный научный центр «Институт иммунологии»» Федерального медико-биологического агентства; ассистент кафедры иммунологии Медицинского института ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы», Москва, Россия

Феденко Е.С. — д.м.н., профессор, заведующая отделением ФГБУ «Государственный научный центр «Институт иммунологии»» Федерального медико-биологического агентства, Москва, Россия

Litovkina A.O., Research Associate, National Research Center “Institute of Immunology”, Federal Medical Biological Agency; Assistant, Department of Immunology, Medical Institute of P. Lumumba Russian University of Peoples’ Friendship, Moscow, Russian Federation

Chernuchevich D.D., Postgraduate Student, National Research Center “Institute of Immunology”, Federal Medical Biological Agency; Assistant, Department of Immunology, Medical Institute of P. Lumumba Russian University of Peoples’ Friendship, Moscow, Russian Federation

Fedenko E.S., PhD, MD (Medicine), Professor, Head of the Department, National Research Center “Institute of Immunology”, Federal Medical Biological Agency, Moscow, Russian Federation

Поступила 31.03.2024

Отправлена на доработку 01.04.2024

Принята к печати 03.04.2024

Received 31.03.2024

Revision received 01.04.2024

Accepted 03.04.2024

ПРАВИЛА ДЛЯ АВТОРОВ

Статьи представляются в редакцию через систему электронного издательства (<http://mimmun.ru>) в соответствии с требованиями журнала «Медицинская иммунология» и «Инструкцией по подготовке и отправке статьи», представленной на сайте.

С 2016 г. в журнале публикуются статьи на русском и на английском языках.

В журнал принимаются следующие виды публикаций:

Оригинальная статья

Статья должна описывать результаты законченного исследования. Допускается объем статьи до 20 машинописных страниц, включая рисунки, таблицы. Статья должна содержать: 1) введение; 2) материалы и методы; 3) результаты исследований; 4) обсуждение результатов; 5) благодарности.

- **Введение** содержит обоснование цели и задач проведенного исследования.
- **Материалы и методы** могут излагаться в виде отдельных фрагментов с короткими подзаголовками. Все нетрадиционные модификации методов должны быть описаны с достаточной степенью подробности. Для всех используемых в работе реактивов, животных, клеточных культур и т. д. необходимо точно указывать производителей и/или источники получения (с названиями страны, фирмы, института).
- **Результаты** описываются в логической последовательности в виде отдельных фрагментов, разделенных подзаголовками, без элементов обсуждения, без повторения методических подробностей, без дублирования цифровых данных, приведенных в таблицах и рисунках.
- В **обсуждении** проводится детальный анализ полученных данных в сопоставлении с данными литературы, что служит обоснованием выводов и заключений авторов.
- Раздел «**Благодарности**» не является обязательным, но крайне желателен. В этом разделе авторы могут выразить признательность организации, субсидировавшей проведение исследований, коллегам, консультировавшим работу в процессе ее выполнения и/или написания, а также техническому персоналу за помощь в выполнении исследований. Благодарности за предоставление специфических реактивов или оборудования, как правило, помещаются в разделе «Материалы и методы».

Краткие сообщения

Журнал публикует небольшие по объему статьи, которые имеют безусловную новизну и значимость. Эти статьи проходят ускоренное рецензирование и публикуются в короткие сроки. Общий объем краткого сообщения ограничен 8 машинописными страницами, количество рисунков и/или таблиц не может быть более 3, а список использованных литературных источников не должен превышать 15. Титульный лист оформляется, как описано выше.

Разделы краткого сообщения аналогичны вышеописанным разделам оригинальной статьи, но не выделяются заголовками и подзаголовками, результаты могут быть изложены вместе с обсуждением.

Обзорные статьи и лекции

Обзорные статьи и лекции в основном заказываются редакцией или могут быть рекомендованы одним из членов редколлегии. Более подробную информацию о правилах оформления этих статей можно узнать в редакции

Библиографические стандарты описания цитируемых публикаций

Описание статьи из журнала:

Варюшина Е.А., Александров Г.В., Сазонова Т.А., Симбирцев А.С. Изучение влияния местного применения рекомбинантного человеческого интерлейкина-1β на репарацию язвенных повреждений слизистой оболочки желудка // Цитокины и воспаление, 2012. Т. 11, № 1. С. 64–69. [Varyushina E.A., Alexandrov G.V., Sazonova T.A., Simbirtsev A.S. Study of the effect of local application of recombinant human interleukin-1β in the repair of ulcerative lesions of gastric mucosa. *Tsitokiny i vospalenie = Cytokines and Inflammation*, 2012, Vol. 11, no. 1, pp. 64–69. (In Russ.)]

Описание статьи из книги (монографии):

Соколова Г.Н., Потапова В.Б. Клинико-патогенетические аспекты язвенной болезни желудка. М.: Анахарсис, 2009. 328 с. [Sokolova G.N., Potapova V.B. Clinical and pathogenetic aspects of gastric ulcer. Moscow: Anacharsis, 2009. 328 p.]

Примеры правильного оформления англоязычных ссылок:

Wells S.M., Kantor A.B., Stall A.M. CD43(S7) expression identifies peripheral B-cell subsets. *J. Immunol.*, 1994, Vol. 153, no. 12, pp. 5503–5515.

Goodman J.W., Parslow T.G. Immunoglobulin proteins. Basic and Clinical Immunology. Ed. Stites D.P., Terr A.I., Parslow T.G., Appleton and Lange, 1994, pp. 66–79.

Ссылки на литературные источники в тексте статьи, в рисунках и таблицах обозначаются арабскими цифрами в квадратных скобках [1, 2, 3,...]. не допускаются ссылки на диссертации, авторефераты диссертаций, публикации в сборниках, методические документы местного уровня. Количество источников не ограничено. В каждой ссылке приводятся все авторы работы. Неопубликованные статьи в список не включаются.

Обозначения, сокращения и единицы измерения

Для сложных терминов или названий, наиболее часто используемых в тексте статьи, можно ввести (в круглых скобках после первого упоминания полного названия термина) не более 3–5 нетрадиционных сокращений. Узаконенные международными номенклатурами сокращения используются в соответствующей транскрипции. Например, для термина «интерлейкин» используется сокращение «IL»,

а не русскоязычный вариант «ИЛ»; аналогично этому используются сокращения: «TNF», а не «ТНФ» или «ФНО»; «CD», а не «СД». Названия микроорганизмов приводятся в оригинальной транскрипции с использованием курсива (*E. coli*, *Streptococcus pyogenes*). Единицы измерения приводятся без точки после их сокращенного обозначения (с, ч, см, мл, мг, kDa и т.д.), регламентированного международными правилами.

Оформление иллюстративного материала

Иллюстративный материал должен быть оригинальным, то есть ранее нигде не опубликованным. Общее количество иллюстраций (таблиц и рисунков) не должно превышать восьми. При большем количестве иллюстраций их публикация оплачивается автором. Публикация цветных иллюстраций (независимо от их количества) также оплачивается автором. Весь иллюстративный материал присылается в двух экземплярах и на диске в виде отдельных файлов.

Размеры иллюстраций:

- максимальная высота — 210 мм
- максимальная ширина для 1 столбца — 82 мм, для 2 столбцов — 170 мм

Таблицы. Каждая таблица печатается на отдельном листе (в отдельном файле на диске) через 2 интервала. Нумерация таблиц дается арабскими цифрами отдельно от нумерации рисунков (графиков и фотографий). Название печатается над таблицей. Весь текст на русском языке, содержащийся в таблице, включая единицы измерения, должен быть переведен на английский язык; при этом перевод следует помещать в ячейку с соответствующим русским текстом отдельной строкой. Название таблицы и текст примечания к ней также должны быть переведены на английский язык и приведены под русским текстом с новой строки. Для пометок в таблицах следует использовать одну или несколько (*). Пояснения печатаются после соответствующего количества (*) под таблицей. Единицы измерения, при необходимости, включаются в заголовки строк или столбцов.

Рисунки (графики и фотографии). В тексте статьи названия рисунков (графиков, фотографий) и таблиц размещаются сразу после абзаца, где на них дается первая ссылка. Все рисунки нумеруются последовательно арабскими цифрами по мере их использования в тексте статьи. Названия рисунков и подписи к ним выносятся в виде списка на отдельную страницу. В списке указываются: номер рисунка, название (с большой буквы), текст примечаний (для микрофотографий должно быть указано увеличение). Подписи к рисункам даются краткие, но достаточно информативные. Названия рисунков и примечаний к ним, нарисовочные подписи, текст легенды должны быть переведены на английский язык и размещены под соответствующим текстом с новой строки. На обороте каждой иллюстрации подписывается фамилия первого автора, название статьи и порядковый номер. Для публикации в журнале принимаются только оригиналы фотографий (не ксерокопии) хорошего качества, максимально приближенные к вышеуказанным размерам.

Фотографии не должны иметь больших полей, т.е. фотографический материал должен занимать всю площадь фотографии. Рисунки могут быть представлены в графических форматах с расширением .tiff (разрешение не менее 300 dpi при 100% масштабе), .eps или .ai. Изображения, встроенные в документы Word, не принимаются. Графики и диаграммы предоставляются вместе с таблицами, на основе которых они были созданы, или с численными обозначениями показателей, отображаемых соответствующими графическими элементами (столбиками, секторами и т.п.) в виде файлов с расширениями .doc или, предпочтительнее, .xls.

Плата за публикацию статей

При соблюдении правил публикация статей в журнале «Медицинская иммунология» является бесплатной для авторов и учреждений, в которых они работают. Редакция может потребовать оплату в следующих случаях: 1) за публикацию цветных иллюстраций; 2) при большом количестве иллюстративного материала (свыше 8 иллюстраций).

Подготовка статей

Для представления статьи авторы должны подтвердить нижеследующие пункты. Статья может быть отклонена, если она им не соответствует.

- А. Направляя статью в журнал, авторы гарантируют, что поданные материалы не были ранее опубликованы полностью или по частям, в любой форме, в любом месте или на любом языке. Также авторы гарантируют, что статья не представлена для рассмотрения и публикации в другом журнале. С момента принятия статьи к печати в журнале «Медицинская иммунология» приведенный в ней материал не может быть опубликован авторами полностью или по частям в любой форме, в любом месте и на любом языке без согласования с руководством журнала. Исключением может являться: 1) предварительная или последующая публикация материалов статьи в виде тезисов или короткого резюме; 2) использование материалов статьи как части лекции или обзора; 3) использование автором представленных в журнал материалов при написании диссертации, книги или монографии. Воспроизведение всего издания или части любым способом запрещается без письменного разрешения издателей. Нарушение закона будет преследоваться в судебном порядке. Охраняется Законом РФ № 5351-1 «Об авторском праве и смежных правах» от 09.07.93 г.
- Б. Файл отправляемой статьи представлен в формате .doc, .docx, .rtf.
- В. Помимо файла со статьей, предоставлены следующие файлы:
 - 1) Файл с метаданными (при загрузке в систему ему присваивается имя «Метаданные»):
 - Фамилия, имя, отчество, ученая степень, ученое звание, должность автора, ответственного за дальнейшую переписку с редакцией (на русском и английском языках).
 - Название учреждения, где работает ответственный автор (в русском и официально принятом английском вариантах).

- Почтовый адрес для переписки с указанием почтового индекса (на русском и английском языках).
- Телефон, факс (с указанием кода страны и города), e-mail.
- Фамилия и инициалы остальных соавторов, их ученые степени, ученые звания, должности.
- Полное название статьи, направляемой в редакцию.
- Количество страниц текста, количество рисунков, количество таблиц.
- Указать, для какого раздела журнала предназначена работа: оригинальные статьи, лекции, обзоры, «точка зрения», краткие сообщения, новые иммунологические методы, случаи из практики, дневник иммунолога, книжное обозрение.
- Дата отправления работы.

2) Отсканированная копия файла с метаданными, подписанная всеми авторами (при загрузке в систему ему присваивается имя «Подписи авторов»)

3) Титульный лист (при загрузке в систему ему присваивается имя «Титульный лист»), по форме:

- название статьи (без использования каких-либо сокращений) (на русском и английском языках);
- Фамилия, имя, отчество, ученая степень, ученое звание, должность всех авторов (полностью) (на русском и английском языках);
- подразделение и учреждение, в котором выполнялась работа (если в работе участвовали авторы из разных учреждений, это должно быть отмечено звездочками) (в русском и официально принятом английском вариантах);
- сокращенное название статьи для верхнего колонтитула (не более 35 символов, включая пробелы и знаки препинания) (на русском и английском языках);
- не менее 6 ключевых слов на русском и английском языках;
- адрес для переписки с указанием телефона, номера факса и адреса e-mail.

4) Резюме (при загрузке в систему ему присваивается имя «Резюме»). Предоставляется в виде одного абзаца без ссылок и специфических сокращений. Объем — не менее 300 слов. Резюме в полном объеме представляется также в переводе на английский язык. В отдельных случаях, по решению редакционной коллегии, может быть затребован развернутый вариант резюме на английском языке.

5) Рисунки, если они есть - каждый отдельным файлом (при загрузке в систему каждому рисунку присваивается имя «Рисунок. Название рисунка (где название рисунка соответствует содержащемуся в файле рисунку. Порядковый номер рисунка)»)

6) Файл в формате .doc, .docx, rtf, с названиями рисунков

7) Таблицы, если они есть - каждая отдельным файлом (Название каждой таблицы должно быть приведено заголовком в файле с самой таблицей)

8) Файл с цитируемой литературой (при загрузке в систему ему присваивается имя «Литература»), по следующей форме: таблица из четырех столбцов (альбомная ориентация), где:

Порядковый номер ссылки	Авторы, название публикации и источника, где она опубликована, выходные данные	ФИО, название публикации и источника на английском	Полный интернет-адрес (URL) цитируемой статьи
Размещаются в таблице в алфавитном порядке, вначале русскоязычные, затем на языках с латинской графикой	Указывать по библиографическому стандарту, представленному выше	Официальное англоязычное название публикации и источника, где она опубликована - для русскоязычных статей. В редких случаях, когда не существует официальных англоязычных названий (это возможно для таких типов публикаций, как тезисы, книги и др.) - редакция просит предоставить их перевод, используя красный цвет шрифта. Для англоязычных публикаций и источников в этом столбце ставится прочерк	В том случае, если информация о статье не размещена на официальном сайте издания, допустимо использовать URL статьи со сторонних сайтов, в том числе системы www.e-library.ru

Текст должен быть набран с одинарным межстрочным интервалом; используется кегль шрифта в 14 пунктов; для выделения используется курсив, а не подчеркивание; все ссылки на иллюстрации, графики и таблицы расположены в соответствующих местах в тексте, а не в конце документа.

Текст соответствует стилистическим и библиографическим требованиям.

Если вы отправляете статью в рецензируемый раздел журнала, то вы согласны с требованиями слепого рецензирования, подробнее о котором можно узнать на сайте журнала (<http://mimmun.ru>) из рубрики **Рецензирование**, в разделе **«О Журнале»**.

Вы можете оформить подписку на журнал «Медицинская иммунология» через отделения связи: Каталог «УРАЛ-ПРЕСС» — индекс 42311. Подписка на электронную версию журнала на сайте www.elibrary.ru

АВТОРСКИЙ УКАЗАТЕЛЬ

Айдагулова С.В.57	Гроусова Д.М.153	Костинова А.М.169	Ожаровская Т.А.153	Топчиева Л.В.197
Айрапетов М.И.75	Гущин В.А.45	Костинов М.П.169	Орлова Е.С.35	Феденко Е.С.225
Альбаханса М.И.169	Денисенко А.Д.131	Кудряшова А.М.45	Останин А.А.179	Храпунова И.А.169
Альварес М.А.143	Дмитриева А.А.131	Кузнецова Ю.Д.143	Павлова И.Е.21	Чепанов С.В.35
Андреева Н.П.169	Долгих О.В.69	Кузьмич Е.В.21	Панкратьева Л.Л.45	Черепович Б.С.45
Аторин Д.А.197	Должикова И.В.153	Курбатова И.В.197	Пасман Н.М.179	Черкашин Д.Р.143
Аутеншлюс А.И.97	Драгунова М.А.215	Курбатова О.В.119	Петричук С.В.119	Чернушевич Д.Д.225
Ахматова Н.К.169	Дуданова О.П.197	Лебедев А.А.75	Попова О.153	Черных Е.Р.179
Балашов А.А.143	Елисютина О.Г.225	Леплина О.Ю.179	Почтовый А.А.45	Шабалдин А.В.87
Балашова Л.М.143	Ереско С.О.75	Лесовой С.В.143	Прокофьев В.Ф.57	Шабалдина Е.В.87
Баталов Р.Е.215	Ерешко О.А.119	Линок А.В.169	Романова Е.Л.87	Шабанов П.Д.75
Белов Е.Г.87	Зайнуллина И.А.153	Макарова С.Г.225	Рыжикова С.Л.97	Шведченко И.Н.107
Боголюбова А.В.45	Жужула А.А.119	Логунов Д.Ю.153	Салмаси Ж.М.143	Шевела Е.Я.179
Борисова О.В.45	Жулай Г.А.197	Локтионова М.Н.169	Свитич О.А.45	Шевченко А.В.57
Бубнова Л.Н.21	Загалаев Б.Т.207	Лугачева Ю.Г.215	Сельков С.А.35	Шевченко Е.А.87
Бухтуева Н.Г.179	Зрелкин Д.И.153	Литовкина А.О.119	Семикина Е.Л.119	Ширинкина А.С.69
Быковская Е.Ю.107	Зубкова О.В.153	Мангазеева Е.Д.97	Ситкова Е.С.215	Ширинский В.С.7
Быковская С.Н.143	Иванова А.А.131	Мануйлов В.А.45	Смольников Е.В.225	Ширинский И.В.7
Бычков Е.Р.75	Игнатова П.Д.75	Маринкин И.О.57	Сновская М.А.119	Щебляков Д.В.153
Воронина Д.В.153	Кан В.Ю.153	Миронова А.М.207	Стрига Л.В.87	Юшкова С.В.169
Галимова А.А.119	Кантаржи Е.П.143	Мироманова Н.А.207	Студеникина А.А.97	Яковлева А.А.87
Гинцбург А.Л.153	Ковыршина А.В.153	Михайлова А.А.75	Суслова Т.Е.215	
Глазанова Т.В.21	Коненков В.И.57	Настаева Н.Ю.169	Суханова Д.Д.75	
Голдовская П.П.153	Королева Е.Г.57	Никитюк Н.Ф.169	Тимофеева Ю.С.57	
Голубцов В.В.107		Огуркова О.Н.215	Тихонова М.А.179	

ПРЕДМЕТНЫЙ УКАЗАТЕЛЬ

адаптивный иммунитет170	иммуноферментный анализ58	центральная толерантность8
аденовирус человека154	клеточная дифференцировка98	циркулирующие иммунные
аденозин198	кровь144	комплексы131
алкоголь76	метод сокращения многофакторной	цитокин-секретирующая активность108
аллергия на пыльцу березы226	размерности88	цитокины76, 98
антитела SARS-CoV-2170	механизм образования22	эксперимент <i>in vivo</i>70
антитела к модифицированным	миома матки58	экспериментальные модели
липопротеинам низкой плотности131	модифицированные липопротеины	неинфекционного увеита8
антифосфолипидные антитела36	низкой плотности131	эндотелиальная дисфункция36
антифосфолипидный синдром36	мозг76	язвенный колит198
апоптоз макрофагов131	молекулярная алергодиагностика226	Bet v 1226
апликационный тест226	молекулярно-генетические подтипы98	CCR2180
атеросклероз131	нейровоспаление76	CD206180
атопический дерматит120, 226	нейтрофилы108	COVID-19208, 46
безопасность154	офтальмология144	CRP (rs1205)88
бенз(а)пирен70	пандемия170	FoxP3198
беременность180	периферическая толерантность8	IFN γ46
биомаркеры216	пищевая аллергия120	IgE-ответ120
биооптаты98	поликлональный активатор98	IGRA-тест46
вакцина154	полиморфизм208	IL-158
вакцинация170	пренатальное воздействие алкоголя76	IL-458
внебольничные пневмонии208	привычное невынашивание	IL-658
воспаление131, 198, 216	беременности36	IL-858
врожденная глаукома144	призывной возраст208	IL-1058
врожденная катаракта144	псориаз88	IL 10 (rs1800896)88
геморрагическая лихорадка Ласса154	пуринергический сигнальный путь198	IL 1 β (rs16944)88
гены208	рак молочной железы98	IL 6 (rs1554606)88
гетерологичная защита170	растворимые молекулы иммунных	IL 8 (rs227306)88
гидроксизилкрахмал108	контрольных точек22	M1-ассоциированные маркеры180
градиентное центрифугирование108	растворимый тромбомодулин216	M2-ассоциированные маркеры180
декстран108	рекомбинантный аденовирусный	P-селектин36
дефензины208	вектор154	ROR γ198
доношенные здоровые дети144	ретинопатия недоношенных144	SARS-CoV-246
злокачественные заболевания	рифампицин76	sPD-122
системы крови22	сенситизация к белку	sPD-L122
злокачественные новообразования22	куриного яйца120	Th17-лимфоциты8
изоляция108	сенситизация к желтку	TNF α58
иммунитет к гриппу170	куриного яйца120	TNF α (rs361525)88
иммунная адаптация180	сигнальный белок STAT38	Toll-подобные рецепторы76
иммуногенность154	субпопуляции моноцитов180	T-клеточный иммунитет46
иммуноглобулин Е226	твердофазный ИФА46	T-регуляторные клетки
иммуноглобулины для внутривенного	токсичность70	CD4 ⁺ CD25 ^{high} Foxp3 ⁺ CD127 ^{low}144
введения36	тромботические осложнения216	T-хелперы8
иммуномагнитная селекция108	фагоцитоз70	VEGF58
иммуноопосредованный увеит8	фактор роста хлореллы70	
иммунорегуляция70	факторы риска увеита8	
	фибрилляция предсердий216	

ИЛЛЮСТРАЦИИ К СТАТЬЕ «КЛИНИКО-ИММУНОЛОГИЧЕСКОЕ ОБОСНОВАНИЕ ПРОТОКОЛА ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ПЛАЗМАФЕРЕЗА И ВНУТРИВЕННЫХ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ У БЕРЕМЕННЫХ С АНТИФОСФОЛИПИДНЫМ СИНДРОМОМ» (АВТОРЫ: ОРЛОВА Е.С., ЧЕПАНОВ С.В., ЗАЙНУЛИНА М.С., СЕЛЬКОВ С.А. [с. 35-44])

ILLUSTRATIONS FOR THE ARTICLE "USE OF PLASMAPHERESIS AND INTRAVENOUS IMMUNOGLOBULINS IN PREGNANT WOMEN WITH ANTIPHOSPHOLIPID SYNDROME" (AUTHORS: ORLOVA E.S., CHEPANOV S.V., ZAINULINA M.S., SELKOV S.A. [pp. 35-44])

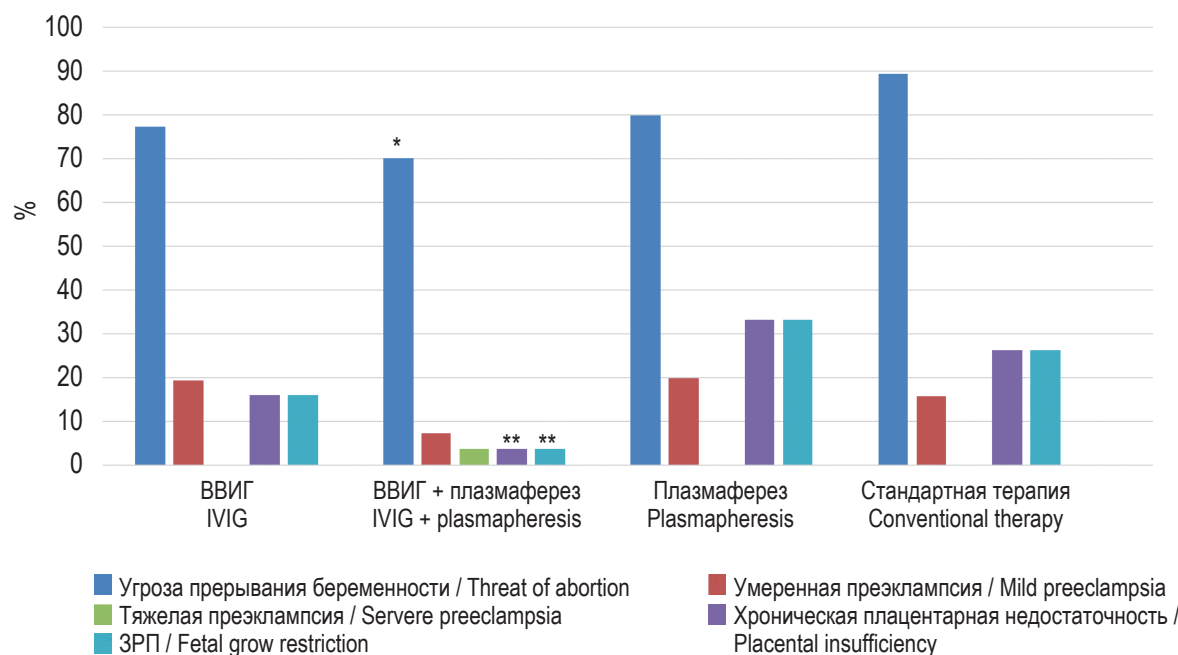


Рисунок 1. Частота акушерских осложнений при текущей беременности исследуемых групп

Примечание. * – различия достоверны ($p = 0,03$) относительно группы с применением только традиционной терапии; ** – различия достоверны ($p = 0,03$) относительно группы с применением плазмафереза на фоне традиционной терапии.

Figure 1. Frequency of obstetric complications in the current pregnancy of the studied groups

Note. *, differences are significant ($p = 0.03$) relative to the group using only traditional therapy; **, differences are significant ($p = 0.03$) relative to the group using plasmapheresis against the background of traditional therapy.

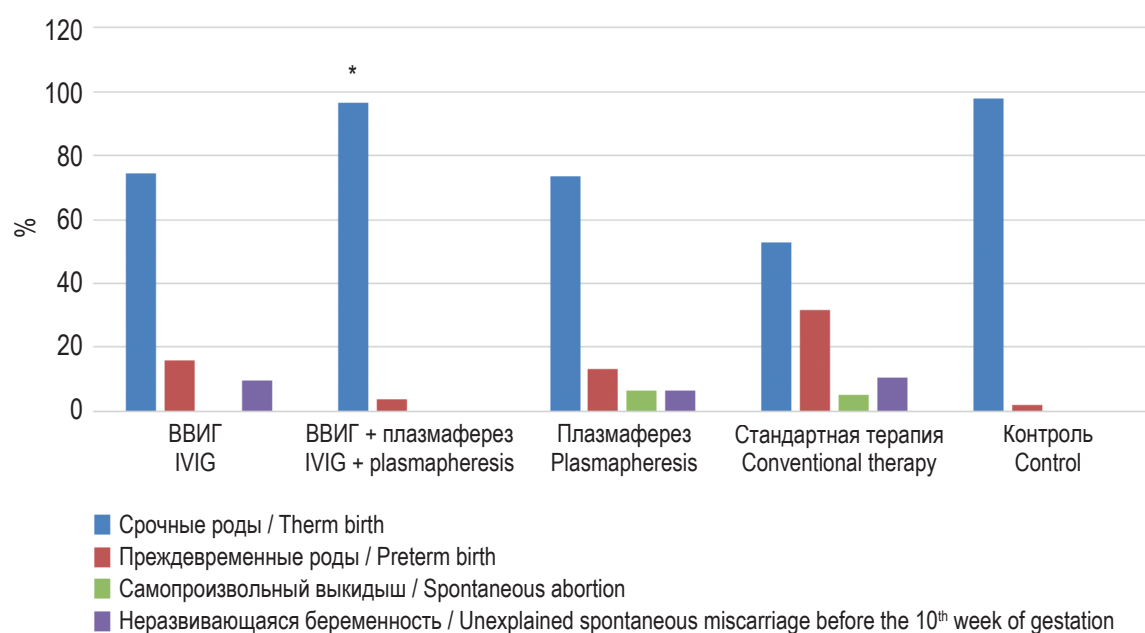


Рисунок 2. Исходы текущей беременности обследуемых женщин

Примечание. * – различия достоверны ($p = 0,014$) относительно группы с применением только стандартной терапии.

Figure 2. Outcomes of the current pregnancy of the examined women

Note. *, differences are significant ($p = 0.014$) relative to the group using only standard therapy.

ПОДПИСНОЙ ИНДЕКС:
УРАЛ-ПРЕСС – 42311

